

駿河湾由来のカロテノイド生産微生物の探索

環境エネルギー科 室伏敬太 井口大輔 鈴木光彰 太田良和弘*
はごろもフーズ株式会社 加藤雄成 勝亦正浩
静岡県立大学食品栄養科学部 原 清敬

Screening of carotenoid producing microorganisms from Suruga Bay

MUROFUSHI Keita, IGUCHI Daisuke, SUZUKI Mitsuaki, OHTARA Kazuhiro, KATO Takanari,
KATSUMATA Masahiro and HARA Kiyotaka

Carotenoids are commercially used for dietary supplements, cosmetics, and pharmaceuticals because of their antioxidant activity. In this study, 40 carotenoid producing microorganisms were isolated from sea sediment that had been collected from Suruga Bay in Shizuoka, Japan. One strain, SG-39, was found to be a red carotenoid astaxanthin producer, and was identified as *Xanthophyllomyces dendrorhous* by 26S rRNA gene sequence analysis. We also generated a mutant strain, SG-39-4, whose astaxanthin production was increased threefold as compared with the original strain SG-39 through random mutagenesis using the chemical mutagen ethyl-methanesulfonate (EMS). The mutant strain SG-39-4 was able to grow in liquid medium prepared from waste pasta. These results indicate that the strain SG-39-4 has the possibility of converting sugar-rich food waste to valuable carotenoid, a process is called biorefinery.

Keywords : Marine microorganism, Astaxanthin, Biorefinery

カロテノイドは抗酸化作用を有することから、健康食品や化粧品、医薬品の製造原料として使用されている。本研究では、静岡県の駿河湾からカロテノイド生産微生物40株を獲得した。SG-39株は赤色色素であるアスタキサンチンを生産することが確認され、26S rRNA領域の遺伝子配列解析の結果、赤色酵母*Xanthophyllomyces dendrorhous*と同定された。メタンスルホン酸エチル（EMS）を用いた変異導入によって、アスタキサンチン生産性が3倍向上した変異株SG-39-4の作製に成功した。SG-39-4はパスタ残渣を酵素で処理した液体培地で増殖することが確認された。本研究結果から、SG-39-4は糖質系食品残渣から付加価値の高いカロテノイドを作り出すバイオリファイナリーの可能性が示された。

キーワード：海洋微生物、アスタキサンチン、バイオリファイナリー

1 はじめに

静岡県は食品製造工場が多く立地しており、製造工程で大量に発生する食品残渣の有効活用技術開発に対する要望が強い。また、駿河湾を有する静岡県は多様で豊富な海産物資源に恵まれているため、海洋微生物に関しても日本有数の資源保有地域であると期待される。駿河湾由来微生物を活用した食品廃棄物の高付加価値化技術の開発に向けて、本研究では駿河湾から希少カロテノイドを生産する微生物

の探索、育種及び食品残渣を用いた培養の検討を行った。カロテノイドは植物や微生物などが生産する高い抗酸化作用を有する色素化合物であり、健康食品や化粧品原料等で使用されている。カロテノイドは化学合成で人工的に大量生産する技術も開発されているが、消費者の安全志向や天然素材に対するニーズから、微生物を用いた生産に対する注目が高い。特に化粧品や健康食品産業が盛んな静岡県では、微生物を用いて生産した天然カロテノイドの需要が期

* 現 環境衛生科学研究所 大気水質部

待される。

2 方法

2.1 カロテノイド生産候補微生物の分離

微生物の分離源として、駿河湾沿岸の泥試料を滅菌チューブに採取して、培養に供するまで4℃で冷蔵保管した。微生物分離用寒天培地として、市販YM培地（ベクトン・ディッキンソン社製）に、ダイゴ人工海水SP（富士フィルム和光純薬社製。以下、試薬は特に記載しないものは同社製を使用）を終濃度3.6 g/L、抗生物質クロラムフェニコールを終濃度200 µg/L、寒天を終濃度15 g/Lとなるように加えて調製した。培地滅菌は、オートクレーブ（120℃、20気圧、20分）で行った。駿河湾泥試料を微生物分離用寒天培地に塗布し、20℃で1週間培養した。赤や橙などのカロテノイド特有の呈色が確認されたコロニーをカロテノイド生産微生物として分離した（図1）。

2.2 カロテノイド生産性の評価

分離された有色微生物をYM液体培地に播種して20℃で72時間培養した。培養後にサンプリングを行い、培養液中の細胞濃度とカロテノイド分析を行った。細胞濃度測定は、紫外・可視分光光度計を使用して培養液の波長660 nmの吸光度を測定し、細胞濃度の指標とした。カロテノイド分析は、培養液1 mLを遠心分離（8,000×g、10分、4℃）にかけて、回収した微生物塊にジルコニアビーズとアセトン0.5 mLを加え、ビーズ破砕機を用いて微生物を破砕した。破砕液を再び遠心分離（8,000×g、10分、4℃）にかけて、上清を0.2 µm径のフィルターで濾過した。濾過液を表1の条件で高速液体クロマトグラフィ

ー（HPLC）分析にかけて、カロテノイドの含有量や種類を評価した。

2.3 変異導入によるカロテノイド高生産性株の開発

分離されたカロテノイド生産微生物をYM液体培地に植菌して20℃で対数増殖期になるまで振とう培養を行った。培養液を遠心分離（8,000×g、10分、4℃）にかけて、回収した微生物塊を0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で洗浄した後に、同緩衝液で懸濁させた。微生物懸濁液に遺伝子変異導入剤メタンスルホン酸エチル（EMS）を終濃度4%となるように添加して、20℃で60分間静置することで遺伝子変異を誘発させた。変異処理液を遠心分離（8,000×g、10分、4℃）にかけて、回収した微生物塊を0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で洗浄した後に、YM寒天培地に播種して20℃で1週間静置培養を行った。寒天培地上に形成したコロニーから特に呈色が強いものをカロテノイド高生産株として分離した。

2.4 食品残渣を用いたカロテノイド高生産微生物培養条件の検討

はごろもフーズ株式会社富士山パスタプラント（静岡市清水区島崎町）で採取したパスタ残渣について、全有機体炭素・全窒素計を用いて成分分析を行った。蒸留水にパスタ残渣を終濃度2～10 %となるように加え、グルコアミラーゼ（天野エンザイム株式会社製）を添加した後に50℃で24時間振とう攪拌することで糖化液を調製した。各々の糖化液をオートクレーブ（120℃、20気圧、20分）で滅菌した後に、カロテノイド高生産微生物を植菌して20℃で3日間振とう培養を行った。微生物の増殖を目視観察することで、最適なパスタ添加濃度を決定した。



図1 駿河湾由来有色微生物の分離操作

表1 カロテノイド分析用のHPLC条件

カラム	COSMOSIL Packed Column Cholster 4.6 ID×25 mm
移動相	Methanol / Tetrahydrofuran = 80 / 20 (v/v)
測定条件	流速1 ml/min、温度35℃、注入量20 µL、検出波長470 nm

3 結果及び考察

駿河湾沿岸の泥試料から40種の有色微生物SG-01～SG-40が分離された(写真1)。分離された40株のコロニー外観、YM液体培地で72時間培養した後の波長660 nmの吸光度及びカロテノイドの分析結果を表2に示す。野菜や果物中に広く存在する α -カロテンや β -カロテンを生産する微生物が多

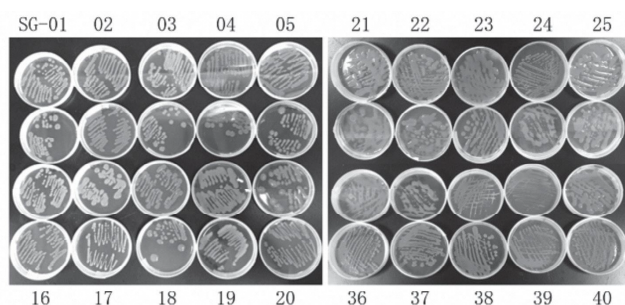


写真1 駿河湾から分離したSG-01～SG-40のコロニー外観

(写真左:SG-01～SG-20、写真右:SG-21～SG-40)

表2 駿河湾から分離された微生物の性状とカロテノイド分析結果

名前	コロニー外観		OD ₆₆₀	アスタキサンチン ($\mu\text{g/L}$)	α -カロテン ($\mu\text{g/L}$)	β -カロテン ($\mu\text{g/L}$)
	色	形状				
SG-01	橙色	潤沢	61.7	ND	25.0	725
SG-02	橙色	潤沢	63.9	ND	ND	91
SG-03	赤色	潤沢	67.3	ND	33.0	391
SG-04	橙色	潤沢	53.1	ND	ND	421
SG-05	橙色	潤沢	32.6	ND	31.0	658
SG-06	赤色	潤沢	33.0	ND	ND	309
SG-07	橙色	潤沢	25.8	ND	16.0	356
SG-08	赤色	潤沢	32.8	ND	17.0	561
SG-09	赤色	潤沢	31.1	ND	24.0	705
SG-10	赤色	潤沢	24.5	ND	29.0	319
SG-11	赤色	潤沢	39.8	ND	ND	167
SG-12	赤色	潤沢	35.6	ND	27.0	500
SG-13	橙色	潤沢	44.7	ND	33.0	589
SG-14	赤色	潤沢	48.7	ND	ND	261
SG-15	赤色	潤沢	36.8	ND	21.0	386
SG-16	赤色	潤沢	37.7	ND	ND	137
SG-17	赤色	潤沢	29.1	ND	ND	175
SG-18	赤色	潤沢	35.4	ND	20.0	424
SG-19	黄色	潤沢	26.9	ND	ND	127
SG-20	赤色	潤沢	51.0	ND	14.0	389
SG-21	赤色	潤沢	55.3	ND	17.0	445
SG-22	赤色	潤沢	26.5	ND	25.0	361
SG-23	赤色	潤沢	34.2	ND	27.0	455
SG-24	橙色	潤沢	15.8	ND	ND	160
SG-25	赤色	潤沢	32.9	ND	ND	155
SG-26	赤色	潤沢	60.6	ND	ND	173
SG-27	橙色	潤沢	62.0	ND	ND	150
SG-28	赤色	潤沢	65.3	ND	ND	173
SG-29	赤色	潤沢	58.5	ND	ND	427
SG-30	赤色	潤沢	29.3	ND	ND	199
SG-31	赤色	潤沢	33.0	ND	ND	220
SG-32	赤色	潤沢	34.9	ND	ND	212
SG-33	橙色	マット	45.9	ND	ND	297
SG-34	赤色	潤沢	39.8	ND	ND	368
SG-35	橙色	マット	30.0	ND	19.0	200
SG-36	赤色	潤沢	37.1	ND	ND	288
SG-37	赤色	潤沢	35.3	ND	12.0	284
SG-38	赤色	潤沢	38.7	ND	20.0	380
SG-39	橙色	マット	36.1	119	ND	92
SG-40	橙色	潤沢	61.2	ND	12.5	370

NDは「検出されず」の意

数を占めたが、SG-39(写真2)は化粧品原料等で使用される赤色色素アスタキサンチン¹⁾(図2)を生産する微生物であることが確認された。SG-39の26S rRNA領域の遺伝子約600塩基の配列解析を行った結果、SG-39はアスタキサンチン生産能力を有することで報告されている赤色酵母*Xanthophyllomyces dendrorhous*²⁾と配列が完全に一致し、同酵母と同定された。

アスタキサンチン生産赤色酵母SG-39にメタンスルホン酸エチル添加による変異処理を施した結果、赤色呈色の強いコロニー由来の変異株が4種獲得された。変異株の中でSG-39-4は特にアスタキサンチン生産性が高く、変異導入前のSG-39と比べて、アスタキサンチン生産性が3倍以上増加したことが確認された(図3)。SG-39-4の乾燥菌体重量当たりのアスタキサンチン生産性は0.66 mg/g-DCWであるが、赤色酵母*Xanthophyllomyces dendrorhous*の変異株として6.0 mg/g-DCWのアスタキサンチン生産性を達成し

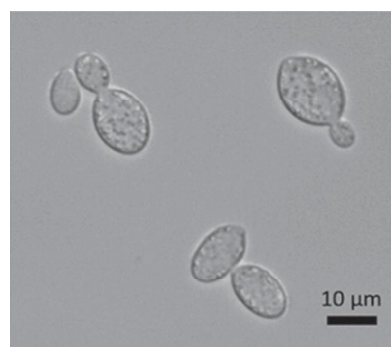


写真2 分離したSG-39の顕微鏡観察写真

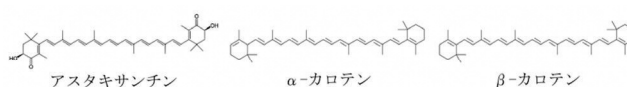


図2 各種カロテノイドの構造式

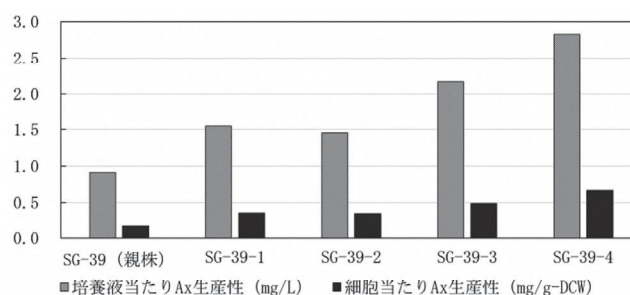


図3 SG-39及びの変異株のアスタキサンチン(Ax)生産性

た報告例も存在する³⁾。SG-39-4は駿河湾由来という特徴を有するが、産業利用に向けてアスタキサンチン生産性の更なる向上が求められる。

パスタ残渣 (写真3) の全有機体炭素濃度及び全窒素濃度を表3に示す。パスタ残渣にはデンプンとグルテンが高濃度に存在しており、炭素/窒素比が約14.7という微生物培養に適した成分組成であることが確認された。

パスタ残渣終濃度が2~10%となるように調製した糖化液でSG39-4を培養した結果を図4に示す。終濃度2~6%の糖化液についてはパスタ濃度に応じてSG-39-4の増殖に伴う赤色の呈色が増加したが、パスタ濃度8%以上の糖化液では微生物の増殖が確認されず、培養前の白濁した糖化液から外観は大きく変化しなかった。一般的に酵母はグルコース濃度が2~3%程度の培養液で良好に生育する。パスタ残渣中には約50%のデンプンが糖質として含まれているため、6%のパスタ残渣を加えて調製した糖化液がSG39-4の生育に適していたと考えられる。

本研究によって、実際の食品工場で発生する食品

残渣を用いた微生物培養で高付加価値物質アスタキサンチンの生産が可能であることが示された。食品残渣等のバイオマスを原料として燃料や化成品素材を生産するバイオリファイナリーの研究報告例はあるが、多くはエタノール⁴⁾やペプチド⁵⁾等の低分子化合物が生産対象である。本研究で生産したアスタキサンチンは化学合成が困難な高分子化合物であり、バイオリファイナリーの新たな可能性が期待される。

5 まとめ

本研究によって駿河湾由来のカロテノイド生産微生物40株が単離され、特に赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* と同定されたSG-39はアスタキサンチン生産性を有することが確認された。変異導入処理によって作製したSG-39-4は、アスタキサンチン生産性がSG-39に比べて3倍以上増加したことが確認された。SG-39-4はパスタ残渣を酵素で処理した培地で増殖することが確認され、バイオリファイナリーによる高分子化合物カロテノイドの生産可能性が示された。



写真3 試験で使用したパスタ残渣の外観

表3 パスタ残渣の炭素及び窒素含有量

炭素含有量	279 g/kg
窒素含有量	19 g/kg
C/N比 (炭素/窒素比)	14.7

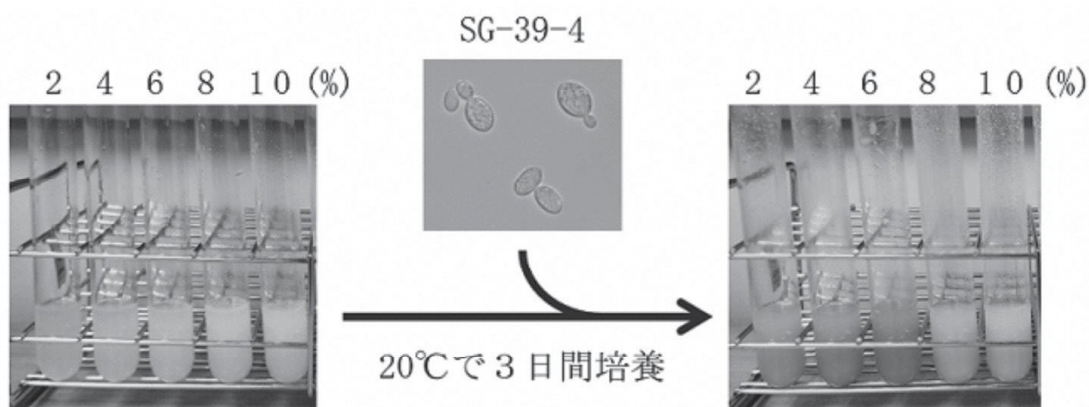


図4 パスタ濃度の異なる糖化液を用いたSG-39-4の培養

謝辞

海洋微生物の分離操作は国立研究開発法人海洋研究開発（JAMSTEC）から技術指導いただいた。

参考文献

- 1) Ranga Rao Ambati et al. : Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications – A Review. *Marine Drugs*, 12, 128–152, (2014).
- 2) Eric A. Johnson et al. : Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*, 115, 173–183, (1979).
- 3) Jeong-Hwan Kim et al. : High-Level Production

of Astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* Mutant JH1 Using Statistical Experimental Designs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (9), 1743–1748, (2005).

- 4) Daehwan Chung et al. : Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor* bescii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), 8931–8936, (2014).
- 5) Hideyo Yoshida et al. : Efficient and direct glutathione production from raw starch using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1417–1422, (2011).