

(JX日鉱日石エネルギー株式会社 化学品本部化学品総括部) 坪倉 章

アスタキサンチンは赤色のカロテノイドであり、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使用されている。天然のサケはアスタキサンチンを含むオキアミやエビを摂取することにより、筋肉中にアスタキサンチン、他のカロテノイドを蓄積し、鮮やかなサーモンピンクを呈する。一方、養殖では人工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。養殖魚飼料用アスタキサンチンとして化学合成品が主流であるが、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っている。

また、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1000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。

商品開発の経緯

当社がバイオテクノロジー事業に参入するきっかけは、1960年代に石油タンパクの開発研究に取り組み始めたことにあった。結局、事業化には至らなかったが、研究の過程で発酵生産技術が蓄積された。この技術を生かし、1991年に発酵法によるビタミンB₁₂の商業化に成功したが、それにつづく発酵製品としてターゲットとなったのが、アスタキサンチンであった。

生産菌の分離

アスタキサンチンの製造は化学合成法の他に酵母(ファフィア)や藻類(ヘマトコッカス)などが知られていたが、経済的には化学合成品に対抗できるレベルになかった。そこで、製造コストダウンの可能性を秘めたバクテリアにターゲットを定め、新規な菌株を探索するところから研究を開始した。新菌株を取得する際の常套手段として土壤中より分離することを試みた。国内各地のさまざまな環境から集めた多くの土壤サンプルより、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バクテリアE-396株を取得することができた¹⁾。赤色のTLCスポットが試薬のアスタキサンチンと同じRf値を示した時の感動は今でも鮮明に憶えている。解析の結

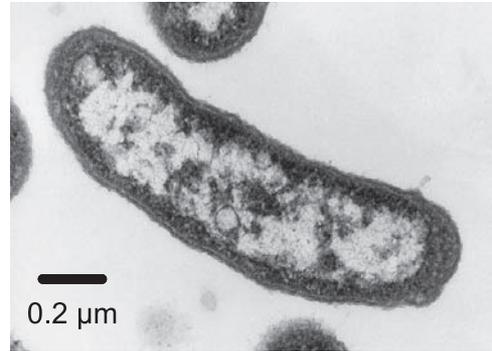


図1. E-396株の電子顕微鏡写真

果、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(図1)。Paracoccus carotinifaciensという学名で学会に認められた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。

生産性の向上

アスタキサンチン生産菌E-396株を土壤サンプルから発見した当時、培養液中のアスタキサンチン生産濃度はきわ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二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。

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。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することで親株よりも高い生産能力を有する菌株を選別した。このような突然変異と選別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ができた。

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事ができる。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。生産菌株が速く生育し、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。また、本菌はアスタキサンチンおよびその前駆体となるカロテノイドを生成するが、当初は各カロテノイドの生成比率が培養バッチごとに大きくばらつき、とても商業生産するレベルにはなかった。その原因が、培養液中の溶存酸素濃度によることを突き止め、溶存酸素濃度を厳密に制御する培養方法を構築することができた。上述したような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ができた。

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、ろ過または遠心分離により色素および菌体を濃縮後、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きわ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 とした。Panaferd-AX は粉末中に約2%のアスタキサンチンを含有する。

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まった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。飼料添加物といえどもサケの肉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。また、25°Cにおける最長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。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

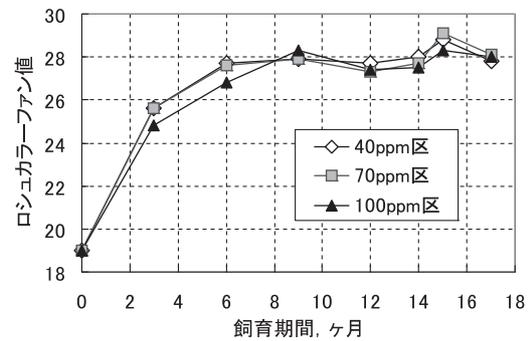


図2. アトランティック・サーモン色揚げ効果試験

殖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。

マダイ、アトランティック・サーモン、ニジマス (別名トラウトサーモン) 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示した (図2)。アスタキサンチン濃度として40 ppm, 70 ppm および100 ppm 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、40 ppm で十分な魚肉の色揚げ効果が認められた。

まとめ

独自のアスタキサンチン生産微生物を発見し、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、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、2009年12月には米国の認可を取得することができた。2010年から欧州において本格的な委託生産を開始する予定である。近い将来、Panaferd-AX を食べて育ったサケが世界中の食卓を彩ることを夢見ている。

- 1) 特許3242531
- 2) Tsubokura, A. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 277 (1999).