

# 亜臨界水処理を用いたアスタキサンチン生産プロセスの開発

多田 清志 [北見工業大学化学システム工学科/助教]

## 背景・目的

北海道では、年間約5.5万トンのコーンコブ(スイートコーンの穂軸)が産出され、その殆どが未利用のまま廃棄されている。これまで申請者はコーンコブのヘミセルロース成分を用いたキシリトール微生物生産について検討を行ってきたが、セルロース成分は十分に有効利用していなかった。そこで、コーンコブ残渣(セルロース成分)を原料とした酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるアスタキサンチン生産プロセスの開発を目的とし、亜臨界水反応を用いたコーンコブの糖化及び微生物細胞内のアスタキサンチン抽出、培養条件の検討を行った。

## 内容・方法

コーンコブの糖化は亜臨界水処理法及び酸加水分解法を検討した。亜臨界水処理法では、粉碎したコーンコブに10倍量の蒸留水を加えた後、ポータブルリアクターに入れ  $N_2$  ガスで4 MP に加圧し、150–300℃ の条件下で亜臨界水処理を行った。酸加水分解では、希硫酸(濃度0–4%)及び濃硫酸(濃度72%)を用いた二段階加水分解を行った。

アスタキサンチン発酵プロセスでは、菌株は酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (NBRC 10129) を用いた。培地は、グルコース 20 g/L または同濃度のグルコースを含むコーンコブ残渣加水分解液を基質とした合成培地を使用した。2 L の培地を含む有効容量5 L ジャーファーマンターを用い、温度25℃ および pH 5.0 の条件下で、種々の溶存酸素(DO)濃度の回分培養及び流加培養を行い、効率的なアスタキサンチン生産を検討した。

微生物細胞内からのアスタキサンチン抽出は、アセトン抽出法及び亜臨界水処理法を検討した。亜臨界水処理法では、培養液または遠心分離後同量のエタノールを加えた菌体溶液をポータブルリアクターに入れ  $N_2$  ガスで5 MP に加圧し、120–200℃ の条件下で亜臨界水処理を行い、アスタキサンチンの抽出率を検討した。

## 結果・成果

最初に、亜臨界水によるコーンコブの加水分解に及ぼす反応温度の影響を検討した。その結果、コーンコブ 10 g に蒸留水 100 mL を加え調整し、種々の反応温度で亜臨界水処理を行ったところ、220℃ で生成キシロース濃度及び260℃ で生成グルコース濃度が最大になり、それぞれ8.1 g/L 及び1.3 g/L になった。このことから、亜臨界水の反応温度を制御することで、選択的に構成糖(キシロース及びグルコース)を分画可能であることがわかつ

た。一方、1.5% 硫酸溶液と2.4% 硫酸溶液を組み合わせた二段階加水分解を行ったところ、コーンコブ 10 g からグルコース 2.95 g が生成し、亜臨界水処理法よりも高い収率でグルコースが得られた。これは、比較的容量の大きな反応器を用いて回分操作を行ったので、反応器内の温度が不均一になり過剰な熱分解が行われたためと考えられる。そこで、次の酵母 *X. dendrorhous* によるアスタキサンチン発酵では酸加水分解液を基質として検討を行った。

強力な抗酸化剤であるアスタキサンチンは活性酸素を抑制する働きがあるので、その生産量は微生物細胞内の酸素濃度に依存することが知られている。そこで、攪拌回転数を制御することにより培養液中の溶存酸素(DO)濃度を一定に制御可能なジャーファーマンターを用いて、アスタキサンチン生産に及ぼす DO 濃度の影響を検討した。その結果、DO 濃度の増加とともに微生物濃度、アスタキサンチン濃度及び収率が増加することがわかった。初発グルコース濃度 20 g/L とし DO 濃度 6 mg/L に制御した回分培養を行ったとき、微生物濃度、アスタキサンチン濃度及び収率は最大となり、それぞれ 5.57 g/L、0.54 mg/L 及び 0.10 mg/g-cell となった。次に、さらにアスタキサンチン濃度を向上させるために、DO 濃度 6 mg/L に制御した流加培養を検討したところ、最終アスタキサンチン濃度は 5.5 mg/L (回分培養の約 10 倍)に達した。このことから、DO 濃度 6 mg/L に制御し流加培養を行うことで、効率的なアスタキサンチン生産が可能になったことが明らかになった。

アスタキサンチンは微生物細胞内に蓄積されるので、抽出するためには堅固な細胞壁を破壊する必要がある。そこで、激しい加水分解作用と優れた成分抽出作用を有する亜臨界水反応を利用したアスタキサンチン抽出法について検討を行った。その結果、120–160℃ の反応温度領域の亜臨界水を用いると微生物細胞内からアスタキサンチンの抽出が可能であることがわかった。また、反応温度の影響を検討したところ、反応温度が低くなるにしたがって抽出されたアスタキサンチン濃度は増加し、120℃ のとき微生物濃度 50 g/L からアスタキサンチン濃度 2.92 mg/L が抽出されることがわかった。しかしながら、アセトン抽出法(細胞壁を塩酸で破壊した後アセトンでアスタキサンチンを回収する方法)で得られた濃度を基準に抽出率を算出すると 0.55 となり、更なる検討が必要である。

以上の結果から、コーンコブ残渣を原料とした酵母 *X. dendrorhous* によるアスタキサンチン生産が可能であり、亜臨界水処理を利用することで微生物細胞内に蓄積されたアスタキサンチンを抽出可能であることが明らかになった。

## 今後の展望

本研究で亜臨界水処理を利用したアスタキサンチン生産が可能であることを明らかにした。更に亜臨界水反

応を利用して効率的にコーンコブの糖化及びアスタキサンチンの抽出を行うためには、反応器内の温度の均一化や過剰な熱分解の抑制が検討課題であることがわかった。そこで今後は、流通管型反応装置等を用いた連続的な亜臨界水処理の可能性について検討する必要がある。また、微生物細胞内のアスタキサンチン含有率を向上させるために、亜臨界水反応で生成する種々の物質を同定し、微生物体内の代謝反応に及ぼす影響を検討する必要がある。