

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：55502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550078

研究課題名(和文)食品廃棄物を利用したアスタキサンチンの微生物合成に関する研究

研究課題名(英文)Study on microbial synthesis of Astaxanthin using food waste

研究代表者

杉村 佳昭(SUGIMURA, YOSHIAKI)

大島商船高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：90300623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性微生物であるThrautochlorium菌 CHN-1株の培養による高度不飽和脂肪酸(PUFA)とアスタキサンチン(Atx)の同時生産について食品廃棄物を用いた振とうフラスコ培養と小型エアリフト培養で研究した。食品廃棄物としてオカラの酵素加水分解物を用いた実験から炭素源としてグルコースを始めとする六炭糖が好適であることが分かった。また、オカラ以外にも米糠、酒粕、果汁絞り粕等の食品廃棄物も有効であることが分かった。カロテノイド中のAtx分量は培養中の酸素供給量に比例した結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The one-pot production of highly unsaturated fatty acid (PUFA) and astaxanthin (Atx) from the culture of a marine microorganism, Thrautochlorium sp. CHN-1 on food wastes with a reciprocating shaker or an small external loop airlift bubble column reactor were investigated. It was found that hexose such as glucose in Okara-enzyme hydrolysates have the great potential as a fermentation carbon substrates. A rice bran, Sake lees, and squeezed residues of fruit juices, as well as Okara hydrolysates, were also found to be available for the present one-pot production. A high content of Atx in the carotenoids was obtained under forced-air culture conditions.

研究分野：生物反応工学

キーワード：アスタキサンチン 食品廃棄物

1. 研究開始当初の背景

赤色素のアスタキサンチン (Atx) は酸化性の強さから医療等多方面に応用可能な新素材として有用である。大量消費される飼料用途では現在化学合成品が利用されているが、食品連鎖の医学的見地から天然型 Atx の利用が望ましい。天然 Atx は淡水産緑藻や赤色酵母の培養で得られるが、細胞壁の強固さから最近では細胞壁の脆弱なバクテリアによる Atx の生産研究が盛んである。中でも海水から分離された *Thrautochytrium* 菌の CHN-1 株は DHA 等の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) だけを生産するラビリンチュラ類に属しているが、PUFA に加えて Atx をも生産する特異的な微生物で、Atx による養殖海洋魚の色付けのみならず PUFA による骨格強化効果をも併せ持つ養殖海洋魚用の飼料生産への応用が期待される。しかし、CHN-1 株発見者の山岡到保博士が産総研を定年退職されて以来、本菌の研究は途絶えたままであり、山岡氏から与かっていた菌株をもとに PUFA と Atx の同時生産についての研究を再開した。

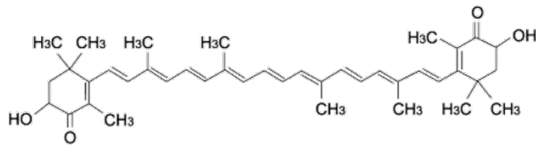


図1 アスタキサンチン (Atx)

2. 研究の目的

近年、海洋魚・淡水魚を問わず漁獲量減少により魚類の養殖の重要性が高まっている。養殖魚用の飼料成分として PUFA は幼稚魚の骨格形成に、Atx は成魚の色揚げや奇形抑制に著効が認められている。それら PUFA と Atx とを同時に生産できる *Thrautochytrium* 菌 CHN-1 株の基質 (炭素源) として食品廃棄物を用いて PUFA と Atx の大量生産を可能とする培養法を見出すのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

以前の委託研究「バイオマスからの高付加価値製品の実用化開発研究」(平成18年度地域中小企業支援型研究開発事業)で Atx の生成には好気培養が必須であることが判明しており、基質の炭素源にはオカラの酵素分解物を用いて、小型振とう培養器 (フラスコ培養) を用いた基礎的研究、と、青色 LED 照射エアリフト型ファーメンター (エアリフト培養) を用いた実用化研究、を併行して行った。

オカラ以外の食品廃棄物の炭素源としての探索は、小型振とう培養器 (フラスコ培養) で行った。

4. 研究成果

(1) 本研究ではまず、年間100万トンが廃棄処分されているオカラに着目した。その分解液中の糖の主成分はグルコース (Glu)、ガラクトース (Gal)、キシロース (Xyl)、アラビ

ノース (Ara) となる。これらの4つの糖が本菌体の栄養源となるのかを検討するため、それぞれの糖を含む培地を用いて培養した。図2に培養4日後の各糖の消費を示した。Gluの消費量が最も高く、次いでGalとAraが同程度の消費率で、Xylの消費量が最も低かった。また図3に菌体の増殖挙動、図4に各カロテノイド生産量を示した。図3、図4より、GluとGalを炭素源としたときが良好な結果が得られた。よって、AraやXylなどの五炭糖よりも、GluやGalなどの六炭糖の方が本菌体のカロテノイド生成に適していることが分かった。

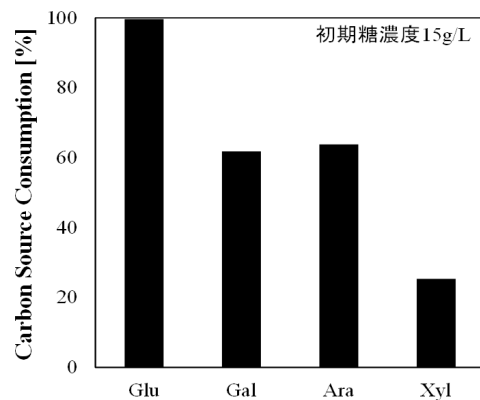


図2 培養における各糖の消費

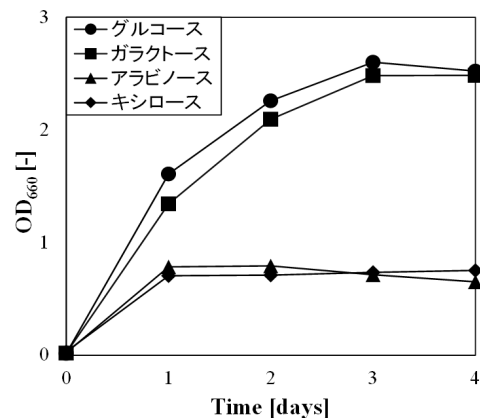


図3 菌体の増殖挙動

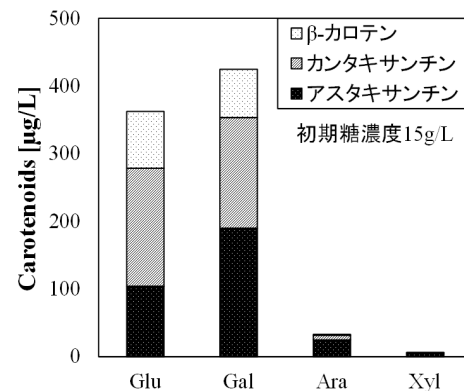


図4 カロテノイド生成量

(2) 食品廃棄物の中には複数の糖が混合していると考えられるため、混合糖の資化性について検討した。(1)の結果から、カロテノイド生成量が多く、最も消費量の高かった炭素限のGluをベースにした。また、オカラ中の糖組成 (Glu 51.1%, Gal 20.1%, Xyl 14.4%, Ara 9.5%, その他 4.9%) となるように混合した調整培地も利用した。図5に培養4日後の各糖の消費、図6に菌体の増殖挙動を示した。どの場合の大部分の糖が消費されたことから、五炭糖がGluの資化を阻害する傾向は見られなかった。また図7にカロテノイド生産量を示した。Gluのみを炭素源とするよりも他の糖と混合の方が、カロテノイド生産量が向上することが分かった。特に、AraやXylなどの五炭糖を単独で炭素源とした場合はカロテノイド生産があまり行われなかったが、Gluと混合するとカロテノイド生産が飛躍的に向上した。(1)の結果より、オカラのようにGluとGalを多く含む食品廃棄物が本菌体の炭素源として適していると考えたが、調整培地における培養でカロテノイド生産量は、Glu+Galと同程度でGlu単独の場合よりも微増するにとどまった。一方で、Glu+AraやGlu+Xylでは大きく増大したことから、混合糖の場合、五炭糖が含まれていた方がカロテノイド生産を向上させるのではないかと考えられる。このことから、本菌体に食品廃棄物を利用することが可能であることが示唆された。

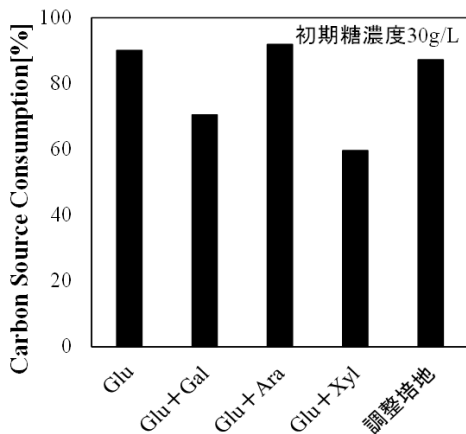


図5 培養における各糖の消費

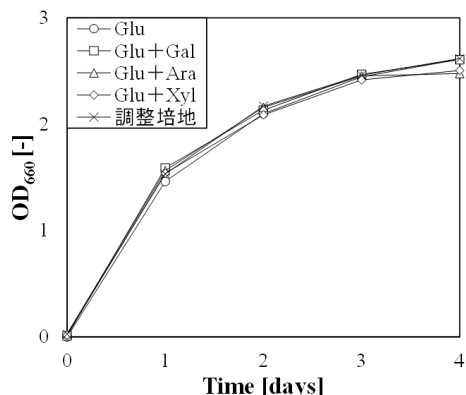


図6 菌体の増殖率

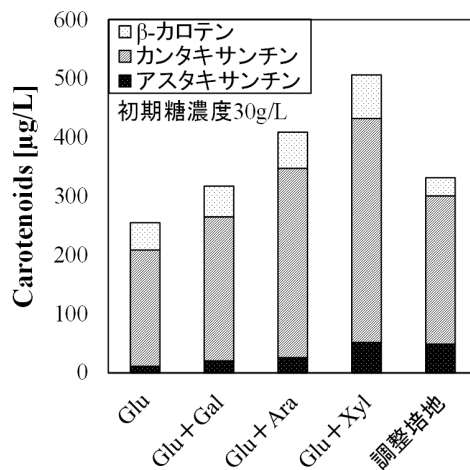


図7 カロテノイド生産量

(3) Gluを炭素源としたフラスコ培養、エアリフト培養の比較を行った。図8より、菌体菌体の増殖とカロテノイド生成挙動は異なることが確認でき、菌体増殖後に、カロテノイドが生成されることが示唆された。糖濃度はカロテノイド生産、菌体増殖に伴い、減少した。

図9より、フラスコ培養とエアリフト培養のカロテノイド生成濃度を比較すると、大きな差は出なかったが、総カロテノイド生産量はエアリフト培養の方が9.4倍となり、スケールアップによる生産量の増加が確認できた(図10)。

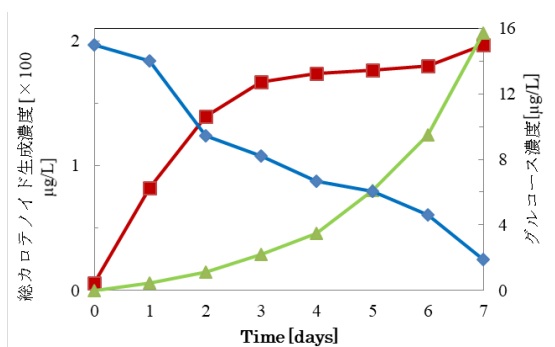


図8 菌体増殖とカロテノイド生成の経時変化

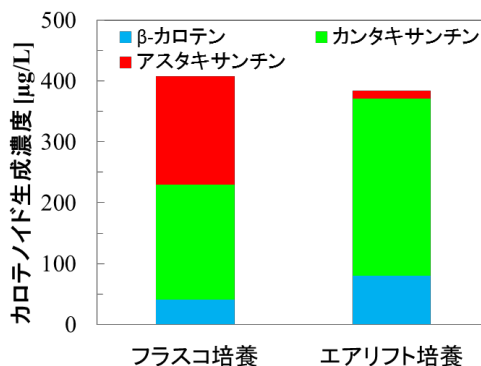


図9 Glu培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較(生成濃度基準)

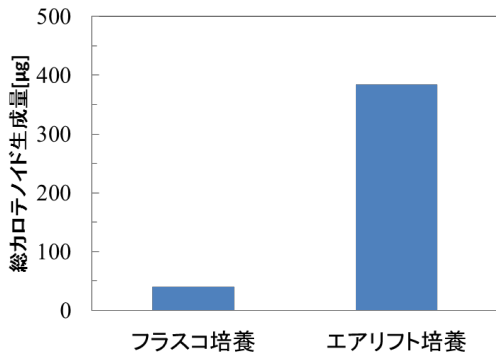


図 10 Glu 培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較 (生産量基準)

(4) オカラ培地を用いたフラスコ培養、エアリフト培養比較を行った (図 11)。生成濃度はフラスコ濃度の方が 1.9 倍高くなった。しかしながら、総カロテノイド生産量はエアリフト培養の方が 3.8 倍高くなった (図 12)。Glu 培地でのエアリフト培養と比較するとスケールアップの効果が低くなったが、これは培地中に浮遊しているオカラ未分解物が培養に影響することが考えられる。

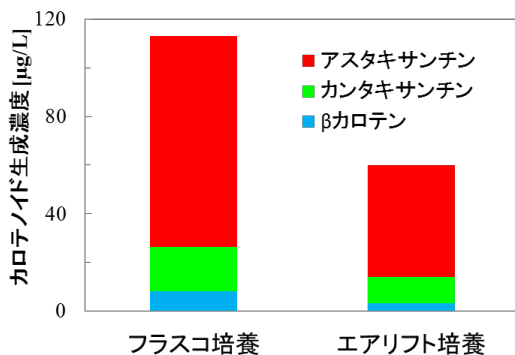


図 11 オカラ培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較 (生成濃度基準)

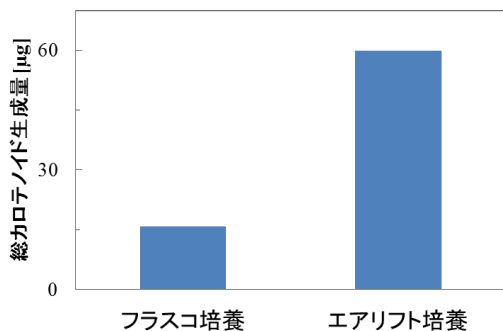


図 12 オカラ培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較 (生産量基準)

(5) (4)の結果より、培地中に浮遊しているオカラ未分解物が培養に影響をしていることから、固液分離したオカラ培地でのフラスコ培養、エアリフト培養の比較を行った (図 13)。フラスコ培養とエアリフト培養のカロテノイド生成濃度を比較すると、フラスコ濃度の方が 2.9 倍高くなった。しかしながら、総カロテノイド生産量はエアリフト培養の

方が 2.5 倍高くなった (図 14)。これは固液分離したにも関わらずエアリフト底部に菌体とオカラ成分が凝集し、反応効率を低下しているものと考えられる。今後、エアリフト気泡塔の改良などの反応装置を設計し直す必要が考えられる。

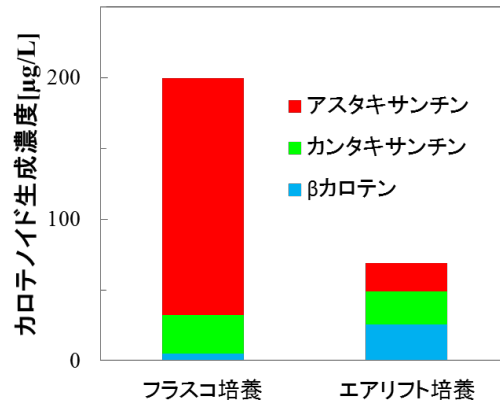


図 13 固液分離したオカラ培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較 (生成濃度基準)

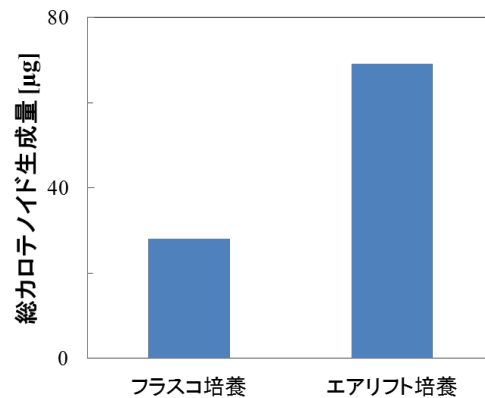


図 14 固液分離したオカラ培地を用いたフラスコ培養とエアリフト培養の比較 (生産量基準)

(6) Glu 培地とオカラ培地での培養を比較するにあたって、初期糖濃度などが異なるため、得られたカロテノイド量で直接比較するのではなく次式の生産物収率で比較した。

$$\text{生産物収率 [g-catotenoid/g-sugar]} = (\text{生産されたカロテノイド量 [g]} / (\text{消費された糖 [g]}))$$

図 15 より、オカラ培地の方が高い生成物収率が得られたことから、カロテノイド生産においてオカラは栄養源として有効であることが分かった。

また Glu 培地での培養では DHA をはじめとする PUFA の生産が確認できたが、オカラ培地での培養では PUFA の生産は確認できなかった。これは培地組成により生合成経路が異なることが原因と考えられるので、オカラ培地では PUFA が生成されない代わりにカロテノイドが多く生成される可能性が示唆される。

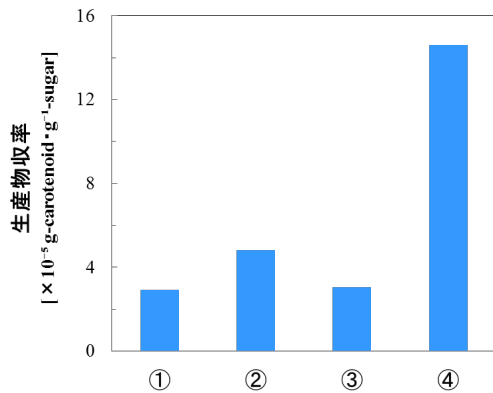


図 15 生産物収率での比較 (Glu 培地を用いたエアリフト培養、 オカラ培地を用いたエアリフト培養、 Glu 培地を用いたフラスコ培養、 オカラ培地を用いたフラスコ培養)

(7) さらに食品廃棄物の炭素源として、オカラの他に、米糠 酒粕、かまぼこ、ミカン糖蜜 (シトラスモラセス、日本果実工業(株)製)、ミカンの皮 (シトラスパルプ、日本果実工業(株)製) 果物ジュース、食品残渣粉末 (アースキリエイティブ製)、海藻 (ワカメ、コンブ) を入手し、フラスコ培養を行った (特記がないものは市販製品を使用した)。米糠、ミカン糖蜜、ミカンの皮、果実ジュースで糖の消費やカロテノイド生産性が見られた一方、海藻など見られないものもあった。しかしながら、菌体による糖分解によるものか、ミカンの皮などにもともと付着していた β -カロテンや β -クリプトキサンチン等の代謝によるものかは現時点で断定することができなかったため、引き続き検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

小林哲也, 真崎史章, 通阪栄一, 杉村佳昭, 福永公寿, ラビリンチュラによる生理活性物質の生産における培養条件の検討, 化学工学会第 80 年会, 2015 年 3 月 19 日, 芝浦工業大学 (東京都江東区)

山崎修輔, 通阪栄一, 杉村佳昭, 福永公寿, 海洋微生物による食品廃棄物からのアスタキサンチン生産, 日本海水学会若手会若手会創立 10 周年記念第 8 回学生研究発表会, 2017 年 3 月 3 日, 海峡メッセ下関 (山口県下関市)

〔その他〕(計 3 件)

真崎史章, 海洋性微生物を用いた効率的アスタキサンチン生産法の開発, 山口大学大学院理工学研究科平成 26 年度修士学位論文, 2015

小林哲也, ラビリンチュラによる生理活性物質の生産における培養条件の検

討, 山口大学大学院理工学研究科平成 27 年度修士学位論文, 2016

山崎修輔, 食品廃棄物を原料とした生理活性物質の微生物生産に関する研究, 山口大学大学院工学部平成 28 年度学位論文, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉村 佳昭 (SUGIMURA, Yoshiaki)

大島商船高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号: 9 0 3 0 0 6 2 3

(2) 研究分担者

古本 啓二 (FURUMOTO, Keiji)

大島商船高等専門学校・商船学科・教授

研究者番号: 9 0 1 4 9 9 7 2

(3) 連携研究者

通阪 栄一 (TORISAKA Eiichi)

山口大学大学院・創成科学研究科・化学系専攻・准教授

研究者番号: 4 0 3 6 3 5 4 3

福永 公寿 (FUKUNAGA Kimitoshi)

山口大学大学院・理工学研究科・環境共生系専攻・元教授

研究者番号: 4 0 3 5 5 0 6 9

(4) 研究協力者

真崎 史章 (MASAKI Fumiaki)

山口大学大学院・理工学研究科・環境共生系専攻

小林 哲也 (KOBAYASHI Tetsuya)

山口大学大学院・理工学研究科・環境共生系専攻

山崎 修輔 (YAMASAKI Syusuke)

山口大学・工学部・循環環境工学科