

[生物工学会誌 第75巻 第4号 229-238, 1997]

赤色酵母 *Phaffia rhodozyma* 細胞壁に対する溶解酵素のスクリーニングとアスタキサンチンの抽出

吉田光方子・西 晶子・大淵 和彦*・北条 知子
松澤 昭仁・浜地 正昭・熊谷知栄子

大関総合研究所
〒663 西宮市今津出在家町4-9

(平成8年12月16日受付 平成9年3月11日受理)

Screening of the Lytic Enzyme for the Red Yeast *Phaffia rhodozyma* Cell Wall and Extraction of Astaxanthin

MIHOKO YOSHIDA, AKIKO NISHI, KAZUHIKO OHBUCHI,* TOMOKO HOJO, AKIHITO MATSUZAWA, MASAOKI HAMACHI, and CHIEKO KUMAGAI (General Research Laboratory, Ozeki Corp., Nishinomiya, 663) Seibutsu-kogaku 75: 229-238, 1997.

Screening was conducted for a lytic enzyme-producing microorganism with the aim of achieving efficient extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* cells. The actinomycete *Streptomyces rochei* strain PHA-34 was found to produce the lytic enzyme, which mainly contained β -1,3 glucan- and β -1,6 glucan-hydrolyzing activities and which was stable within a wide pH range. The enzyme was induced by the addition of *Phaffia* cell wall into the culture broth. It was capable of lysing not only *P. rhodozyma* cells but also ascomycete and imperfecti yeasts in the logarithmic phase, as well as many basidiomycete yeasts regardless of the growth phase. Using the enzyme from *S. rochei* PHA-34, the extraction of astaxanthin was superior in yield to that obtained by physical or chemical treatments or by using other commercially available lytic enzymes. The astaxanthin obtained using the PHA-34 enzyme was similar to synthetic astaxanthin on high performance liquid and thin layer chromatographies.

[Key words: lytic enzyme, astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, *Streptomyces rochei*]

アスタキサンチン (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) は、植物、動物に広く含有されている発色性、耐光性、耐熱性、着色性にすぐれ、安定性の高いカロチノイド系の天然色素であり、¹⁾ 加えてビタミンEよりも強い抗酸化活性、抗炎症作用、免疫賦活作用などの機能が報告されている。^{2,3)} このことから食品用色素、水産飼料添加物として期待されており、化学合成品も上市されているが、養殖魚の体色改良剤としてオキアミから抽出したものが餌に添加されている。⁴⁾ 他に、微細緑藻の *Haematococcus* にも存在するが培養における経済性や色素精製などの点から工業的生産には問

題が多いとされている。⁵⁾ 一方、不完全菌で、Cryptococcaceae に属する赤色酵母 *Phaffia rhodozyma*⁶⁾ は、大量培養が可能で、アスタキサンチンを細胞内に豊富に有することが知られているが、^{7,8)} 抽出するには細胞壁を破碎する必要があり従来の塩酸処理^{9,10)} や物理的破碎^{7,11)} では条件が過酷で効率が悪いいため、より穏和な抽出条件が望まれている。そこで我々は、酵素処理が有望であろうと考え、市販の細胞壁溶解酵素の適用を試みたが、酵母 *P. rhodozyma* の細胞壁に対する溶解活性が低く抽出されるアスタキサンチン量も低いものであった。本報では、土壌中より *P. rhodozyma* 細胞壁に対する溶解酵素生産菌を見だし、アスタキサンチンの効率的抽出を行ったので報告する。

* 連絡先, Corresponding author.

実験方法

試薬および装置 合成アスタキサンチンは日本ロッシュより、カニ抽出色素は理研ビタミンより分与いただいた。また細胞壁および細胞懸濁液の濁度は、Front Scatter Method Turbidimeter, CORONA UT-11 (コロナ) で測定した。この値は ppm で表示される (*P. rhodozyma* 生細胞懸濁液の場合、500 ppm は 660 nm の吸光度で約 0.4 に相当する)。

***P. rhodozyma* の培養と菌体および細胞壁の調製** YPGP 培地 (0.5% 酵母エキス, 1% ポリペプトン, 1% グルコース, 0.5% KH_2PO_4 , 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5) で 25°C, 3 日間振盪培養した *P. rhodozyma* IFO 10129 の集菌洗浄菌体から白石ら¹²⁾の方法に準じてアルカリ処理菌体を得た。同処理菌体を凍結乾燥後、バイブレーションミルで粉碎したものを細胞壁画分とした。

その他の培地 放線菌の培養に用いた Bennett 寒天培地, Emerson 培地, ショ糖・硝酸塩培地, ブドウ糖・アスパラギン培地の各組成は、微生物学実験法の巻末付録¹³⁾を参照した。

スクリーニング用寒天平板の調製とハローアッセイ スクリーニング用寒天平板は、口径 89 mm の市販プラスチックシャーレに選択培地 (0.1% 細胞壁画分または 750 ppm *P. rhodozyma* の生細胞, 0.68% Yeast Nitrogen Base (Difco), 1.8% 寒天, pH 6.8) を 20 ml 注ぎ作成した。また、ハローアッセイでは、同平板上にコルクボーラーにて直径 5.3 mm の孔をあけ、そこに注いだ酵素溶液 40 μl によって 37°C, 18 時間保温後に生じるハローの径を測定した。酵素活性は、別に酵素希釈系列によって作製した次式

$$\log(\text{活性}) = 0.2756 \times (\text{ハローの直径 (mm)}) - 5.1550$$

(相関係数 $r = 0.9997$)

によって算出した。なお、本式での 1 単位は、本粗酵素粉末 1 mg/ml が形成するハローの径に相当する。

溶解率の測定 上記培養上清 1 ml と最終濃度 500 ppm となるように調整した *P. rhodozyma* 細胞懸濁液 (pH 6.8) 3 ml を 30°C で 1 時間反応させ、濁度の減少を測定し、下記の計算式より溶解率を求めた。また、溶菌スペクトルの検討に際しては、酵素粉末を 5 mg/ml で使用した。

$$\text{溶解率 (\%)} = \frac{(D_0 - D_1) - (d_0 - d_1)}{D_0} \times 100$$

$D_{0,1}$: 0, 1 時間後の反応液の濁度

$d_{0,1}$: 0, 1 時間後の酵素無添加区分の濁度

細胞壁溶解酵素生産菌の培養と粗酵素粉末の調製

酵素生産基本培地 (0.3% 細胞壁画分, 0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco), 0.1% グルコース, pH 6.8) に植菌し, 37°C, 130/min で 2 ~ 7 日間往復振盪培養した。ジャーファーメンターを用いた場合には、同培地にて、通気量 1.5 vvm, 攪拌数 200 rpm, 37°C の条件下で 3 日間通気培養した。その遠心上清を粗酵素液とし、分子量 10,000 の限外ろ過後凍結乾燥し、粗酵素粉末を得た。

粗酵素の至適条件, 安定性 条件検討に際し、粗酵素粉末濃度 3 mg/ml, McIlvaine 緩衝液 (pH 3.0 ~ 8.5), トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5 ~ 9.0), グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.5 ~ 10.5) の各緩衝液と、基質として *P. rhodozyma* の生細胞および細胞壁を用いた。pH 安定性においては 5°C で一晩、温度安定性においては pH 5.5 で一晩放置後の酵素溶液を用いて、濁度の減少による溶解率を測定することによって残存活性を比較した。

走査電子顕微鏡 電子顕微鏡下写真撮影に供した試料は、常法に従いグルタルアルデヒド-四酸化オスミウム二重固定法によって調製した。¹⁴⁾

粗酵素中の各種酵素活性測定 多糖類分解活性は、基質多糖 500 mg/ml および粗酵素粉末 3 mg/ml を用い、pH 5.5, 37°C における 30 分間反応後の遊離還元糖量より求めた。活性は、1 分間に 1 μmol のグルコース相当量を遊離する酵素量を 1 U と定義した。各プロテアーゼ、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性の測定は、国税庁所定分析法注解¹⁵⁾に準じて行い、 α -アミラーゼの活性もその定義に従って表した。

溶菌スペクトルのための各種酵母の培養 溶菌スペクトルのために供試した酵母は、YPGP 液体培地にて 25°C で振盪培養した。本培養条件での各酵母の世代時間と最大増殖時の吸光度を求めた後、対数増殖中期および静止期の細胞に対し、溶解率の測定の項にしたがって溶解率を求めた。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

(1) *P. rhodozyma* 細胞壁分解産物の同定 TLC には、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) に最終 500 ppm となるよう懸濁した細胞壁画分 1 ml と粗酵素液 4 ml を 37°C, 4 時間反応し、メンブレンフィルター C045A (アドバ

ンテック東洋)でろ過後適宜濃縮したものを供試した。プレートに Kieselgel 60 (0.25 mm, MERCK) を用い、イソプロパノール/水=4/1 の溶媒で展開し、濃硫酸を用いて検出した。

(2) 抽出アスタキサンチンの同定 抽出したアスタキサンチンの検出には、同プレートを用いて、アセトン/石油エーテル=2/8 の溶媒で遮光下にて展開した。また分離後のスポットを掻き取り、アセトンに再懸濁後、上清の 470 nm における吸収を比較することによって組成比を求めた。

アスタキサンチン抽出のための菌体処理 比較に用いた *P. rhodozyma* 細胞は、洗浄菌体を McIlvaine 緩衝液に乾燥菌体濃度 5 % となるよう懸濁後、水浴中で 10 分間煮沸することによって菌体内酵素を失活させ、急冷後室温に戻したものをを用いた。

(1) 酵素処理 本酵素との比較を行うために市販酵素として、Zymolyase 20T (生化学工業) および食品工業用の細胞壁溶解酵素剤として販売されている YL-15 (天野製薬)、ツニカーゼ FN (大和化成)、セルクラスト (ノボ・ノルディスク) を用いた。なおツニカーゼ FN 用には pH 7.5、本酵素を含むそれ以外の酵素用には pH 5.5 の McIlvaine 緩衝液で調製した *P. rhodozyma* 菌体懸濁液 (50 mg dry cell/ml) に、各酵素を乾燥菌体重量に対し 1 % となるよう添加した。酵素処理は、YL-15 では 50°C、その他の酵素では 30°C で 20 時間行なった。

(2) 物理的処理 フレンチプレス処理は The FRENCH Pressure Cell Press (AMINCO) を用い、菌体懸濁液 20 ml に対し 16,000 psi で 5 回繰り返した。ガラスビーズ処理は、15 ml 容フェルコンチューブに菌体懸濁液 1 ml と酵母破碎用ガラスビーズ (直径 0.45 mm) 1 g を加え、オートマチックミキサー S-100 (TAITEC) の最大出力で 5 分間処理した。超音波処理は UD-200 (TOMY) を用い、菌体懸濁液 20 ml に対し出力 200 W で氷冷しながら 20 分間処理した。

(3) 化学的処理 菌体懸濁液を集菌洗浄し、同量の 1 N HCl に再懸濁後、10 分間煮沸した。

アスタキサンチンの抽出 アスタキサンチンは脂溶性の色素であるため、菌体を破碎しただけでは可溶化されてこない。そこで各菌体処理液を遠心分離して集めた沈殿に、乾燥菌体重量に対して 50 倍量のアセトンを添加した。攪拌後遠心により、アセトン中にアスタキサンチンを主体とする赤色色素を抽出した。抽出率は、分光光度計 (島津製作所, UV-180) を用いて、

470 nm における吸収を測定することによって比較した。

抽出色素の高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は Bushway の方法¹⁶⁾を改変して行った。すなわち、600E Multisolvent Delivery System (Waters) を用いて、Sim-pack CLC-ODS カラム (島津製作所)、移動相としてアセトニトリル/メタノール/テトラヒドロフラン=6/3/1、流速 1 ml/min、カラム温度 40°C の条件により分離した。また色素は、990J Photodiode Array Detector (Waters) を用いて、470 nm の波長により検出した。

抽出色素の退色試験

(1) 光退色試験 ガラス試験管に 1 ml のアセトン抽出色素を入れ密封後、15°C 恒温室内で、ラボライト蛍光灯、Power twist 型 40 W (DURO-TEST) を用いて 20 cm の距離で水平に光を照射した。66 時間後の 470 nm の吸光度から減少量を求めた。

(2) 熱退色試験 ガラス試験管に 2 ml の 1 級大豆油 (和光純薬) に溶解した色素を入れ、130°C で保温し、470 nm の吸光度を測定した。

実験結果

スクリーニング 全国各地の土壌サンプル約 400 点から、細胞壁画分を含むスクリーニング用寒天平板上に生育したコロニー周囲に、細胞壁溶解による透明環 (ハロー) を形成した株として、約 600 株を得た。つぎに、同選択培地による 10 ml の液体振盪培養を 2 ~ 7 日間行なった。その培養上清を用いてハローアッセイによる活性の比較を行い、60 株を選抜した。さらに、細胞壁の代わりに *P. rhodozyma* 生細胞を用いたハローアッセイにより、10 株に絞り込んだ。最終的には、各株の培養上清を用いて生細胞懸濁液の濁度減少から求める溶解率を比較した結果、*P. rhodozyma* 生細胞を速やかに溶菌する酵素を生産する放線菌 PHA-34 株を得た。

分離菌株の同定 本放線菌 PHA-34 株の主な形態学的特徴は、Table 1 にまとめた。本菌の増殖温度域は 10~45°C であり、酵素生産基本培地液体培養もしくは Bennett 寒天培地上では無色透明な基生菌糸が観察された。その直径は 0.8~1.5 μm で、稀に切断されることがあるが多くは切断されることなく多方向に分岐していた。また Emerson 寒天培地、酵素生産用寒天培地上で本菌は最初白色を呈し、徐々にベージュ色のコロニーへと成熟した。気菌糸は螺旋状で、成熟す

Table 1. Characteristics of *Streptomyces rochei* PHA-34.

Characteristic	
Range of growth temperature	10–45°C
Diameter of mycelium	0.8–1.5 μm
Color of spore mass	White to yellow-brown
Spore chain morphology	<i>Spirales</i>
Spore surface	Smooth
Spore length	0.5–1.0 μm in diameter
Spore form	Ellipse
Melanin on peptone-yeast extract iron agar	Absent
Melanin on tyrosine agar	Absent

るとその先端が切断され胞子が形成された。胞子の大きさは長さ 0.8–1.5 μm , 直径 0.5–1.0 μm で多くのは楕円形であった。胞子表面は平滑だが高倍率では“しわ”が認められた。上記培地上で発育した本菌は胞子嚢, 運動性の胞子, 分節胞子は観察されず, メラニン生成は陰性であった。また, 液体培養で得た本菌体の細胞壁中に LL 型デアミノピメリン酸およびグリシンを有していたことから PHA-34 株は *Streptomyces rochei* と同定された (Fig. 1)。

酵素生産 *S. rochei* PHA-34 株を, Emerson 培地, シュロ糖・硝酸塩培地, ブドウ糖・アスパラギン培地および各培地に 0.3% 細胞壁画分を加えたもの, または酵素生産基本培地およびそれから細胞壁画分を除いた

10 μm Fig. 1. *S. rochei* PHA-34.

Table 2. Effect of cell wall content on lytic activity.

Cell wall added (%)	Lytic activity	
	for cell wall (mU)	for intact cells (mU)
0.003	0	0
0.01	15.1	0
0.03	23.5	0
0.1	95.2	1.6
0.3	725.9	2.4
1.0	384.8	11.0

もので培養し, その培養上清のハローアッセイによる酵素活性を測定したところ, いずれも細胞壁画分を含む培地で培養した上清にのみ活性が認められたことから, 本細胞壁溶解活性は, *P. rhodozyma* 細胞壁によって誘導される誘導酵素であると推測された (データ省略)。つぎに酵素生産基本培地における添加細胞壁画分の最適初発濃度を検討した。Table 2 に示すように, 培地中の添加細胞壁画分濃度が高くなるほど酵素活性が高くなった。また *P. rhodozyma* 生細胞に対する溶菌活性は, 0.1% 以上の細胞壁画分が必要であり, 基質濃度が高くなるほど活性も高くなったが, 基質調製の手間も考慮し, 通常の酵素生産には 0.3% を用いることとした。つぎに, ジャーフェーマンターでの培養における通気条件を検討した。Table 3 には攪拌数 200 rpm, 培養温度 37°C における通気量に対する酵素活性を示した。その結果, 通気量が活性に与える影響は大きく, 1.5 vvm で 3 日間培養すると最高活性を示した。

粗酵素の至適条件, 安定性 Fig. 2 に示すように, 本酵素の生細胞に対する至適温度は 37°C, 至適 pH は 5.5 であったが, 細胞壁に対しては非常に緩やかなピークを示した。細胞壁に対する至適温度は 20°C から 50°C 付近にあり, 至適 pH は 5.5 付近と 7.5–8.0 付近に 2 つのピークが存在するように見られた。ここで緩

Table 3. Influence of aeration ratio on lytic activity in a jar fermentor.

Aeration (vvm)	Lytic activity	
	for cell wall (mU)	for intact cells (mU)
1.0	148.5	1.8
1.5	1206.1	8.5
2.0	1.8	1.5

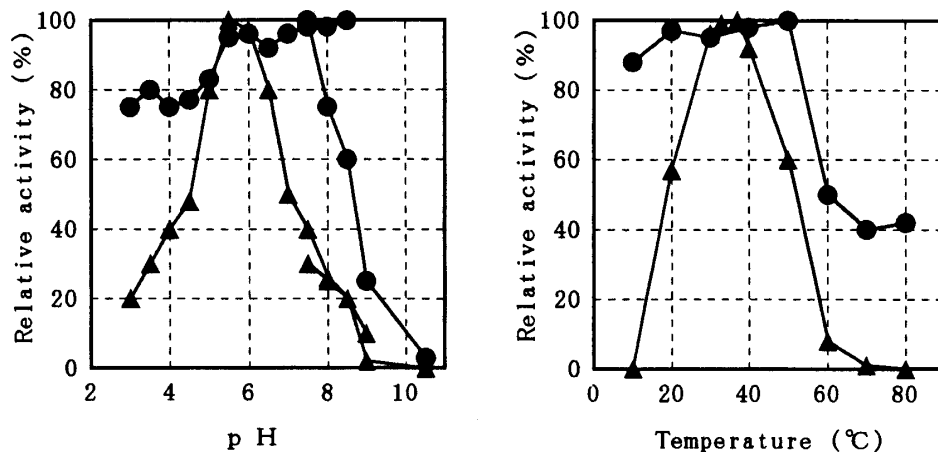


Fig. 2. Effects of pH and temperature on lytic activity of *S. rochei* PHA-34. Symbols: ●, cell wall; ▲, native cells.

衝液の種類でやや違いがあるものの、細胞壁は生細胞と比較して非常に溶けやすく、同じ条件下では細胞壁を基質とした場合の方が高い溶解率を示した。また Fig. 3 に示すように、pH 安定性では pH 3.0~10.5 の範囲でそれぞれ 5°C で一晩放置後、pH 5.5 に再調整し 37°C で反応させたところ、すべての pH においてほぼ同程度の残存活性が認められたため、この pH 範囲内では安定であると判断した。温度安定性は pH 5.5 に調整した酵素溶液を 10~80°C で一晩放置後、37°C で反応させたところ、40°C までは溶解活性を維持していたが 50°C 以上では活性の低下が著しかった。本条件を用いて *P. rhodozyma* 生細胞に対する 1 時間後の溶解率を求めたところ、Table 4 に示す結果となった。*P. rhodozyma* 生細胞は Zymolyase ではほとんど溶解されないのに対し、本酵素では酵素量の増加とともに溶解率が増加した。この時 (0.5 mg/ml) の走査電子顕微鏡写真像を Fig. 4 に示した。

粗酵素粉末中の各種酵素活性と細胞壁の酵素分解

本酵素粉末中の加水分解酵素活性を調べ、その結果を Table 5 に示した。本酵素粉末は、主として各種のグルカナーゼ、キシラナーゼ、中性プロテアーゼ活性を有していた。また *S. rochei* PHA-34 株を、Emerson 培地、ショ糖・硝酸塩培地、ブドウ糖・アスパラギン培地の各培地に 0.3% 細胞壁画分を加えたもの、または酵素生産基本培地およびそれから細胞壁画分を除いたもので培養し、その培養上清のハローアッセイおよび濁度の減少による溶解率と主な酵素活性との相関関係を求めたところ Table 6 に示す結果となった。この結果から、ハローアッセイと濁度の減少には高い相関関係が認められ、そこにもっとも高く相関する酵素活性はブスツラナーゼであった。したがって *P. rhodozyma* 細胞壁の溶解に主として作用しているのは、本粗酵素中の β -1,6 グルカナーゼ活性であると推測される。本酵素による *P. rhodozyma* の細胞壁分解物を TLC で調べたところ、グルコースのスポットが確認された(データ省略)。

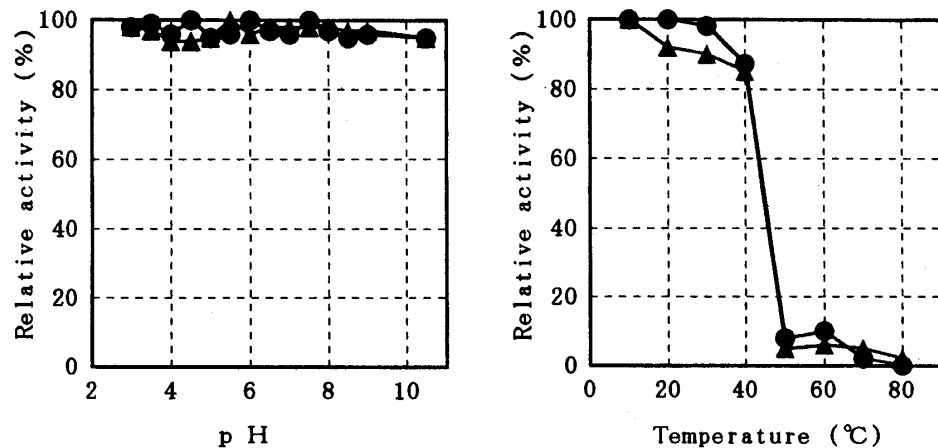


Fig. 3. pH and temperature stabilities of *S. rochei* PHA-34 lytic activity. Symbols are the same as in Fig. 2.

Table 4. Lysis of *P. rhodozyma* intact cells.

Enzyme concentration (mg/ml)	Rate of lysis (%)			
	0.5	1.0	2.0	2.5
PHA-34 enzyme	15	38	60	
Zymolyase		0		0

The rate of lysis was calculated from the decrease in the turbidity of a *P. rhodozyma* intact cell suspension containing each lytic enzyme after 1 h at 30°C.

溶菌スペクトル 本酵素の溶菌活性を22株の酵母に対して検討した。Table 7には、酵母懸濁液の濁度の減少により求めた溶解率を示した。本酵素は、対数増殖期にある子菌酵母、不完全菌酵母を溶菌し、担子菌酵母の主なものに対しては、増殖相の区別なしに溶解した。このことから、本酵素は *P. rhodozyma* の細胞壁に対してだけでなく幅広い対象に対しても利用可能であると思われる。

アスタキサンチン抽出率の比較 本細胞壁溶解酵素が、*P. rhodozyma* 菌体に対して有効に作用することが確認できたため、*P. rhodozyma* 菌体より赤色色素アスタキサンチンの抽出について検討した。本酵素を *P. rhodozyma* 菌体に作用させたときのアスタキサンチン抽出率を100として、各市販酵素処理、物理的処理、化学的処理による抽出率を Table 8 に示した。本酵素による抽出率は、他の市販酵素処理および各種物理的処理と比較してもはるかに高い抽出率を示した。この時他の処理方法を用いた区分は、抽出残渣がまだやや赤色を呈していた。生細胞の場合、菌体内酵素が作用するためか、未処理区分からアセトンに抽出される量

Table 5. Enzyme activities in the lytic enzyme produced by *S. rochei* PHA-34.

Substrate	Enzyme	Hydrolytic activity (mU/mg protein)
Casein	acid protease	5.5
Casein	neutral protease	59.5
Soluble starch	α -amylase	14.8
Soluble starch	glucoamylase	0.0
Pullulan	pullulanase	9.0
Laminarin	laminarinase	520.0
β -1,3 Glucan (Cardlan)	β -1,3 glucanase	139.0
Nigeran	nigeranase	0.0
Pustulan	pustulanase	118.0
Chitin	chitinase	0.0
Mannan	mannanase	0.0
Xylan	xylanase	100.0

は熱処理細胞を用いた場合より多かった。市販酵素を生細胞に作用させた場合、アスタキサンチン抽出率は加熱細胞を用いた場合よりさらに低くなった。これは、細胞の細胞壁溶解酵素に対する感受性の違いであると考えられる。

抽出色素の定性分析 HPLC による分析結果を Fig. 5 に示す。本酵素により *P. rhodozyma* 菌体から抽出した色素のクロマトグラムでは3つの大きなピークが見られ、これは合成アスタキサンチンのクロマトグラムで見られる3つのピークと保持時間が一致した。個々のピークの同定は行っていないが、通常 *trans*-アスタキサンチンがただちに異性化され、9-*cis* および 13-*cis* との *cis-trans* 混合物となることが知られており、*cis* 型の方が *trans* 型より遅れて溶出されるという。^{8,17)}

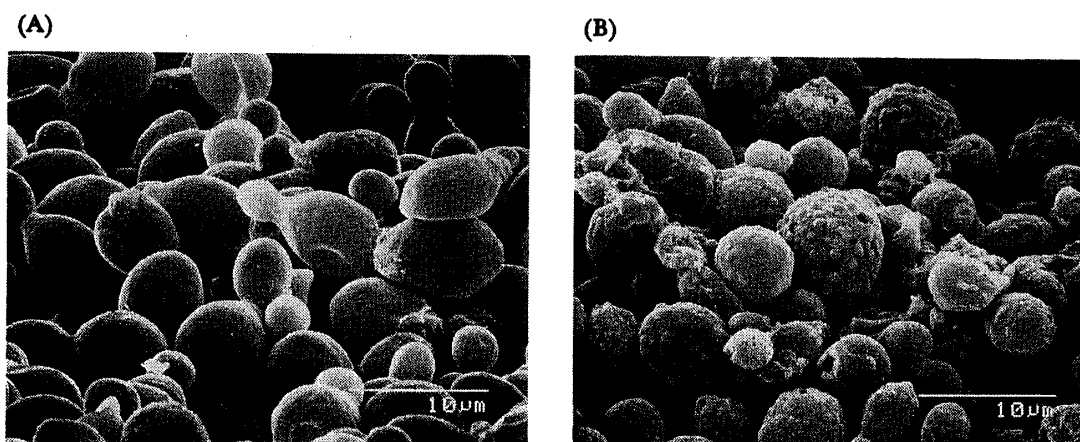


Fig. 4. Scanning electron microscope photographs of *P. rhodozyma* cells treated with PHA-34 enzyme. (A) Without enzyme; (B) with enzyme.

Table 6. Correlation matrix of lytic activity.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Activity of halo assay for intact cells	1.000										
2. Activity of halo assay for dried cells	0.989**	1.000									
3. Protein contents in culture filtrate	0.878*	0.872	1.000								
4. Reducing sugar in culture broth	-0.958**	-0.959**	-0.798	1.000							
5. Activity of laminarinase	0.314	0.185	0.193	-0.128	1.000						
6. Activity of pustulanase	0.843	0.901*	0.895*	-0.817	-0.144	1.000					
7. Activity of pullulanase	0.242	0.112	0.251	-0.029	0.965**	-0.134	1.000				
8. Activity of xylanase	0.729	0.665	0.876	-0.555	0.587	0.600	0.675	1.000			
9. Activity of neutral protease	0.389	0.423	0.649	-0.497	-0.438	0.627	-0.323	0.361	1.000		
10. Rate of lysis of <i>P. rhodozyma</i> intact cells	0.993**	0.994**	0.899*	-0.970**	0.207	0.890*	0.146	0.704	0.481	1.000	
11. Rate of lysis of <i>P. rhodozyma</i> dried cells	0.961**	0.983**	0.923*	-0.907*	0.129	0.955*	0.098	0.713	0.483	0.976**	1.000

**, Significance level at 1%; *, significance level at 5%.

Table 7. Lysis of various yeast cells by the lytic enzyme from *S. rochei* PHA-34.

Strain	Rate of lysis (%)	
	Logarithmic phase	Stationary phase
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> IFO 0351	68.2	36.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A	55.4	4.4
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> IFO 1130	0	0
<i>Hansenula mrakii</i> RIB 5226	31.2	31.0
<i>Kluyveromyces lactis</i> IFO 0433	64.7	3.2
<i>Pichia anomala</i> IFO 10213	46.5	0
<i>Lipomyces starkeyi</i> IFO 10381	53.8	19.3
<i>Filobasidium floriforme</i> IFO 1915	30.3	51.0
<i>Ustilago maydis</i> IFO 5346	56.9	81.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> IFO 10512	0	0
<i>Tremella mesenterica</i> IFO 9310	35.2	49.5
<i>Graphiella phoenicis</i> IFO 9100	1.3	0
<i>Sporobolomyces roseus</i> IFO 1105	4.0	0
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> IFO 0797	55.6	34.6
<i>Candida colliculosa</i> IFO 0663	56.8	4.2
<i>Candida tropicalis</i> IFO 1400	0	0
<i>Candida utilis</i> IFO 0639	47.1	2.4
<i>Kloeckera apiculata</i> IFO 0865	37.0	37.4
<i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 1125	9.7	7.2
<i>Trigonopsis variabilis</i> IFO 0755	0	0
<i>Cryptococcus albidus</i> IFO 0612	23.0	29.0
<i>Phaffia rhodozyma</i> IFO 10129	43.3	33.3

The rate of lysis was calculated from the decrease in the turbidity of a cell suspension. Each cell suspension was incubated at the indicated growth phase with 5 mg/ml PHA-34 enzyme at 30°C for 1 h.

また塩酸処理によって抽出したものではピークパターンが異なっており、アスタキサンチンと思われるピークは、それより速く溶出されるピークと重なり、いわゆる肩としてしか検出できなかった。次に、TLCによる分析結果をFig. 6に示す。本酵素および塩酸によって抽出した色素は、合成アスタキサンチンのスポットとRf値で一致し、これはAnら¹¹⁾が報告しているcis-, trans-アスタキサンチンのRf値と同じだった。またTable 9に示すように、プレート上のスポットを掻き取ってアセトンに懸濁後、その上清の470 nmの吸収を測定することによりcis-, trans-アスタキサンチンの存在比を比較したところ、本酵素を用いて抽出した色素の存在比は、合成アスタキサンチンの値とほぼ一致した。

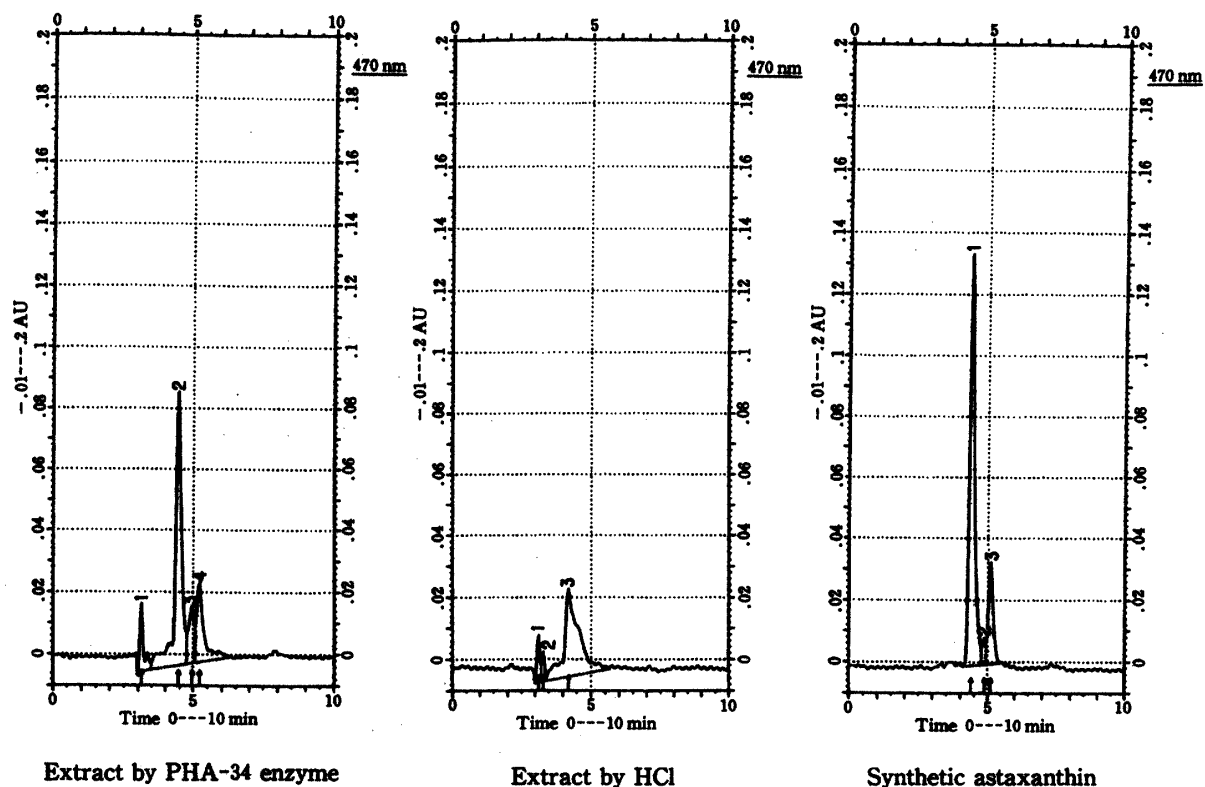


Fig. 5. High performance liquid chromatogram of astaxanthin.

抽出色素の光・熱安定性 本酵素で処理して得た抽出色素と塩酸処理で得た抽出色素の光および熱に対する安定性を比較検討した。光照射の結果を Table 10 に、熱処理の結果を Fig. 7 に示す。本酵素処理によって得た色素は、塩酸処理によって得た色素より耐光性、耐熱性にすぐれており、合成品より熱に対して安定であった。

考 察

今回我々が単離した放線菌 *S. rochei* PHA-34 株は、赤色酵母 *P. rhodozyma* の細胞壁を誘導基質として、*P. rhodozyma* 生細胞の細胞壁を溶解する酵素を生産した。この酵素の溶解活性は、幅広い pH 安定性を示した。

本酵素は、数種のグルカナーゼ、キシラナーゼおよびプロテアーゼ活性を有していたが、数種類の培養条件によって変化する活性を基にして *P. rhodozyma* の溶解率との相関を求めたところ、含まれる酵素活性としてはもっとも高いラミナリナーゼ (β -1,3 グルカナーゼ) 活性よりもブスツラナーゼ (β -1,6 グルカナーゼ) 活性と最も高い相関を示した。 β -1,3 グルカナーゼ活性を主体とする Zymolyase などの市販酵素が、*P. rhodozyma* 生細胞に作用しなかったこともこうした理由によるものと推測される。ただし、細胞壁と生細胞を基質として用いた場合の溶解の至適 pH が異なっていたことは、本酵素の溶解活性が β -1,6 グルカナーゼ単独ではなく、他の酵素活性と複合的に作用している

Extract by PHA-34 enzyme
Extract by HCl
Red pigments of crustacea
Synthetic astaxanthin
Synthetic astaxanthin

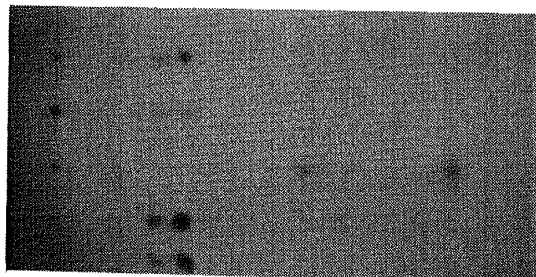


Fig. 6. Thin layer chromatogram of astaxanthin.

Table 8. Efficiency of astaxanthin extraction from *P. rhodozyma* cell under various treatments.

Treatment	Extraction ratio (%)	
	Heat-treated cells	Intact cells
Not treated	8.8	11.2
PHA-34 enzyme	100.0	100.0
HCl	89.1	NT
French press	44.0	NT
Glass beads	37.0	NT
Sonication	14.6	NT
Zymolyase 20T	51.0	45.0
YL-15	8.7	11.3
Tsunicase	18.2	16.0
Celluclast	33.3	22.7

The extraction ratio indicates the absorbance at 470 nm of acetone extract after treatment, taking that of the PHA-34 enzyme treatment as 100%. NT, not tested.

ことを示唆している。一方、溶菌スペクトルをみると、定常期の子囊菌酵母に対する溶菌活性が低く、不完全菌酵母の同じ *Candida* 属の中でも種間の差が大きかった。近年 *P. rhodozyma* は、18SrRNA 塩基配列の相同性比較から他の Cryptococcaceae とは異なることが報告されており、¹⁸⁾ また有性世代が発見され Filobasidiaceae, Tremellales に属する新属 *Xanthophyllomyces* として提唱されている。¹⁹⁾ 担子菌類である *Filobasidium floriforme*, *Ustilago maydis*, *Tremella mesenterica* が比較的高い溶解性を示したことから、担子菌類の細胞表層構造には共通性があるものと推測できる。しかしながら同じ担子菌類の中でも *Rhodospiridium toruloides* はまったく濁度の減少が起こらなかった (Table 7)。*R. toruloides* の無性世代とされる *Rhodotorula glutinis* の感受性も低いことから両者の細胞表層は異なることが示唆される。これらのことから、酵母に共通する細胞壁の基本骨格をなす構造体が β -1,3 結合したグルカンである²⁰⁾ とすれ

Table 9. Distribution of red pigment peaks.

Rf value	0.22	0.29	0.55	0.87
Extract by the PHA-34 enzyme	15.8%	84.2%		
Extract by HCl	52.0%	48.0%		
Red pigments of crustacea	29.4%	0.0%	29.4%	41.2%
Synthetic astaxanthin	15.0%	85.0%		

The Rf values of authentic astaxanthin are as follows: *cis*-astaxanthin, 0.22; *trans*-astaxanthin, 0.29.¹¹⁾

Table 10. Influence of light irradiation on astaxanthin color.

Treatment	Degree of color remaining (%)
PHA-34 enzyme	44.7
HCl	3.4

Each pigment was irradiated at about 6000 lux for 66 h.

ば、本酵素による溶菌がそうした基本構造を分解することによって起こっているものではないと考えることができる。事実、本酵素処理した *P. rhodozyma* 生細胞の電子顕微鏡写真では、細胞表層の局所的な分解によると思われる穿孔が認められており (Fig. 4), このことを示唆するものである。しかしながら、たとえば *Saccharomyces cerevisiae* においては、 β -1,6 結合を介した β -1,3 グルカンの層状構造体と、比較的長い β -1,6 グルカンを側鎖に持つ β -1,3 グルカンによって細胞壁の骨格構造が形成されており、²¹⁾ 酵母細胞壁は複雑な構造をとっていることが推測されるため、種間でその量比が異なっていることも一つの要因かもしれない。

アスタキサンチン抽出において塩酸処理は、他の物理的処理や市販酵素処理より高い抽出率を示す簡便な処理方法であるが、HPLC, TLC などの結果では合成アスタキサンチンとは異なるパターンを示し、*cis-trans* 比でも *cis* 型の比率が高いものであった。Andrews らは、*P. rhodozyma* の場合 *cis*-アスタキサンチ

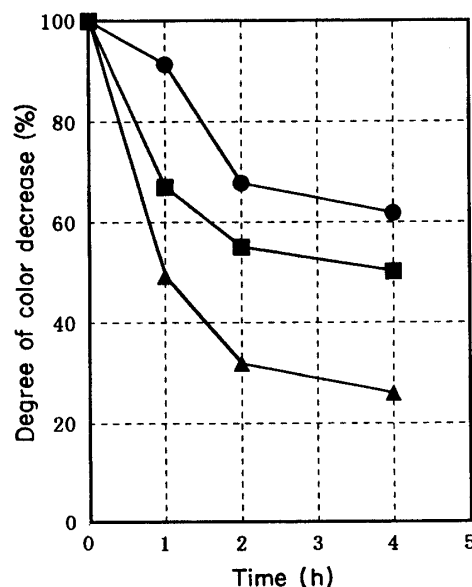


Fig. 7. Influence of heat on astaxanthin color. Each astaxanthin was incubated at 130°C. Symbols: ●, PHA-34 enzyme; ▲, HCl; ■, synthetic astaxanthin.

ンも生合成産物ではないかと推測している²²⁾が、一般的に天然の β -カロチンは*trans*型であり、アーティファクトとしての*cis*型への異性化が起こるとされている。⁸⁾またこの*cis*異性体は、抗腫瘍活性、ビタミンA活性、抗酸化能、色調などの面から問題があるとされている。¹⁷⁾また塩酸処理によって得られた色素は、光照射に対して速く退色した。これは塩酸処理が色素に対して過激な条件であることを示している。一方、本酵素を*P. rhodozyma*菌体に作用させた場合は抽出率として各処理より高く、HPLC, TLCなどの結果からも、*trans*-アスタキサンチン比率が高い合成アスタキサンチンとはほぼ同等であることが分かった。さらに耐熱性においては合成アスタキサンチンよりもすぐれていた。本来、酵素を用いた前処理は、比較的低い温度で、しかも色素が安定なpHで反応が行えることから、アスタキサンチンの変性、退色なども最小限に抑えられると考えられるが、溶解活性の低さなどから実現性に乏しいものであった。物理的破碎の場合抽出率を上げるためには、溶媒での抽出を数回繰り返す¹¹⁾か極性の異なる溶媒を検討しなければならない。今回の新規酵素は既存の酵素と比較して*P. rhodozyma*細胞に対する溶解活性が高いため、従来の酵素では得られなかった物理的、化学的処理よりも高いアスタキサンチン抽出率と*trans*型比率が高く、さらに安定性にすぐれ品質的にも良好なアスタキサンチンを得ることが可能になった。このことは、物理的破碎の装置などを新たに設置することなく、規模の大小に係わらない処理を可能とし、高品質の天然型アスタキサンチンを工業生産する場合においても有望な処理条件の一つとして期待できると考える。

要 約

赤色酵母*P. rhodozyma*から酵素による効率良いアスタキサンチンの抽出をめざして、土壌中より細胞壁溶解酵素生産菌をスクリーニングした結果、放線菌*S. rochei* PHA-34株を単離した。本菌は、*P. rhodozyma*の細胞壁を誘導基質として、 β -1,3および β -1,6グルカンナーゼを主体とした幅広いpH安定性を有する細胞壁溶解酵素を生産した。本酵素は、*P. rhodozyma*生細胞だけでなく、対数増殖期にある子囊菌酵母、不完全菌酵母を溶菌し、担子菌酵母の主なものに対しては、増殖相の区別なしに溶解した。本酵素によるアスタキサンチンの抽出は、化学的処理、物理的処理および他の市販酵素処理よりも高い抽出効率を示し、得られたア

スタキサンチンは、HPLC, TLCの結果から、合成アスタキサンチンに匹敵する純度であると判断され、本酵素による抽出が有望な方法であることが示された。

電子顕微鏡写真撮影において、当社総合研究所長澤直、高寄章宏両研究員の協力を得ました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Johnson, E. A.: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **11**, 297-326 (1991).
- 2) Terano, J.: *Lipids*, **24**, 659-661 (1989).
- 3) Bendich, A.: *Carotenoids and the Immune System in "Carotenoids"*, p. 323-335, Plenum Press, New York (1989).
- 4) 水産庁研究部研究課：オキアミ食用化技術開発研究成果の概要, p. 133-154 (1982).
- 5) 宇野一郎, 中井清典：食品工業, **12.30**, 47-52 (1994).
- 6) Kreger-van Rij, N. J. W.: *The Yeasts*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984).
- 7) Johnson, E. A. and Lewis, M. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 173-183 (1979).
- 8) Johnson, E. A. and An, G.-H.: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **11**, 297-326 (1991).
- 9) Nakayama, T., Mackinney, G., and Phaff, H. J.: *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol.*, **20**, 217-228 (1954).
- 10) Okagbue, R. N. and Lewis, M. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 33-39 (1984).
- 11) An, G.-H., Schuman, D. B., and Johnson, E. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 116-124 (1989).
- 12) 白石 淳, 藤井久雄：農化, **52**, 553-559 (1978).
- 13) 微生物研究法懇談会編：微生物学実験法, 講談社, 東京 (1975).
- 14) 山田英智, 石川春律, 野々村楨昭編：微生物学における電子顕微鏡技術 (上), p. 3-10, 学会出版センター (1982).
- 15) 第三回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1974).
- 16) Bushway, R. J.: *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 1527-1547 (1985).
- 17) Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., and Rojas-Hidalgo, E.: *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 2457-2475 (1991).
- 18) Yamada, Y. and Kawasaki, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2845-2846 (1989).
- 19) Golubev, W. I.: *Yeast*, **11**, 101-110 (1995).
- 20) Kreger-van Rij, N. J. W.: *The Yeasts*, (Phaff, H. J.), p. 22-24, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984).
- 21) Shiota, M., Nakajima, T., Satoh, A., Shida, M., and Matsuda, K.: *J. Biochem.*, **98**, 1301-1307 (1985).
- 22) Andrewes, A. G.: *Phytochemistry*, **15**, 1003-1007 (1976).