

報 文1

発酵法による養殖魚飼料用アスタキサンチンの開発

中央技術研究所 化学研究所 先端材料グループ 平澤 和明



1. はじめに

アスタキサンチンは赤色の化合物であり、サケ、マダイなど養殖魚の色調を改善するための飼料添加物として広く利用されている。我々は生産菌パラコッカス・カロティニファシエンス (*Paracoccus carotinifaciens*) を用いたアスタキサンチンの発酵製造プロセスを確立し、サケ・マス用の色素飼料添加物として欧州および米国の認可を取得、バクテリア由来のアスタキサンチンとしては世界に先駆けてその商業化に成功した。本稿ではその開発経緯について報告する。

2. アスタキサンチンとは

アスタキサンチンは図1の構造を有する赤色系カロテノイドである。カロテノイドとは長鎖のポリエン構造、多くは炭素数40のテトラテルペノイドを有し、黄、赤色を呈する色素群の総称で、ニンジン中の β -カロテンはその代表例である。他のカロテノイドとしてはトウモロコシに含まれるゼアキサンチン、温州ミカンの β -クリプトキサンチン、トマトのリコペンなどが存在する。

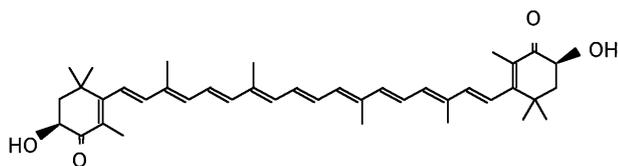


図1 アスタキサンチンの構造

アスタキサンチンはエビやカニの甲羅に含まれている天然色素である。天然のサケやマダイは自然界のエビやカニなどを食することにより、サケは筋肉中に、マダイは表皮にアスタキサンチンを蓄積し、鮮やかな赤色を呈する。ところが、養殖では経済的理由によりエビやカニを飼料として与えられず、魚粉などを原料にした人工の固形飼料が使用されるため、アスタキサンチンを飼料に混合する必要がある。肉の赤くないサケや表皮の赤くないマダイは商品価値が著しく低下するので、アスタキサンチンを飼料に添加することが養殖業界において通常行われている。養殖魚飼

料用アスタキサンチンとしてこれまで化学合成品が流通し、現在も主流であるが、消費者の天然志向により天然物由来のアスタキサンチンへの要求が高まりつつある。

アスタキサンチンは、一重項酸素の消去活性ではビタミンEの約500倍、脂質過酸化抑制活性では約1,000倍などの報告があり、酸化抑制に関する優れた作用を持つことが知られ、養殖魚の色調改善剤としてだけでなく、最近では健康食品素材としても注目されている。

3. 製造プロセスの確立

3.1 生産菌の発見

当時、アスタキサンチンを経済的に生産する微生物は世に知られていなかったため、微生物を探索するところから研究を開始した。新規な微生物を取得する際の常套手段として土壌中より分離することを試みた。土壌中には種々の微生物が存在し、その種類は環境によって異なることから、まず全国各地の様々な環境から多くの土壌サンプルを収集した(図2)。次に集めた土壌サンプルを希釈し、好気性バクテリア用の寒天培地に塗布、培養した。寒天培地上で赤色を呈する微生物コロニーを分離し、その色素を分析することにより、アスタキサンチンを生産する2株のバクテリアを取得することに成功した¹⁾。

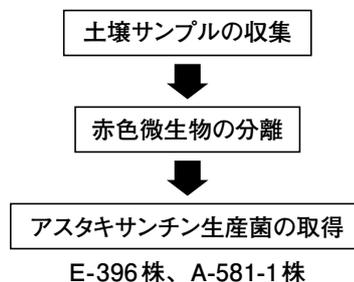


図2 アスタキサンチン生産菌株の取得

取得した2株のうち特にアスタキサンチン生産性の高かったE-396株を工業生産のための開発に用いる菌株として選抜した(図3)。各種菌学的性質、16SリボソームRNAの塩基配列、DNA-DNAハイブリダイゼーション等の詳細な分類学的解析からE-396株は、従来知ら

れていない新種のバクテリアであることが判明した。パラコッカス・カロティニファシエンス (学名 *Paracoccus carotinifaciens*) と命名して論文投稿し、学会に認められた²⁾。*Paracoccus* は「擬球菌」、*carotinifaciens* は「カロテノイドを生産する」という意味のラテン語である。

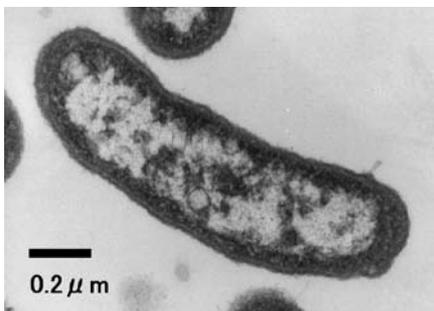


図3 E-396株の電子顕微鏡写真

3.2 培養生産性の向上

アスタキサンチン生産菌 E-396 株を土壌サンプルから発見した当時、培養液当たりのアスタキサンチン生産濃度は極めて低いものであった。化学合成品に価格で対抗するためには、培養液当たりの生産効率を大幅に改善する必要があった。発酵法において培養液当たりの生産効率を高める方法は大きく2つに分けて考えることができる。一つは菌株自体の生産活性を高める方法であり、もう一つは培養の条件を最適化する方法である。

我々は、消費者が嫌う遺伝子組換え技術ではなく、従来から発酵の世界で利用されている変異スクリーニング技術によって菌株の生産性を向上させることを試みた。菌株に化学的変異剤や紫外線などで人工的に突然変異を生じさせると、DNA 配列が変化し、その結果アスタキサンチンの生産性が変化した変異株が出現する。多くは生産性が親株より低下した変異株であるが、中には生産性が向上した変異株も存在する。その存在確率は非常に低いので、変異株の集合体からアスタキサンチン生産性の向上した変異株だけをスクリーニングする必要がある。まず、寒天培地上で濃い赤色を呈するコロニーを選抜し、次に選抜された変異株を液体培養評価、親株よりも高い生産能力を有する菌株を取得した。このような突然変異とスクリーニングを繰り返すことにより、菌株のアスタキサンチン生産性を大幅に向上させることに成功した (図4)。

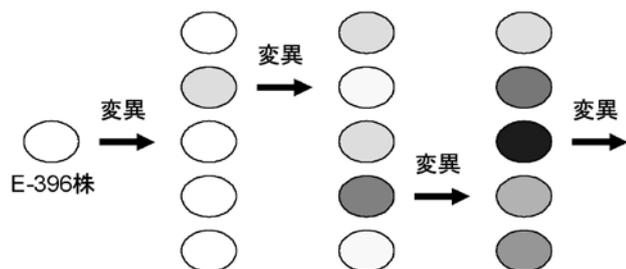


図4 菌株の生産活性改善

アスタキサンチン生産性を向上させるもう一つの方法である培養条件の最適化は、微生物が生育し、目的の化合物を生産するのに適した環境を整備することである。微生物に重要な環境因子としては、培地組成、温度、pH、通気攪拌などを挙げることができる。培地組成は微生物に必要な栄養源を過不足なく与えるために重要である。通常、バクテリアの培養に用いられる培地は、ブドウ糖などの炭素源、アンモニアなどの窒素源、リン酸塩などの無機塩類などから構成される。パラコッカス菌株が高速度で生育し、アスタキサンチンを高濃度に生産するのに適した組成の培地を構築した。温度は26 ~ 30℃、pHは7.0 ~ 7.4が最適であった。

通気攪拌は微生物に必要な酸素を供給するために重要である。5L容量の発酵槽を用いた検討から、通気量 2L/min、攪拌回転数 450rpm の条件において高いアスタキサンチン生産濃度が得られることを見出した。しかしながら、この条件では培養ごとのばらつきが極めて大きく実用的ではなかった (表1)。ばらつきの要因としては、種菌の安定性、培地殺菌による栄養成分の分解、せん断ストレス、阻害物質の生成、溶存酸素濃度など種々考えられるが、カロテノイド組成が培養バッチによって大きく変化していることから、溶存酸素濃度の不安定性が原因であると推定した。それを確かめるために、溶存酸素電極で感知しながら培養液中の溶存酸素濃度が一定になるように攪拌回転数を自動制御する培養方法を試みた。この方法を用いて飽和溶存酸素濃度を100%と表したときの溶存酸素濃度を5%、15%、20%、25%、30%および35%に制御する培養を行ったところ、溶存酸素濃度によってカロテノイド組成は大きく変化し、25%に制御したときに最も高いアスタキサンチン生産濃度を示すことが分かった (表2)。同条件で5バッチの培養を行ったところ攪拌一定の条件に比較してアスタキサンチン濃度は安定していた (表3)。この方法は培養液の溶存酸素濃度をモニターしながら行うので大型発酵槽へのスケールアップにおいても有効な方法であった。

表1 攪拌回転数 450rpm 一定の条件での5 L発酵槽培養結果 (E-396株)

| 運転番号 | 前駆体 mg/L | アスタキサンチン mg/L | 総カロテノイド mg/L |
|------|----------|---------------|--------------|
| 1 | 16.5 | 8.6 | 26.8 |
| 2 | 13.8 | 2.5 | 16.8 |
| 3 | 6.5 | 8.9 | 22.6 |
| 4 | 10.6 | 7.1 | 23.8 |
| 5 | 12.5 | 14.9 | 32.0 |

表2 5L発酵槽による溶存酸素濃度の検討結果(E-396株)

| 溶存酸素濃度 % | 前駆体 mg/L | アスタキサンチン mg/L | 総カロテノイド mg/L |
|----------|----------|---------------|--------------|
| 5 | 14.6 | 2.8 | 17.8 |
| 15 | 16.8 | 8.6 | 27.2 |
| 20 | 12.1 | 11.6 | 27.2 |
| 25 | 11.8 | 14.6 | 32.1 |
| 30 | 6.4 | 9.8 | 21.3 |
| 35 | 4.7 | 8.5 | 21.1 |

表3 溶存酸素濃度25%一定の条件での5L発酵槽培養結果(E-396株)

| 運転番号 | 前駆体 mg/L | アスタキサンチン mg/L | 総カロテノイド mg/L |
|------|----------|---------------|--------------|
| 1 | 11.5 | 15.3 | 31.2 |
| 2 | 12.8 | 13.5 | 31.1 |
| 3 | 10.9 | 11.8 | 27.2 |
| 4 | 13.2 | 12.5 | 30.0 |
| 5 | 9.9 | 13.2 | 27.8 |

上述したような変異スクリーニング技術による生産菌株の育種と培養条件の最適化を繰り返すことによりコスト的に工業化が可能なレベルまでアスタキサンチンの培養生産性を向上させることに成功した。

3.3 分離・乾燥プロセスの確立

飼料添加物として商品化するために培養液を乾燥して色素粉末にする方法を確立した。その方法は、まず培養液を加熱殺菌し、次にろ過または遠心分離により色素および菌体を濃縮、最後にドラムドライヤーまたはスプレードライヤーにより乾燥するという極めてシンプルなものである。このようなプロセスで得られたアスタキサンチン含有色素製品をパナファード (Panaferd) として商標登録した。パナファードは *Paracoccus* (生産菌の属名)、natural (天然の) および fermented (発酵させた) から成る造語である。アスタキサンチンをカロテノイド中の主成分とする養殖魚用アスタキサンチンの商品名を特に Panaferd-AX と呼ぶ。Panaferd-AX は粉末中に約2%のアスタキサンチンを含有する。

4. 商品化検討

上記のような従来技術とは異なる生産菌を用い全く新しい製法で製造したアスタキサンチン含有色素粉末を製品として世に出すためには、安全性、保存安定性、効果などを十分に検証する必要がある。

4.1 安全性

飼料添加物といえどもサケを介して最終的には人の口に

入るものである。4種の変異原性試験、急性毒性試験、ニジマスまたはラットを用いた亜慢性毒性試験、作業安全性試験、環境評価試験など種々の十分な安全性試験を実施し、いずれの試験においても毒性を示唆する徴候が認められないことを検証し、安全性を確認した。

4.2 保存安定性

製品出荷形態のミニチュア版を用い9ロットの製品について25℃における18ヶ月から最長36ヶ月の保存安定性試験を実施し、アスタキサンチンは安定的に保持されることを確認した(図5)。さらに色素製品を用いて製造した養殖サケ用飼料中の保存安定性、養殖して得られたサケ肉中の色素安定性についても問題ないことを確認した。

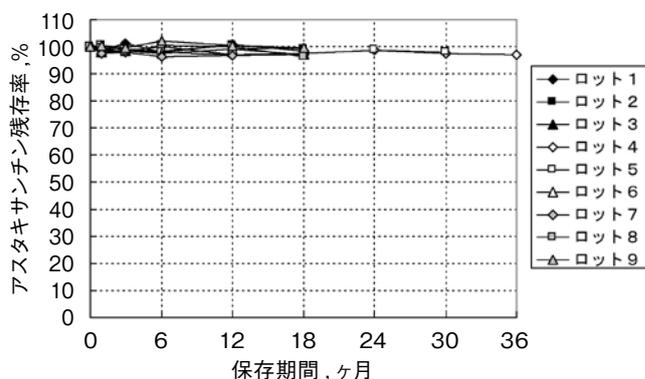


図5 製品の温度25℃、湿度60%RH保存安定性試験結果

4.3 色揚げ効果

マダイ、アトランティック・サーモン、ニジマス(別名サーモントラウト)およびギンザケを用いて水槽または海上生簀における色揚げ効果試験を実施し、従来品と何ら遜色ない十分な色揚げ効果があることを確認した。魚体成長、食餌効率などにも何ら悪影響は認められなかった。一例としてスコットランドの海上生簀で行ったアトランティック・サーモンによる効果試験の結果を図6に示した。アスタキサンチン濃度として40ppm、70ppm および100ppm になるように添加した飼料を17ヶ月間アトランティック・サーモンに与えたところ、40ppmで十分な魚肉の色揚げ効果が認められた。

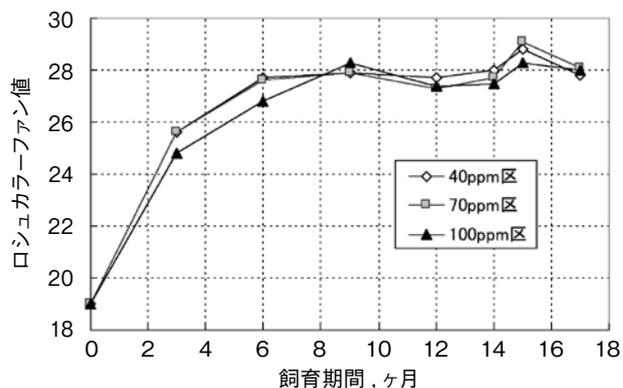


図6 アトランティック・サーモン色揚げ効果試験

5. まとめ

独自のアスタキサンチン生産微生物を発見し、変異スクリーニングによる菌株の育種と培養条件の最適化によりコスト的に工業化が可能なレベルまで生産性を向上させることに成功し、製造プロセスを完成した。安全性、保存安定性、魚に対する色揚げ効果など各種試験により色素製品が安全で優れたものであることを検証した。これらの膨大なデータを資料としてまとめ上げ、欧州委員会および米国食品医薬品局に申請し、サケ・マス用の色素飼料添加物として2008年8月には欧州の、2009年12月には米国の認可を取得するに至った。本稿の発酵技術を利用した天然のアスタキサンチンを食べて育ったサケが貴方の食卓に上がる日も近いと期待する。

－ 引用文献 －

- 1) 坪倉章、米田久、高木幹弘、清田隆；特開平7-79796
- 2) Tsubokura, A., Yoneda, H. & Mizuta, H.; *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 277-282 (1999).