

パラコッカス菌を用いたカロテノイドの商業生産

石橋 卓

カロテノイドは、細菌、菌類、藻類、植物および動物に分布する炭素数40の基本骨格を持つ色素である。カロテノイドの基本構造であるポリエン鎖の共役二重結合が増えるに従い、無色から淡黄色、橙黄色、赤色へと変化する。さらにポリエン鎖の両端に環が形成されると橙色や黄色へと変化する。今までに750種類以上のカロテノイドが報告され¹⁾、生物界において重要な生理作用を持つことが知られている。

微生物を用いたカロテノイドの生産は、特に飼料分野において、顧客の要求を満たす品質と価格、さらに安定供給に優れた手段である。また、最近の消費者ニーズは天然品および環境や社会にやさしい製造法で得られた商品を志向しており、微生物を用いた有用物質の発酵生産は、ますます重要な技術になっている。

当社パラコッカス菌 (*Paracoccus carotinifaciens*) を発見して20年以上が経過した今も、菌株育種とカロテノイド生産性向上の研究開発は続いている。本稿ではサケ・マス用途の体色改善剤 (商品名: Panaferd[®] AX) の商業生産を中心として、*P. carotinifaciens* が生産するカロテノイドの有効利用についても紹介したい。

Paracoccus carotinifaciens とは

P. carotinifaciens は、グラム陰性、好気性、周毛性鞭毛による運動性を示し、アスタキサンチン (astaxanthin) を主成分とするカロテノイド混合物を生産する。16S リボソームRNAに対応するDNAの塩基配列と菌学的特徴から、*Paracoccus* 属の新種であることが明らかになった²⁾。

P. carotinifaciens が生産するカロテノイドは、イソプレネン基本合成経路によって生じた2分子のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から無色のフィトエン (phytoene) が合成され、それが赤色のリコペン (licopen) に変換され、次にリコペン・シクラーゼ (*crtY*) により橙色のβ-カロテン (β-carotene) に変換される³⁾。さらにβ-カロテンを基質にしてカロテノイド4,4'-ケトラーゼ (*crtW*) によりエキネノン (echinenone)、β-カロテン3,3'-ヒドロキシラーゼ (*crtZ*) によりβ-クリプトキサンチン (β-cryptoxanthin) が合成され、さらに両酵素の働きによりアスタキサンチンが最終産物として

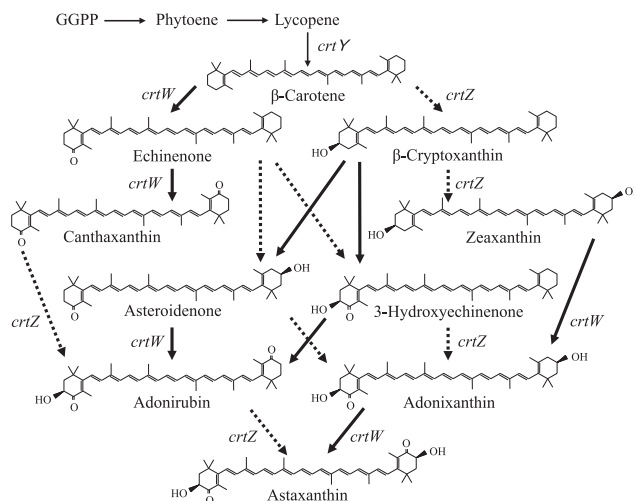


図1. *Paracoccus carotinifaciens* のカロテノイド合成経路

生合成される (図1)³⁾。

P. carotinifaciens は、近縁種に重篤な病状を引き起こす病原菌がないこと、菌株育種と培養が容易であることから、アスタキサンチン生産菌として産業上の利用価値が高い。*Paracoccus* 属は多くの「種」が報告されており、カロテノイド合成経路を持つ「種」も世界各地で発見されている。

カロテノイドの生産性向上

微生物を用いた有用物質の商業生産は、菌株育種、培地成分の最適化、実機に適した培養条件の設定、製造プロセスの最適化が重要となる。

P. carotinifaciens については、古典的な手法により菌株育種を行っている。筆者は「遺伝子組換え製品は危ない」という考え方に否定的である。しかし、国内と欧州の多くの消費者は、非遺伝子組換え製品を好んで選択していることは事実であり、化学合成アスタキサンチンとの差異化を明確にするためにも、当社は菌株育種に遺伝子組換え技術を利用してこなかった。

菌株の変異処理は、化学薬剤 (NTG, EMS) と紫外線照射により行い、寒天培地に播種した菌をコロニーの色調と大きさ、などで一次選抜した。古典的な手法だけで目的株の取得に成功した理由の一つは、目視によりコロニーが評価できたからである。一次選抜株は試験管培

養、二次選抜株は小型発酵槽で培養して、菌の増殖速度、カロテノイド組成、アスタキサンチンの生産性から目的株を選別した。

今までに変異育種株としては、アスタキサンチン高生産株⁴⁾、カンタキサンチン生産株⁵⁾、ゼアキサンチン生産株⁶⁾、リコペン生産株⁷⁾、対糖収率向上株⁸⁾を取得している。アスタキサンチン高生産株はカロテノイド生合成遺伝子群以外の変異、カンタキサンチン生産株は*crtZ*遺伝子、ゼアキサンチン生産株は*crtW*遺伝子、リコペン生産株は*crtY*遺伝子の変異によるものと推察される(図1)。対糖収率向上株は、野生株が生産するポリ-β-ヒドロキシ酪酸とグルコン酸の蓄積を抑えるので、培地炭素源の無駄な消費を防ぐことができる。

カロテノイド生産培地は、炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン、アミノ酸から構成される。培地組成の最適化は、成分ごとに最適濃度を菌の増殖速度とカロテノイドの生産性により定めた。また、*P. carotinifaciens*は、グルタミン酸の添加(1 mmol/L~200 mmol/L)によりカロテノイドの生産性を向上させる⁹⁾ことも見いだした。

*P. carotinifaciens*の通常培養は、28°C、pH 7.2の環境で行われる。カロテノイド組成は、溶存酸素濃度(DO)により制御できる。

Panaferd® AXの製造と販売

天然のサケやマスは、カロテノイドを含む生物を捕食することで筋肉や卵に主にアスタキサンチンを蓄積する。卵と稚魚の生存率は、卵中のカロテノイド含量の増加とともに高まることが知られている。養殖においてもアスタキサンチンの摂餌は有害な活性酸素から生体を防御するのに必要であり、肉質を鮮やかなサーモンピンクにすることは、食品としての見栄えを良くする上でも重要である。Panaferd® AXは、サケ・マス用途の体色改善剤(色揚げ剤)として開発された。

Panaferd® AXの製造工程は、*P. carotinifaciens*のシード培養、カロテノイドの生産培養、培養終了後の加熱殺菌、培養液成分を減らす濃縮、炭酸カルシウムの添加によるカロテノイドの濃度調整、*P. carotinifaciens*死菌の乾燥、粉碎、混合、秤量、包装、品質検査からなる。Panaferd® AXは、暗赤色の粉体であり特有の臭いがある。

体色改善剤であることから、Panaferd® AXに含まれる主な色素であるアスタキサンチン、アドニルビン、カンタキサンチン含量量の規格が定められている(表1)。

実機に適した培養条件を設定する上で特に重要となるスケールアップ因子は、カロテノイド生産培養のDOを

表1. Panaferd® AXの成分例

項目	含有量
Total carotenoid	3.7%
Astaxanthin	2.2% (欧州規格: 20~23 g/kg)
Adonirubin	0.7% (欧州規格: 7~15 g/kg)
Canthaxanthin	0.2% (欧州規格: 1~5 g/kg)
Adonixanthin	0.1%
Others	0.5%
水分	3.5%
タンパク質	43%
脂質	<7%
灰分	7%
炭水化物	40%

制御する通気量と攪拌速度である。ターゲットDOを培養経過時間ごとに定めて、アスタキサンチン、アドニルビン、カンタキサンチンの組成比をHPLCで確認しながら培養する。

シード培養からの植菌量と菌の活性、初期攪拌速度は、アスタキサンチンの生産性と培養時間に影響を及ぼす。

1バッチ生産あたりのアスタキサンチン得量を高めるには、加熱殺菌の昇温条件と乾燥温度が重要である。カロテノイドは熱により分解が促進する。

濃縮工程で連続遠心装置を利用する場合は、処理液のpHを5.5以下にすれば沈降性が高まり作業時間を短縮できる¹⁰⁾。

Panaferd® AXについては、病原性試験、安全性確認試験、作業員への安全確認試験、体色改善の評価試験、海洋での環境影響調査、保存安定性試験、飼料中の安定性試験、養殖魚の色素安定性試験などを行い、飼料添加物の審査基準をすべて満たしたので、2008年に欧州、2009年に米国、2014年にカナダにおいて、サケ・マス用途の飼料添加物として認証された。また、国内においては混合飼料として登録されている。

Panaferd® AXの体色改善効果は、スコットランドの海上生簀において総数1万尾を越える大西洋サケで確認した。飼料中のアスタキサンチン濃度を40 ppm、70 ppm、100 ppmとして、17か月間の摂餌を行った。養殖現場では、カロテノイドの定量分析以外に体色変化をサーモン用のカラーファン値(赤みの違いを数字で表記した色見本)で判定する。すべての試験区において、摂餌後6か月から出荷基準の目安となるカラーファン値28を超えていた。大西洋サーモンの体色改善に必要な

アスタキサンチンの添加量は40 ppm (Panaferd® AXとして2000 ppm) 以下となる。

ニジマスを用いた効果性試験において、Panaferd® AXは化学合成アスタキサンチンよりも少ない添加量で同様の体色改善効果を示した。これはPanaferd® AXに含まれるアスタキサンチン以外のカロテノイド (図1) がニジマスに蓄積したからである。

Panaferd® AXに含まれるカロテノイドは、β-カロテンを除き、ほぼそのままの組成で大西洋サケに移行した (表2)。アスタキサンチンの還元代謝産物であるイドキサンチン¹¹⁾も検出された (表2)。

Panaferd® AXを養殖魚 (マダイ, など) に摂餌すると、化学合成品に比べて色味が深くなり天然魚に近い体色になることが好評である。これは、Panaferd® AXがアスタキサンチンよりも橙色や黄色が強いアドニキサンチンやカンタキサンチンを含むからであると考えられる。

サケ・マス用途の体色改善剤は、アスタキサンチンとして年間100トン以上が使用されている。そのうち、天然品由来のアスタキサンチンは10~13%程度を占める。サケの消費量は年間5%弱の伸びが期待されること、および消費者志向の変化が顕著なことから天然品由来のアスタキサンチンの需要は堅調に伸びており、当社は、天然品由来のアスタキサンチンの安定供給を継続するため、生産能力の増強を計画している。

表2. Panaferd® AXを摂餌した大西洋サケの切り身中のカロテノイド含量 (μg/g)

	個体1	個体2
Sample Weight (g)	1285	1450
Astaxanthin	1195	1024
cis-Astaxanthin	49	18
Adonirubin	81	130
Canthaxanthin	61	151
Adonixanthin	34	9
Asteroidenone	9	16
Idoxanthin	134	456

今後の展望

*P. carotinifaciens*を用いたカロテノイドの製造法を確立し、サケ・マス用途のPanaferd® AX (体色改善剤)の商品化に成功した。体色改善剤としての用途は、その他の養殖魚、エビ、鶏卵の色揚げにも容易に展開できる。国内では、食品の新たな機能性表示制度が始まり、たとえば、鶏卵の色揚げにPanaferd® AX, Panaferd® ZX (ゼアキサンチン生産株から製造した混合飼料)、リコペン生産株の乾燥菌体を使用すれば、鶏卵の販売時にアスタキサンチン、ゼアキサンチン、リコペンの機能性表示を記載できる可能性がある。

アスタキサンチンは、一重項酸素の強力な消去活性と過酸化脂質の発生抑制作用を持つことが知られている。アスタキサンチンを2%以上含むPanaferd® AXは、家畜やヒトの健康食品としても有効であろう。

*P. carotinifaciens*は、アスタキサンチン以外のカロテノイドも生産できるが (図1)、今までのところ、アスタキサンチン以外は、ヒトの効果性試験と作用メカニズムの研究 (有効性評価) が進んでいない。アドニルビンやアドニキサンチンは、アスタキサンチンよりも一重項酸素の消去活性は高いが¹²⁾、ヒトでの有効性評価は実施されていない。*P. carotinifaciens*は、安全に安価にこれらのカロテノイドを商業生産できるポテンシャルを持つ。

今後、*P. carotinifaciens*が生産するアスタキサンチン以外のカロテノイドの有効性評価を進め、新たな訴求機能を持つ健康食品原料あるいはバイオマスそのものとして*P. carotinifaciens*を活用していきたい。

文 献

- 1) Britton, G. *et al.*: Carotenoids Handbook, Birkhauser Verlag, Basel (2004).
- 2) Tsubokura, A. *et al.*: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 277 (1999).
- 3) Misawa, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **177**, 6575 (1995).
- 4) 特許4463347.
- 5) 特開2003-304875.
- 6) 特開2005-87097.
- 7) 特開2005-87100.
- 8) 特開2011-188795.
- 9) WO2010/044469 A1.
- 10) 特許5155898.
- 11) Schiedt, K. *et al.*: *Comp. Biochem. Physiol. (Part B)*, **92**, 277 (1989).
- 12) Maoka, T. *et al.*: *J. Oleo Sci.*, **62**, 181 (2013).