

2S3-PM4 *Haematococcus pluvialis* が生産するアスタキサンチンの酵素法による精製

○永尾 寿浩, 島田 裕司
(大阪市工研)

カロチノイド色素の一種で、サケやオキアミ、カニ、エビなどに含まれるアスタキサンチン(以下Axと略す)は、ベータカロチン、トコフェロール、トコトリエノールよりも強い抗酸化活性や、抗癌・免疫力増強作用などを持っている。これらの機能性が注目され、Axは食品添加物、健康食品、化粧品基材などに利用されている。Axを生産する微生物として数種の酵母・細菌・緑藻類などが知られているが、これらのうち緑藻*Haematococcus pluvialis*のアセトン抽出物(粗Ax、Ax含量14.6 wt%)がAx標品として市販されている。この粗Axに含まれるAxは遊離体とその脂肪酸エステル体の混合物(遊離体/モノエステル体/ジエステル体=5:80:15, モル比)である。しかし粗Axに含まれるAx含量はあまり高くないことから、Ax高濃度標品の開発が要望されている。そこで我々は、2段階酵素反応を含む工程がAxの高濃度化に効果的であることを見出した。粗Ax中に含まれている主たる夾雑物は中性脂質(41.6 wt%)と遊離脂肪酸(24.9 wt%)である。粗Axをそのまま分子蒸留した時、遊離脂肪酸は留分として除去されるが、中性脂質はAxと共に蒸留残渣に残るため、Ax含量を1.3倍までしか高めることができなかった。そこで、リパーゼを用いて中性脂質を選択的に加水分解して遊離脂肪酸に変換すれば、蒸留によるAxの精製が容易になると考えた。粗Ax中に含まれる中性脂質の加水分解に最も適した条件は、水と粗Axの重量比が1:1、*Candida rugosa*由来のリパーゼが反応系1gに対して50 U、反応温度30℃であった。またAx遊離体とエステル体の組成比はこの酵素反応の前後でほとんど変化しなかった。得られた反応液の油層を分子蒸留で精製したところ、初発のAx含量の2.8倍(40.8 wt%)にまで濃縮された標品が得られた(以下Ax40と略す)。しかし、Ax40に含まれている未同定夾雑物質は分子蒸留で除去できず、これ以上Ax含量を高めることができなかった。そこで、*n*-ヘキサンに対してAxエステル体は良く溶けるが遊離体はあまり溶けないという性質を利用し、リパーゼを用いてAxエステル体を遊離体に変換し、*n*-ヘキサン分画によりAxを精製することを試みた。Ax40/水(1:1, wt/wt)、および500 U/gの*Pseudomonas aeruginosa* リパーゼからなる反応混液を30℃で68時間反応させたところ、Axエステル体が遊離体に変換され、全Axに対する遊離体含量は65.4 mol%に達した。さらに全脂肪酸に対して5倍モル当量のエタノールを反応系に添加することにより、リパーゼが基質として認識しにくい脂肪酸エチルエステルが生成し、Ax遊離体含量は89.3 mol%まで高められた。最後に、反応混液の*n*-ヘキサン分画で沈殿を回収することによりAx遊離体を精製した。このような2段階酵素反応を含む工程により、Ax含量を70.3 wt%(遊離体:モノエステル体:ジエステル体=93:7:0.5、粗Axからの収率63.9%)にまで高めることができた。

参考文献 Nagao, T., Fukami, T., Horita, Y., Komemushi, S., Sugihara, A., and Shimada, Y.: Enzymatic enrichment of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* cell extracts. **80**, 975-981 (2003).

Enzymatic purification of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*

○Toshihiro NAGAO, Yuji SHIMADA
(Osaka Municipal Technical Res. Inst.)

Key words astaxanthin, lipase, *Haematococcus pluvialis*, enzymatic purification

2S3-PM5 Phospholipase D によるレシチンの phosphatidylserine への変換

○山根 恒夫, 岩崎 雄吾
(名大院・生命農)

Phosphatidylserine (PS) は大豆や卵黄由来レシチンにはほとんど含まれていないが、動物の臓器とくに脳に多く存在している。1990年代に欧米で牛脳由来のPS(BC-PS)が加齢に伴う記憶力減退(AAMI)や老人性痴呆症その他の疾患に効果があるという臨床結果が報告され、PSは健康食品として利用されるようになった。その後、狂牛病(BSE)との関連でBC-PSが使用できなくなり、phospholipase D(PLD)のフォスファチジル基転移反応を利用して大豆由来のレシチンから製造されるPS(TP-PS)が市販されている。本シンポジウムでは、TP-PSの製造法、PLDの探索、および構造と触媒機構について述べる。

1) TP-PSの製造 PLDのフォスファチジル基転移活性は古く1967年に植物由来PLDで発見された。演者の研究室では1988年頃からこの反応についてキャベツ由来および放線菌*Streptomyces antibioticus*由来PLDについて研究を行っている。転移活性は放線菌由来のものが強いこと、酢酸エチルやエーテルを使う2相系が良いこと、生成するコリンによって阻害される等を見出した。興味深いのは、D-セリンを受容体とした場合で、キャベツPLDはまったく反応しないが、放線菌PLDはD-体の方がL-体より2倍程良く反応しphosphatidyl-D-serineを生成したことである。反応系については、従来実験室では2液相系で研究されてきたが、工業的食品生産には問題がある。水系ではPSの生成含量は20%程度であり、現在市販されているもののPS含量もこの程度である。演者らは水系でもっと高含量にPSを合成する方法はないかと鋭意検討し、硫酸カルシウムの微粉末を加えるとPS含量が80%(高濃度の低純度レシチンでは50%)となることを見出した。この方法について、PSの回収法および残存セリンの再利用法(セリンは高価なのでその再利用が必須)も確立できている。

2) PLDの探索 強力な転移活性を有する微生物PLDの探索は1970年代から日本の幾つかの企業[東洋醸造(現旭化成)、名糖産業、ヤクルト、ホーネンコーポレーション(現J-OIL MILLS)等]で広範囲に行われ、有力株が多数保有されている。興味深いのは、転移活性を有するPLD生産菌は放線菌およびその類縁菌に限られることである。また、PLD生産菌の探索は伝統的にはレシチンを唯一の炭素源とする資化性とそれに続く試験管培養の上澄液のPLD活性の測定という煩雑な方法であったが、最近演者らは寒天平板上の発色という簡便な方法を開発した。

3) PLDの構造と反応機構 演者らはホーネンコーポレーションとの共同研究により*St. antibioticus* PLD遺伝子のクローニング、組替え大腸菌での過剰発現、名大院・工・山根 隆教授との共同研究による結晶化、3D構造の解明、および部位特異的変異による活性部位の同定、反応機構の推定等を行ってきた。PLDは双子のようにほぼ類似した構造のN末端側ドメインとC末端側ドメインが対面しているような構造を取っており、それぞれの対面部分に存在するHKD(ヒスチジン-リシン-アスパラギン酸) motif が活性中心となっている。蛍光標識人工基質を用いた実験によってC末端側のNが基質との複合体形成に関与していると推定したが、立体構造を考慮するとこれは困難であるとの指摘もあり、さらに検討が必要である。

Conversion of lecithin to phosphatidylserine by phospholipase D

○Tsuneco YAMANE, Yugo IWASAKI
(Grad. Sch. Biol. Agr. Sci., Nagoya Univ.)

Key words lecithin, phosphatidylserine, phospholipase D, transphosphatidyltion