

## 高機能カロテノイド色素 thermozeaxanthin の高度好熱菌 *Thermus thermophilus* による効率的生産法の開発と活用法の検討

返町 洋祐

(筑波大学 生命環境学群 生物資源学類)

### 1.背景・目的

カロテノイドは天然に広く存在する色素であり、基本構造として $C_{40}H_{56}$ を持つ化合物と、その誘導体の総称である。二重結合に富むものは高い抗酸化作用を示し、健康食品などへの利用も数多く行われている。また、熱に対して比較的安定なため、加工食品の着色などにも利用されている。カボチャやニンジンに含まれる $\beta$ -カロテン(Fig. 1)はその代表格であり、抗酸化作用のほか、ビタミンAの原料として生体にとって非常に重要な化合物である。カロテノイドは、水などの極性溶媒にはほとんど溶けず、非極性溶媒によく溶ける。そのため、一般的には脂肪などと共に食べるのが好ましいとされている。しかしながら、水溶性であったほうが、栄養摂取には効率的であり、また加工食品に対して利用する際にも溶媒の面で有利であるため、分子の極性の高いカロテノイドが望まれている。

*Thermus thermophilus* (サーマス サーモフィラス) の生産する thermozeaxanthin (サーモゼアキサンチン) (Fig. 2) は、前述の要請に応える高極性のカロテノイドである。(A. Yokoyama, 1995) *T. thermophilus* は最適生育温度が $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ の高度好熱菌であり、著量の色素を細胞内に蓄積する。一般的な微生物の限界生育温度は $50^{\circ}\text{C}$ 付近であるため、*T. thermophilus* の培養系は基本的に雑菌汚染の懸念が無い。通常微生物による物質生産において、雑菌汚染の防止に多大な労力が払われていることとは対照的である。また、好熱菌由来の色素であるため、通常カロテノイドよりも熱に対してさらに安定である。高い水溶性と熱安定性により、カロテノイド系色素の一層の用途拡大を図ることができる。しかし、*T. thermophilus* は、既存の大量培養装置での培養が困難であるため、現状では色素の大量生産は難しい。また、それゆえ利用可能性が指摘されつつも、実際的な検討はほとんど為されていない。

本研究では、 thermozeaxanthin の *T. thermophilus* による生産系の構築を第一の目的とした。それと共に、そこから得られた色素の熱安定性や水溶性を測定し、応用方法を検討した。さらに、実際に食品の製造へ利用し、 thermozeaxanthin とカロテンの比較を行う。

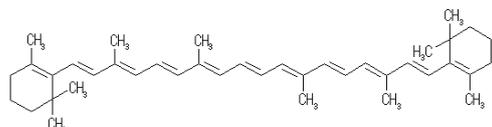


Fig. 1  $\beta$ -カロテン

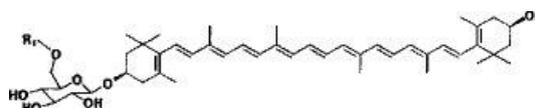


Fig. 2 サーモゼアキサンチン

## 2.方法と結果

### 2.1. 微生物培養一色素抽出ハイブリッド装置の製作

本研究で利用する *T. thermophilus* の培養の最大の特徴は、その温度の高さにある。最適温度である 70~80℃においては、24 時間以内に限界まで菌数が増加し、培養工程を終えることができる。この温度は、thermozeaxanthin の抽出に多用されるメタノールの沸点よりも多少高い値である。そこで、培養液の熱を利用することにより色素抽出と培養を並行する装置を考案した。抽出と培養を並行する利点としては、次の 2 点がある。一つは、加熱工程をまとめることによる熱効率の改善である。もう一つは、抽出工程の簡便化である。一般的に、抽出を短時間で完了させようとした場合、菌体の破碎操作が必要である。この操作には超音波やフレンチプレスなどが使用されるが、専用の装置や容器を用いるため、煩雑で非効率的である。それに対し、本装置では菌体を抽出器に移し、培養終了まで抽出操作を継続すればよい。培養工程の熱を利用することで、抽出時間の制約を事実上無くし、ステップ数を減らすのである。

Fig. 3 に本装置の構造を模式的に示す。培養液には、一般的に *T. thermophilus* へ適用されている TM 培地を利用した。培養は 70℃で 24 時間行った。適宜培養液をサンプリングし、菌数の増加がほぼ終わった時点で培養を終了した。菌体を回収して抽出器に移すと共に、新しい培地を用意し、準備が整い次第、培養と抽出を再び開始した。

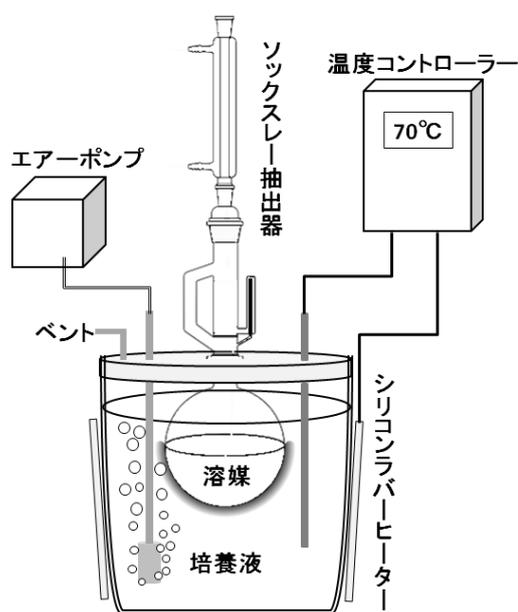


Fig. 3 培養・抽出装置の模式図

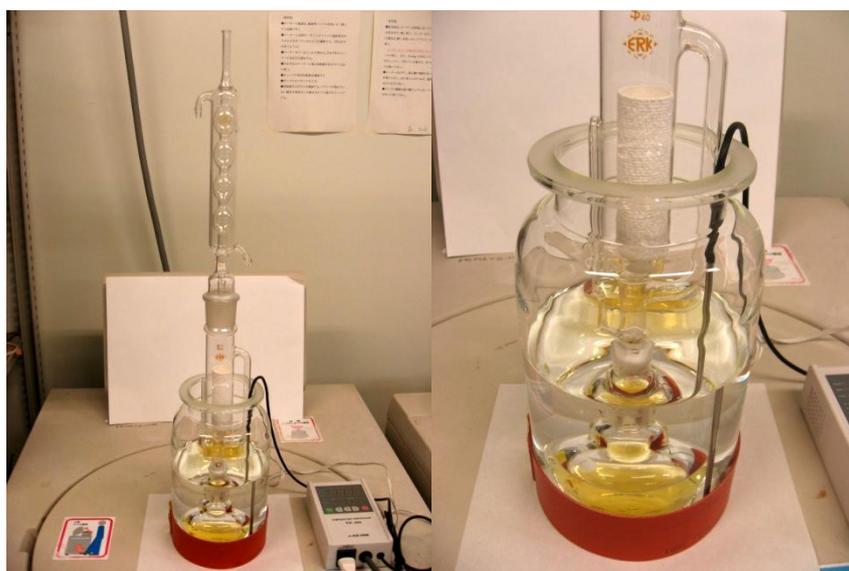


Fig. 4 培養・抽出装置の写真

## 2.2. 培養および色素の濃縮

### 2.2.1. 培養条件

菌株： *Thermus thermophilus*

培地： TM 液体培地

…ポリペプトン 4 g / L

酵母エキス 2 g / L

NaCl 1 g / L

Castenholz 塩類溶液 10 v/v%

培地量： 500 ml

培養形式： 通気攪拌

通気量： 1.5 L / min

液温： 70°C

培養時間： 24 時間



Fig. 5 菌体と培養液の写真

### 2.2.2. 色素の濃縮

ソックスレーの溶媒フラスコに集められた色素メタノール溶液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターを用いてメタノールを除去した。粗抽出物の培養液に対する収量は 2.2 g/L であった。

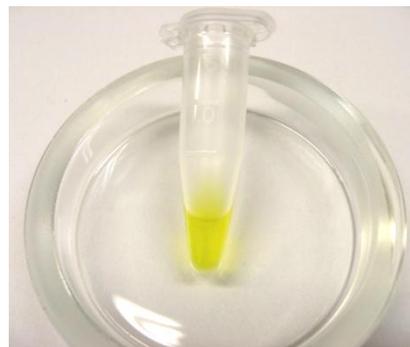


Fig. 6 抽出した色素

## 2.3. 色素の分析

### 2.3.1. 分光分析

得られた色素のメタノール中での吸光スペクトルをスペクトロフォトメーターで測定した。カロテノイド色素の特徴である、470 nm に極大吸収を有する単一ピークが得られた。このことから、得られた色素はほぼ純粋な thermozeaxanthin であることが示された。

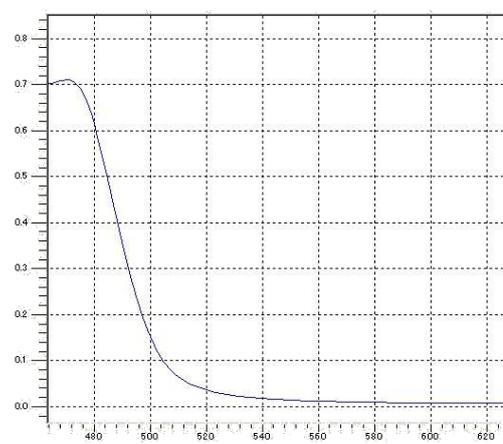


Fig. 7 Thermozeaxanthin の吸光スペクトル

### 2.3.2.ニンジン由来のβ-カロテンとの比較

熱安定性に関して、180℃における分解速度の測定を行った。Thermozaxanthin とβ-カロテンをそれぞれ4本の試験管に等量ずつ分取し、溶媒を揮発させて色素のみの状態とした。加熱を開始してから0, 30, 60, 90分で各1本ずつ冷却し、溶媒を同量加えて再溶解させた。このときの470 nmにおける吸光度を測定し、その値をそれぞれの試料の0分時点での値と比較することで、分解率を求めた。

その結果、thermozeaxanthin はニンジン由来β-カロテンと比較し、明確に熱安定性が高いことが示された。β-カロテンは30分の加熱で大部分が分解されるのに対し、thermozeaxanthin は50%強が残存していた。また、底を打つ残存率もthermozeaxanthin が大幅に高かった。

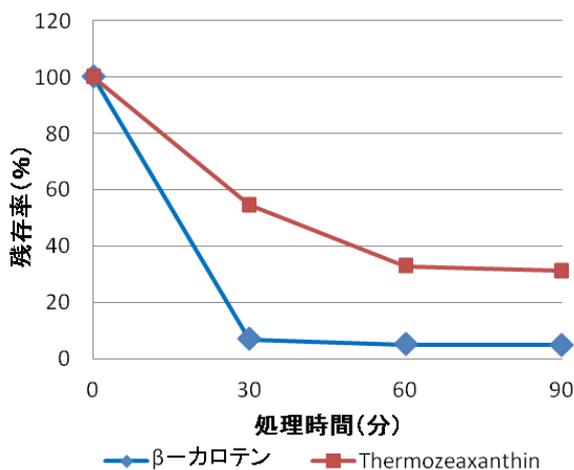


Fig. 8 各色素の分解速度

水溶性に関する比較も行った。「1. 背景・目的」でも述べたように、thermozeaxanthin は分子の構成から高い親水性が予測されている。比較実験では、まず、それぞれの色素溶液を試験管に50 μlずつ分取し、溶媒を揮発させた。なお、thermozeaxanthin ではメタノールを、β-カロテンではヘキサンを、それぞれ溶媒に用いている。次いで、ここへ450 μlの水を加え、激しく攪拌した。その結果、β-カロテンはほとんど水へ溶けなかったのに対し、thermozeaxanthin は全量が水へ溶けた。(Fig. 10) このことから、thermozeaxanthin は水溶性が高く、扱いやすい色素であるといえる。



Fig. 9 β-カロテン(左)と thermozeaxanthin(右)

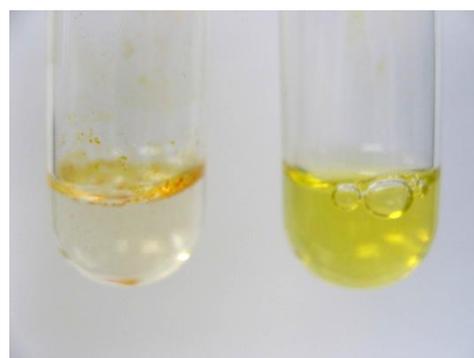


Fig. 10 水溶性の比較  
左: β-カロテン  
右: Thermozeaxanthin

### 3. 色素の利用

得られた色素をパンの染色に応用する実験を行った。パンの製造工程は、一般的な方法に準拠し、小麦粉・水・牛乳・砂糖・塩・バター・ドライイーストを混合したのち、一次発酵・二次発酵・焼き上げという手順とした。色素は一次発酵が終了した時点で生地混合した。対照実験として、色素を混合していない生地を用意した。焼き上がったパンの外観に大きな差は無いが、断面の色は大きく異なり、色素を混合したパンでは鮮やかな黄色となっていた。



Fig. 11 二次発酵終了時のパン生地の写真  
左:色素含有の生地、右:通常の生地



Fig. 12 焼き上がったパンの外観と断面  
左:色素含有の生地

右:通常の生地

#### 4. 総括

本研究によって、thermozeaxanthin の生産を目的とした *T. thermophilus* の新たな培養装置の製作と運用を実施できた。本培養装置は、70℃で増殖するという高度好熱菌の特性を応用した培養と抽出の並行という、新規な構成となっており、他種の好熱菌による物質生産への応用も可能である。また、thermozeaxanthin はβ-カロテンと比較して熱に対して大幅に安定であることが確認され、生物由来の黄色色素として高い利用性を有していることが示された。水溶性が高いことも他のカロテノイド色素と比べて特徴的である。実際に、パン作りにも利用できたことから、着色料として利用できることが確かめられた。Thermozeaxanthin は一般的なカロテノイド色素とは異なる特性を複数有しているため、更なる検討によって、様々な応用が期待できると考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究は、株式会社 八光電機からの助成金によって実施されたものです。熱の実験コンテストでの実験実施テーマとして、本研究をお選びくださいました社員の皆様方、殊にコンテスト事務局の上原明 様に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。