

光合成細菌 *Rhodopseudomonas sphaeroides* によるユビキノン Q₁₀ の生産

青山 康 司・家 花 充 紀

Production of Ubiquinone Q₁₀ by *Rhodopseudomonas sphaeroides*

Yasushi AOYAMA and Mitsunori IEHANA

For optimum production of Ubiquinone Q₁₀ (UQ-10), culture conditions favorable to growth of a photosynthetic bacterium, *R. sphaeroides* were examined. Breeding of variants suitable for treating effluents from food factories was also performed. The quantity of UQ-10 formed within the bacterial cells was not affected by any carbon source tested. The productivity of UQ-10 was hardly improved by the addition of a carotenoid synthesis inhibitor or an intermediate in the ubiquinone biosynthesis to the medium. On the other hand, from the bacterium mutagenized by ultraviolet light irradiation, a stable photosynthetic bacterium variant capable of assimilating sucrose was isolated and bred. This variant made it feasible to simplify the process for producing UQ-10 from the mandarin orange molasses.

光合成細菌による排水処理法については、多くの報告^{1)~4)}が出されており、その利点として高濃度の有機排水が処理できるので多大な建設費を必要としないこと、単一菌を用いるので装置の運転管理が比較的容易であること、および特定の食品工場排水の処理に有効であることが指摘されている。しかし、バイオマスの有効利用の観点から考えると、この処理法をさらに発展させ、菌体および菌体成分の利活用を図る必要がある。

光合成細菌 *Rhodopseudomonas sphaeroides* の有効利用法として菌体内に高濃度のユビキノン Q₁₀ (以下ユビキノンと略記) を蓄積することが知られている⁵⁾。ユビキノンは心不全症、栄養障害による筋ジストロフィー、貧血症等に有効であることが認められている生理活性物質であり、医薬品としても価値の高い物質である⁶⁾。

そこで、光合成細菌 *R. sphaeroides* によるユビキノンの生産に関する基礎的知見を得る目的で、その培養条件および基質である食品排水 (ミカンモラセス) に適した菌株の育種について検討した。

実験方法

1. 供試菌株

光合成細菌としては *Rhodopseudomonas sphaeroides* IFO 12203 を用いた。

2. 使用培地

リン酸水素二カリウム 0.5 g, リン酸二水素カリウム 0.5 g, リン酸二アンモニウム 0.8 g, 硫酸マグネシウム六水塩 0.2 g, 塩化カルシウム二水塩 0.053 g, ニコチン酸 1 mg, チアミン塩酸塩 1 mg, ビオチン 0.01 mg, 硫酸アンモニウム鉄 2.5 mg, 硫酸マンガン五水塩 1.2 mg, 塩化コバルト六水塩 0.95 mg を基本組成^{7) 8)} とし、必要に応じて糖、有機酸塩および酵母エキスを加え、精製水で 1 l (pH 7) にして使用した。また、前培養は基本組成に 0.025% 酵母エキスおよび炭素源として 0.15% グルコース, 0.15% 酢酸ナトリウムを加えて使用した⁸⁾。モラセス培地はミカンモラセス 100 g に純水 100 ml を添加し、105℃, 30分加熱後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) し、その上清をモラセス希釈液として使用した。

3. 培養方法

好気暗培養は 500 ml 坂口フラスコを用い、30℃で振とう (120 rpm) 培養を行った。嫌気明培養は 200 ml 広口瓶を用い、側面から蛍光灯で光を照射 (10 klux) し、窒素ガスを吹き込みながら、30℃でスターラーによる攪拌培養を行った。なお、菌体の生育とともに培養液の pH が低下するので、サンプリング時に pH を調節した。

4. 菌体濃度の測定

菌体濃度は培養液の吸光度 (660 nm) から求めた。

また、乾菌体濃度は培養終了後、精製水により洗浄した菌体を105℃で24時間乾燥後、重量を測定し、吸光度(660nm)との相関から求めた。

5. 成分分析法

(1) 糖の定量

糖の定量は高速液体クロマトグラフ(HPLC)(日立製作所, L-6000形), 示差屈折検出器(日立製作所, L-3300形)を用いて行った。カラムはゲルろ過カラム Gelpack GL-C614(日立化成)を用い, カラム温度55℃, 移動相としては精製水, 流量1.0ml/minで分析した。

(2) ユビキノンの定量

菌体中のユビキノンの分析は, 山田⁹⁾の方法に準じて菌体からエタノール: ジエチルエーテル=3:1(v/v)溶液で抽出後, HPLC(日立製作所, L-6000形)を用いた。カラムはLiChrospher 100RP-18(e)(関東化学)を用いた。分析条件はカラム温度45℃, 移動相メタノール: イソプロピルエーテル=4:1(v/v), 流量0.7ml/minで行った。検出はUV検出器(日立製作所, L-4200形)で270nmの吸収を測定して行った。

6. 光合成細菌の変異操作

炭素源として0.15%グルコース, 0.15%酢酸ナトリウムを加えた培地で3日間振とう培養後, 培養液に約50cmの距離から紫外線を1~2分照射した。その後, 0.3%スクロース最小培地のプレートに塗布し, コロニーをスクロース資化性変異株として選抜した。

実験結果および考察

1. *R. sphaeroides* のユビキノン生成に及ぼす培地組成の影響

R. sphaeroides の菌体内ユビキノン生成に及ぼす培地組成, 特に炭素源の影響について検討した。炭素源としてグルコース, フルクトース, 酢酸ナトリウムおよびグルコース+酢酸ナトリウムについて調べ, その添加濃度は既報⁸⁾に基づいて0.3%とした。また, 培養法としては好気暗および嫌気明培養で行い, 菌体内ユビキノン生成量を比較した。その結果, 炭素源の種類に関係なく, 嫌気明条件では約4.0mg/g乾菌体, 好気条件では約1.5mg/g乾菌体であった。

つぎに, 酵母エキスを添加して複合培地で培養してみた。その結果, 0.025%酵母エキスの添加は立ち上がりの増殖に効果を示したが, 嫌気明培養においてユビキノンの生産量はどちらも約4.0mg/g乾菌体と異差は認められなかった。

2. *R. sphaeroides* のユビキノン生成に及ぼす培養条件の影響

ユビキノンの生産性を高める条件を考えてみると, ①高い比増殖速度で高濃度培養を行うこと, ②ユビキノンの菌体含量を増やすこと, の2点が考えられる。

そこで, ①に注目してグルコース濃度を0.3%から1.0%に上げて嫌気明で培養を行った。その結果を図1に示した。ユビキノンの菌体含量は約7.0mg/g乾菌体まで上昇したが, 基質当りの菌体収率が低下し, しかも乾菌体濃度1.0g/l(660nm, 吸光度2.7)ぐらいから比増殖速度の低下が認められた。原因として生産物阻害と光量不足が考えられる。まず生産物阻害が原因かどうかを調べるため0.3%グルコースで繰り返し回分培養を行った。その結果を図2に示した。1.0%グルコースの時と同様培養後期に比増殖速度の低下が認められた。このことから生産物阻害ではないと考えられる。また, 1.0%グルコースで培養すると, 培養後期に光量不足時に生ずる発酵代謝産物である乳酸の顕著な蓄積が認められた。以上のことから現培養装置では乾菌体1.0g/lを越えると光量不足になると推察される。

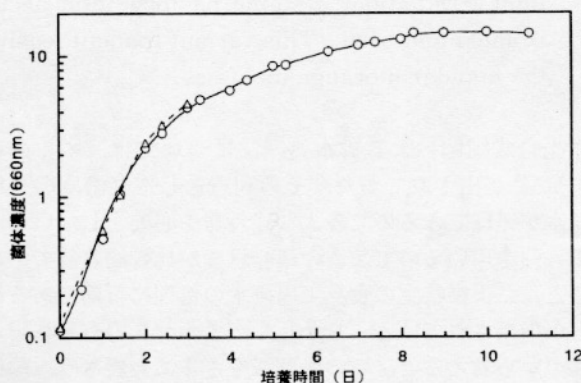


図1 *R. sphaeroides* の嫌気明培養による増殖曲線
培養温度 30℃
○, グルコース1.0%; △, グルコース0.3%

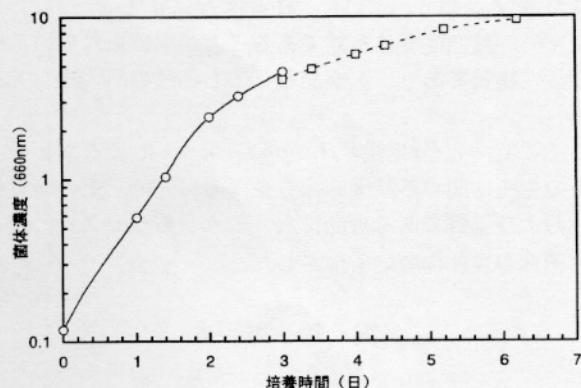


図2 *R. sphaeroides* の嫌気明繰り返し回分培養*による増殖曲線
培養時間3日で菌体を集菌し, 新しい培地に植菌して培養

○, 1回目; △, 2回目

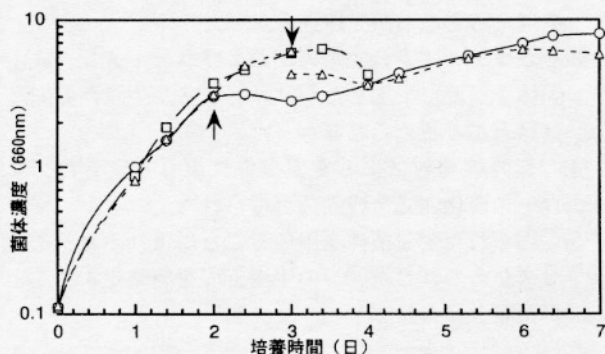


図3 *R. sphaeroides* の増殖に及ぼす培養条件の変化（好気暗から嫌気明）の影響

矢印は培養条件を変化指せた時期を示す

○, 2日目に好気暗から嫌気明に (1.0%グルコース)

□, 4日目に好気暗 (1.0%グルコース)

△, 3日目に好気暗から嫌気明に (1.0%グルコースから集菌後0.3%グルコース)

そこで、嫌気明培養より生育速度の速い好気暗条件で培養後、ユビキノン生成量の高い嫌気明培養に移してユビキノンを生産させる方法を考えた。その結果を図3に示した。呼吸から光合成への変換に1~1.5日かかり、この程度の菌体濃度では効率的ではないと考えられた。ジャーファメンターを用い好気暗で高濃度化を目指したが培養液が粘性を持つようになり、以後の操作が困難であった。

つぎに、②に注目してユビキノン合成中間体およびカロチノイド合成阻害剤を培地に添加してユビキノンの生産性に及ぼす影響を調べた。ユビキノン合成中間体としてp-ヒドロキシ安息香酸 (50mg/100ml)、カロチノイド合成阻害剤としてニコチン (50 μ l/100ml) を添加した¹⁰⁾。その結果を表1に示した。ユビキノン含有量は無添加と比較して有意な差がなく、好気暗、嫌気明培養ともに生産性の向上にはつながらなかった。

表1 *Rhodospseudomonas sphaeroides* のユビキノン生成に及ぼすp-ヒドロキシ安息香酸およびニコチンの影響

培養条件	無添加	p-ヒドロキシ安息香酸*	ニコチン**
好気暗	0.15%	0.12%	0.18%
嫌気明	0.54%	0.54%	0.56%

*ユビキノン合成中間体 50mg/100ml

**カロチノイド合成阻害剤 50 μ l/100ml

3. スクロース資化性菌株の育種

つぎに、ミカンモラセスからユビキノンを生産する場合問題となる糖の資化性に関する検討を行った。現在用いている光合成細菌にはスクロース資化性はわずかしかない。しかし、ミカンモラセス希釈液中の糖組成はスクロース19.6%、グルコース20.5%、フルクトース21.8%であり、この光合成細菌を用いる場合、スクロースを

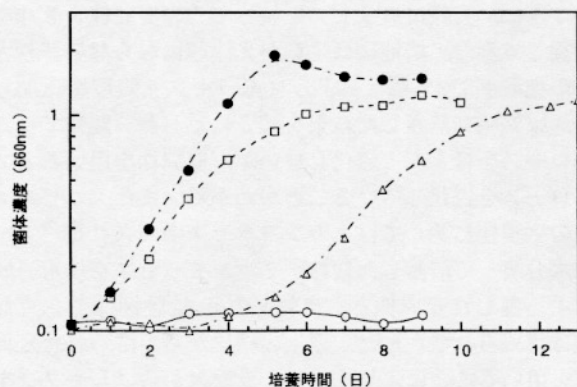


図4 変異株のスクロース資化性テスト

○, 親株; □, S1株; △, S2株; ●, S3株

塩酸分解しなければならない。塩酸分解すると後に中和操作も必要で工程が複雑になりコスト面で大変不利である。そこで、親株でもわずかながらスクロース資化性があることから、変異操作によりスクロース資化性の高い菌株の取得を試みた。

その結果、スクロース資化性の高い菌株が数株得られた。代表的な変異株S1, S2, S3株と親株のスクロース資化性を図4に示した。得られた変異株の中でS3株が最もスクロース資化性が高く、増殖が良いことが明ら

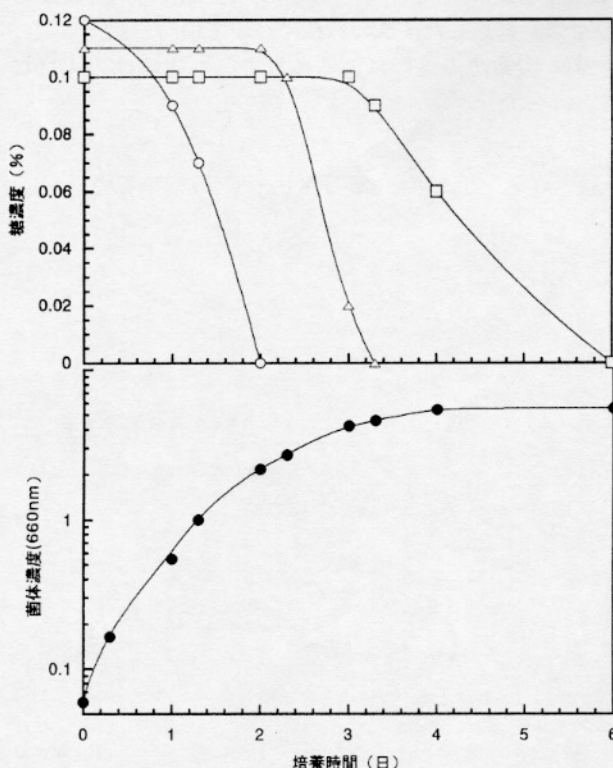


図5 ミカンモラセス培地における変異株S3株の増殖性および培地中の糖変化

○, グルコース; △, フルクトース; □, スクロース
●, 菌体濃度

かとなった。今後この株を用いて検討することとした。

つぎに、実際にモラセスを使ってこの変異株 S 3 株を培養してみた。培地には生育が光律速にならないぎりぎりの糖濃度 0.3% になるようにモラセス希釈液を添加した。嫌気明で培養した結果を図 5 に示した。親株ではスクロースをほとんど資化しないが、変異株を用いるとスクロースを資化していることがわかる。また、ユビキノンの生産性に関してはミカンモラセス中のスクロースを加水分解して培養した親株、ミカンモラセスを加水分解せず培養した変異株ともに約 4.0 mg/g 乾菌体で有意な差は認められなかった。以上の結果から、得られた変異株を用いることによりミカンモラセスからユビキノンを生産する場合、ミカンモラセス中のスクロースを炭素源としてそのまま利用できることがわかった。

今回の結果から光合成細菌 *R. sphaeroides* によるミカンモラセスからのユビキノンの生産に関する基礎的知見を得ることができたと考えられる。ユビキノンの生産の実用化のためには、さらに光効率のよい培養装置の開発が必要と考えられる。今後はこの点についても検討を加えていく予定である。

要 約

光合成細菌 *R. sphaeroides* によるユビキノン Q₁₀ の生産の培養条件を調べ、実用面から食品排水（ミカンモラセス）に適した菌株の育種について検討した。

- (1) 炭素源の違いによるユビキノン生産性の差はなかった。

- (2) 今回用いた嫌気明培養装置では乾菌体濃度 1.0 g/l を越えると増殖が光律速となった。
- (3) カロチノイド合成阻害剤およびユビキノン合成中間体を培地に添加したが、ユビキノン生産性の向上はほとんど認められなかった。
- (4) 紫外線照射による変異操作により安定したスクロース資化性光合成細菌が得られた。
- (5) 得られた変異菌株を用いることによりミカンモラセスからのユビキノンの生産工程を簡略化することが可能となった。

文 献

- 1) 小林達治：化学と生物，8，604 (1970)。
- 2) 小林正泰：食品工業，14，19 (1971)。
- 3) 北村博：食品工業，17，44 (1974)。
- 4) 北村博：用水と廃水，18，23 (1976)。
- 5) 平山修：発酵と工業，36，563 (1978)。
- 6) 相田浩，内田欣哉：バイオテクノロジー，丸尾文治編（学会出版センター，東京），p.78 (1985)。
- 7) 佐々木健：広島大学工学部博士論文，p.6 (1981)。
- 8) 家花充紀：平成 2 年度技術開発研究費補助事業成果普及講習用テキスト，p.3 (1991)。
- 9) 山田雄三，倉石衍：微生物の化学分類実験法，駒形和男編（学会出版センター，東京），p.145 (1985)。
- 10) TEIZI URAKAMI and MAKIKO HORI-OKUBO: *J. Ferment. Technol.*, 66, 323 (1988)。