

化学的突然変異によるアスタキサンチン高生産酵母の開発

梅原 泰男*，大坪 雅史，宮崎 俊一，澤谷 拓治

Mutation of Astaxanthin Accumulated Yeasts by Chemical Mutagens

Yasuo Umehara*, Masashi Otsubo, Syun-ichi Miyazaki and Takuji Sawaya

要 旨

菌体内にアスタキサンチンを蓄積するファフィア属酵母 (*Phaffia rhodozyma* IFO 10129) に、化学的変異原物質であるニトロソグアニジン (NTG) あるいはアンチマイシン A (ANT) を作用させた結果、アスタキサンチン生産量の増加した7種の突然変異株を得た。これら7種の変異株のうち、NTG、ANT、そしてNTGの順に3回の変異を行った変異株 (NAN) のアスタキサンチン生産量は450 μ g/g 乾燥酵母と最も高く、*P. rhodozyma* の約3.8倍であった。さらに、この変異株のアスタキサンチン生産量におよぼす培養液の pH や培養温度の影響、企業化を目的としたジャーフェンターでの培養試験についても検討した。

1. 緒言

アスタキサンチン (3,3'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン) はカロテノイド系色素の代表的な化合物であり、タイ、サケ、エビ、カニ等の魚介類の赤色色素の主要な成分である。現在、オキアミから分離・抽出したアスタキサンチンを飼料に添加し、タイの養殖における色上げ剤として利用している。アスタキサンチンは、抗酸化作用、膀胱癌の発生抑制、あるいは免疫賦活効果などの種々の生理活性を有することが明らかにされつつある¹⁾。従って、食品などの着色料や酸化防止剤としてのみならず、化粧品や健康食品などへの応用も期待されている²⁾。このような生理作用に注目した健康食品として、アスタキサンチンを蓄積した酵母の粉末を鶏の飼料に添加し、鶏卵の黄身に移行させようとする試験が行なわれている。さらに、アスタキサンチン生合成遺伝子を利用した効率的な生物生産のための研究もなされている³⁾。

本研究は、アスタキサンチンを工業的に生産することを目的に、菌体内にアスタキサンチンを蓄積するファフィア属酵母 (*P. rhodozyma*) に、ニトロソグアニジン (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, NTG) あるいはアンチマイシン A (ANT) を作用させて突然変異を生じさせ、アスタキサンチンの生産量が増加した変異株を得ることを目的に進めた。

2. 実験方法

試薬 標品としてのアスタキサンチンは、養殖用飼料 (日本ロシユ) から抽出し、カラムクロマトグラフィーで精製した。ニトロソグアニジンおよびアンチマイシン A は Sigma 社、酵母培養用の培地成分は Difco 社製を用いた。

ファフィアの培養 アスタキサンチン生産酵母としてファフィア (*P. rhodozyma* IFO 10129) を入手し、3 ml の YM 培地 (0.3% 酵母エキス, 0.3% 麦芽エキス, 0.5% ペプトン, 1.0% グル

* 日本化学飼料 (株)

コース)で22℃, 16時間前培養後, 同様の条件で本培養した。

変異処理 NTGによる変異処理は, *P. rhodozyma* の本培養液 0.5 mlにNTGを50μg/mlとなるように加え, 室温で15~20秒間攪拌後, 20分静置して行った。遠心分離で得られた菌体を1 mlのYM培地で3回洗浄後, 0.5mlのYM培地にけん濁し, 3 mlのYM培地で22℃, 16時間培養した。これの30μlをYMプレート (0.3%酵母エキス, 0.3%麦芽エキス, 0.5%ペプトン, 1.0%グルコース, 1.5%寒天) に塗布し, 22℃で7日間培養した。ANTによる変異処理は, *P. rhodozyma* の本培養液を50 μMのANTを含むYMプレートに塗布し, 22℃で4~6週間培養して行った。何れの変異処理においても, 橙赤色が変異処理前よりも濃くなったコロニーを選抜した。

アスタキサンチンの抽出と定量 *P. rhodozyma* あるいは変異株を5 mlのYM培地に接種して22℃で16時間前培養後, 100mlのYM培地に移植して22℃で4~5日間培養した。3,000rpm, 5分の遠心分離で集菌後洗浄し, ガラスビーズ破碎 (30秒, ビーズサイズ: 0.40mmφ, KAISER, B. Braun社) を3回行った。50mlのアセトンでアスタキサンチンを抽出後, 10mlのn-ヘキサンに転溶し, HPLCで定量した。分析条件; 本体: TOSOH SC-8020 (東ソー(株)), 検出器: TOSOH UV-8000 (東ソー(株)), 検出波長: 470 nm, カラム: TSK gel Silica-60(4.6mm ID x 250mm), 移動相: アセトン/n-ヘキサン (35:65で15分, 5分間で100:0にグラジエント, 20分間で35:65にグラジエント), アスタキサンチンAの保持時間: 25分。

ジャーファーマンターでの培養試験 変異株, NAN株の前培養液を10 lのYM培地に接種し, ジャーファーマンター (TS NW-20型, 高杉製作所(株)) で培養した。培養条件; 温度: 20℃, 空気: 10 l/min, 攪拌速度: 120 rpm, pH: 6.0。

3. 実験結果および考察

突然変異を起こさせる方法として, 紫外線照射や化学物質によるのが一般的である。そこで, 化学的変異原物質であるNTGあるいはANTによる変異を試みた。*P. rhodozyma* IFO 10129

のアスタキサンチン生産量は120μg/g乾燥酵母であった。これのNTGあるいはANTによる変異処理によって計7種の変異株 (N, N2, NA, N3, N2A, NAN, NA2) を得, この変異処理手順を図1に示した。

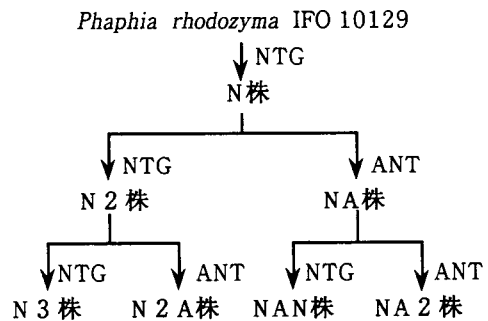


図1 酵母の変異処理手順

NTG: ニトロソグアニジン

ANT: アンチマイシンA

表1 変異株におけるアスタキサンチン生産量

変異株	アスタキサンチン生産量 (μg/g乾燥酵母)
N	210
N2	300
NA	310
N3	370
N2A	340
NAN	450
NA2	350

変異株のアスタキサンチン生産量を表1に示した。最初に行ったNTG処理によって得た変異株, N株のアスタキサンチン生産量は保存株の約1.8倍の210μg/g乾燥酵母であった。この変異株をさらにNTGあるいはANTで処理した変異株, N2あるいはNA株のアスタキサンチン生産量は各々300あるいは310μg/g乾燥酵母とほぼ同様であり, 保存株の約2.5倍に向上した。これらをさらに変異処理して4種の変異株を得た。これらのアスタキサンチン生産量はさらに増加したが, アスタキサンチン生産量は変異株によって異なり, NAN株が450μg/g乾燥酵母と最も高い値であった。従って, *P. rhodozyma* に比べ約3.8倍のアスタキサンチンを生産する変異株を得た。化学的変異原の種類あるいはそれらの処理の順序に関して, 2回目の変異処理では変異株, N2とNA株のア

スタキサンチン生産量にほとんど差がなかったが、3回目の変異処理を行った4種の変異株で大きく異なった。ニトロソグアニジンは強力なアルキル化剤、そしてアンチマイシンAは抗生物質である。これらの変異原物質のファフィアのDNAへの作用部位を特定していないため、3回の突然変異処理で得た4種の変異株のアスタキサンチン生産量が異なる理由は不明である。

アスタキサンチン生産量におよぼす培養条件の影響について検討した結果、表2のようになった。培養液のpHが5, 6, そして7の3点について検討した結果よりpH6が、そして、培養温度は20℃付近、ここでは22℃が適切であった。また、添加する糖については、グルコースをシュクロースに変えたが、アスタキサンチン生産量にはほとんど影響がなかった(データは示していない)。

表2 NAN株のアスタキサンチン生産量におよぼす培養条件の影響

1) 培養液のpH

pH	5	6	7
アスタキサンチン (μ g/g 乾燥酵母)	380	450	350

2) 培養温度

温度(℃)	15	20	22	28
アスタキサンチン (μ g/g 乾燥酵母)	390	440	450	180

企業化を目的に、ジャーフェーマンターを用いてアスタキサンチン生産量が最も高かった変異株、NAN株の10ℓスケールでの培養試験を行った。アスタキサンチン生産量は440 μ g/g 乾燥酵母であり、100 mlスケールのフラスコでの培養結果とほぼ同様であった。このときのアスタキサンチンの収量は24.2 mgであり、企業化スケールでの変異株の培養やアスタキサンチンの製造が可能になるものと考えられた。

4. 結論

NTGとANTの化学的変異原物質による突然変異処理を繰り返すことによって、アスタキサンチン生産量の高い変異株、NAN株を得た。さらに、この変異株のアスタキサンチン生産量におよぼす至適培養条件について検討した結果、培養液のpHは6、培養温度は22℃であった。この至適培養条件下でのNAN株のアスタキサンチン生産量は450 μ g/g 乾燥酵母であり、*P. rhodozyma*の約3.8倍に向上した。

また、データは示していないが、この変異株の増殖をOD₆₆₀の濁度で調べたところ、*P. rhodozyma*とほとんど差がなかった。さらに、ジャーフェーマンターでの10ℓ培養でもアスタキサンチン生産量は440 μ g/g 乾燥酵母であり、計24.2 mgのアスタキサンチンが生産された。

以上の結果、工業的にアスタキサンチンを生産するための有望な酵母の開発と、この酵母の培養試験がなされた。

引用文献

- 1) 松野隆男, 幹渉, 化学と生物, 28巻, 4号 (1990), P 219~227
- 2) 山下英次, 食品と開発, 27巻, 3号 (1992), P 38~40
- 3) 三沢典彦, 蛋白質 核酸 酵素, 41巻, 4号 (1996), P 337~346
三沢典彦, Foods Food Ingredients J. Jpn., 169巻 (1996), P 90~94