

キシロースをキシリトールに変換する 微生物のスクリーニング

松 村 博 子
川 端 康 之

I. 緒 言

D-キシリトールは、五単糖の糖アルコール (図1) で、イチゴやカリフラワーをはじめとする多くの果物や野菜中に存在する¹⁾。1997年4月より厚生省 (現厚生労働省) から食品添加物として指定され、現在ではチューインガムをはじめとするオーラルケア商品に広く利用されるだけでなく、肌荒れ改善といったスキンケア商品にも利用されている²⁾。キシリトールは、砂糖と同程度の甘味を持ちながら、結晶が溶解するときの吸熱量が高いため冷たくさっぱりとした味を有していて、後味に苦味が残らないことを特徴とする。また、糖アルコールであることから、熱および酸安定性に優れていることから缶紅茶・缶コーヒーなどの缶飲料にも用いられている¹⁾。

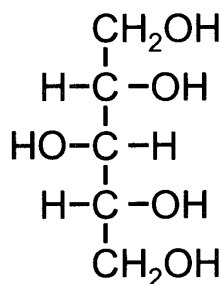


図1 D-キシリトールの構造式

現在使用されているキシリトールは、白樺や樅等の樹木から採れるヘミセルロースであるキシラン (キシロースが多数結合した多糖類) から酸加水分解によりキシロースを作り、キシロースを接触還元法でキシリトールへと変換される¹⁾。接触還元法はアルカリ性条件、高温高圧下で反応が行われ、水素を必要とすることから設備が高価であり、副生成物を除去する必要がある。また、使用されるニッケル触媒も高価であり、キシリトール 1kg の価格は約¥1,000 であり、他の糖類や糖アルコールと比較してかなり高価である (砂糖は¥100/kg)。

このようなことから、酵母や糸状菌によるキシリトール生産が注目されている³⁾。酵母や糸状菌は、キシロースを資化するとき NADPH 依存性キシロースレダクターゼにより、キシロースをキシリトールに還元後、キシロースに酸化しペントースリン酸経路で代謝することが知られている。そこで、このような微生物の酵素系を利用してキシロースをキシリトールに変換することが可能である。いくつかの酵母では、キシロースやキシロースを含むキシラン加水分解物を原料にキシリトールを調製できることが報告されているが³⁾、工業化された例はない。

我々は、酵母によるキシリトール生産系の確立を目指すこととし、本研究では、今回入手した酵母について、キシリトール生産能を検討して生産条件について得た知見についてまとめた。

II. 実験方法

1. 菌株と培養条件

実験に使用した酵母は、財団法人発酵研究所 (IFO) より入手した 12 種類の *Candida* 族を用いた (表 1)。培地は YMP 培地 (0.2%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.3%ペプトン、それぞれ終濃度) に別滅菌したキシロースを加えたものを用いた。500 ml 容の片付フラスコに 1%キシロースを含む YMP 培地 100 ml を調製し酵母を 1 白金耳接種した。培養は 30°C で 3~4 日往復振盪培養 (105 往復/分) で行なった。

表 1 本研究で使用した酵母

Symbols*	IFO Nos.	Names
A	0436	<i>Candida mogii</i>
B	1633	<i>Candida sake</i>
C	1634	<i>Candida sake</i>
D	10305	<i>Candida parapsilosis</i>
E	0437	<i>Candida guilliermondii</i>
F	0837	<i>Candida guilliermondii</i>
G	1941	<i>Candida versatilis</i>
H	1908	<i>Candida versatilis</i>
I	0438	<i>Candida mogii</i>
J	1942	<i>Candida etchellsii</i>
K	0452	<i>Candida norvegica</i>
L	10219	<i>Candida parapsilosis</i>

*図 2 で使用した記号を示した。

2. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC は Merck 社製シリカゲル 60 を用いた。標準物質には、キシロースとキシリトール (どちらも和光純薬製) を用い、展開溶媒には、アセトニトリル:酢酸エチル:n-プロパノール:水 (85:20:20:15、(V/V)) を用いた。発色はアルカリ性硝酸銀法⁴⁾で行なった。硝酸銀-アセトン溶液 (アセトン 200 ml に飽和硝酸銀溶液 1 ml を加え、硝酸銀が溶けるまで水を滴下して調製したもの) に、展開後乾燥させた TLC プレート を 5 分間浸した。乾燥後、メタノール-水酸化ナトリウム溶液に浸し、スポットが観察されるまで (約 1~2 分) 発色させた。最後に 0.15 M チオ硫酸ナトリウム-0.08 M 亜硫酸ナトリウム-0.25 M 亜硫酸水素ナトリウム溶液に 1 分浸し、発色を固定させた。

3. 高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD)

培地中のキシロース残存量とキシリトール生成量は高性能陰イオン交換クロマトグラフィーシ

システム (Dionex DX-500) で定量した⁵⁾。

Ⅲ. 結果と考察

1. 一次スクリーニング

1%キシロースを含む YMP 培地を用いて一次スクリーニングを行なった。30°Cで3日間培養後の培養上清を TLC で分析し、キシリトール生成について検討した。(図2)。通気条件を考慮し、シリコセン (信越シリコーン) と綿栓の2種類の条件を試みた。シリコセンと綿栓を比較した場合、綿栓では培地中のキシロースを資化しキシリトールを生産しない、もしくはキシリトールも速やかに資化されたものが多く見られた。綿栓はシリコセンに比べて通気性が良い為、通気量を制限する方がキシリトール生産には有利であることがわかった。図2より B 株 (IFO 1633)、C 株 (IFO 1634)、D 株 (IFO 10305)、E 株 (IFO 0437)、F 株 (IFO 0837)、L 株 (IFO 10219) を選抜し次の実験を行なった。

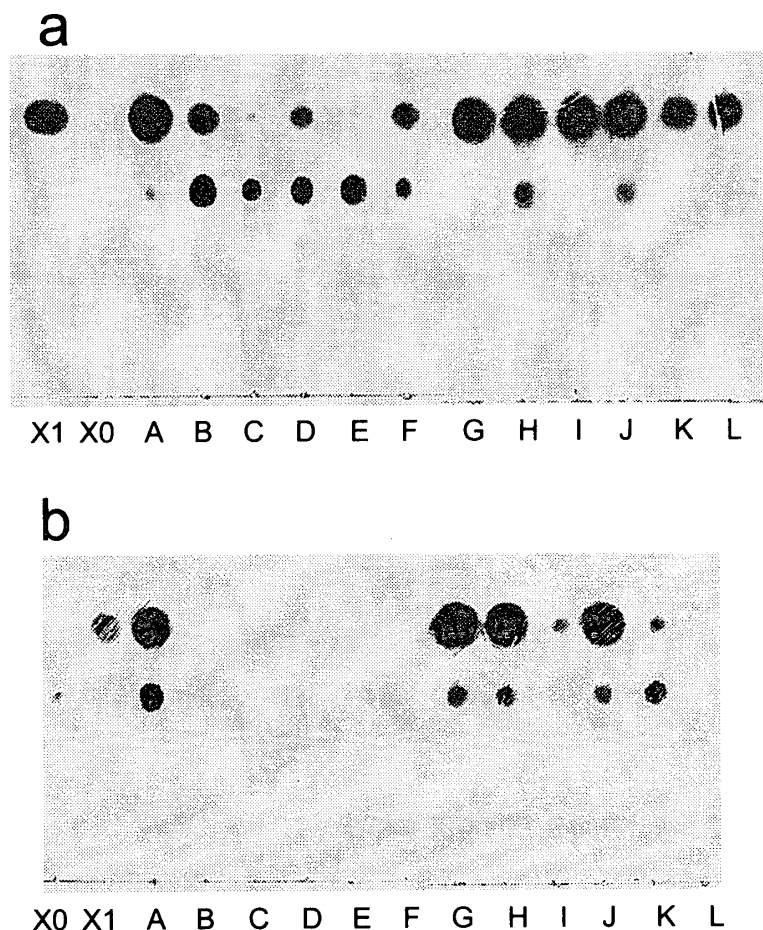


図2 各酵母のキシリトール生産量の比較

a, シリコ栓; b, 綿栓

1%キシロースを含むYMP培地で30°C3日間培養後、
培養上清を分析した。A-L, 表1に示した菌株。

X0, xylitol; X1, xylose; A-L, 各酵母の培養上清液2 μ l

2. 二次スクリーニング

一次スクリーニングで選抜した株についてシリコセンを用いて同様に培養を行ないキシロースの消費とキシリトール生成の経時変化について検討した。図3より全ての酵母においてキシロースが完全に消費された時点で、キシリトール生成のピークを向かえることがわかった。培養2日目に全てのキシロースが消費されキシリトール生成のピークを向かえたもの IFO 1633 (図3-A)、IFO 1634 (図3-B)、IFO 10219 (図3-F)、培養3日目にピークを向かえたもの IFO 10305 (図3-C)、培養4日目にピークを向かえたもの IFO 0437 (図3-D) それ以後にピークを向かえると思われる IFO 0837 (図3-E) とそれぞれ異なった時期のキシリトール生成ピークが見られた。培養初期にキシロースが全て消費されてしまうものでは、キシリトール生成のピーク以後キシリトールも酵母に消費された。キシロースからキシリトールへの変換率は、最も効率の良かった IFO 1633 (図3-A) で 25%程度であった。

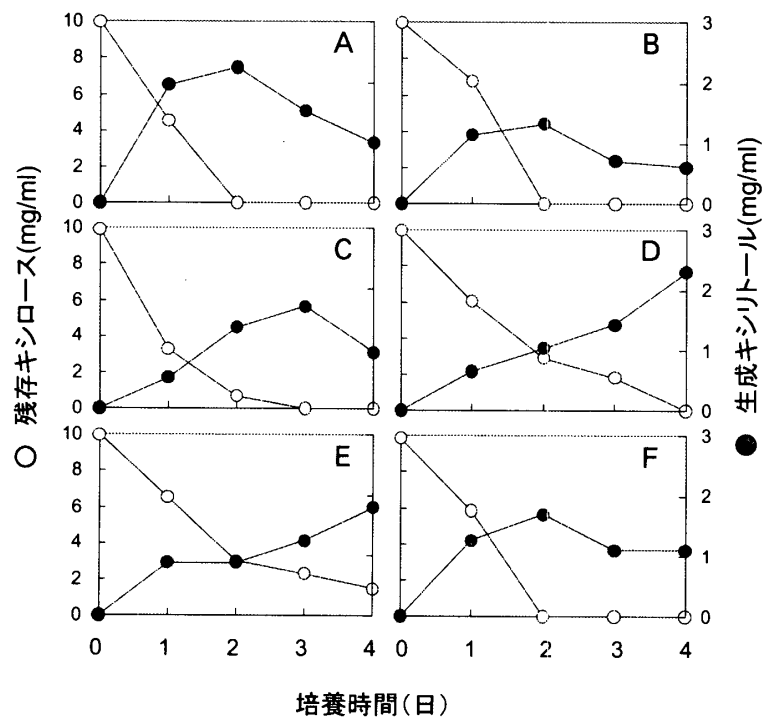


図3 キシリトール生産とキシロース消費の経時変化

A, IFO1633; B, IFO 1634; C, IFO 10305;
D, IFO 0437; E, IFO 0837, F, IFO 10219

3. キシロース濃度がキシリトール生産に与える影響

培養開始時のキシロース濃度の違いによるキシリトール生成量の変化について検討した。

IFO 1633、IFO 10305 の2株を選抜し、キシロースの濃度を1%、2%、3%、4%の4種類で実験を行った。図4より、IFO 1633、IFO 10305 共に2%、3%、4%、のキシロースを入れた培養液では、キシリトール生産量は増加するが、培養3日目においても培地中に残存するキシロースの量も増加した。一方1%のキシロースを入れた培養液では、どちらの菌株でも3日目にキシロースがなくなり、培養液中にはキシリトールのみが生成されていた。4%程度であれば酵

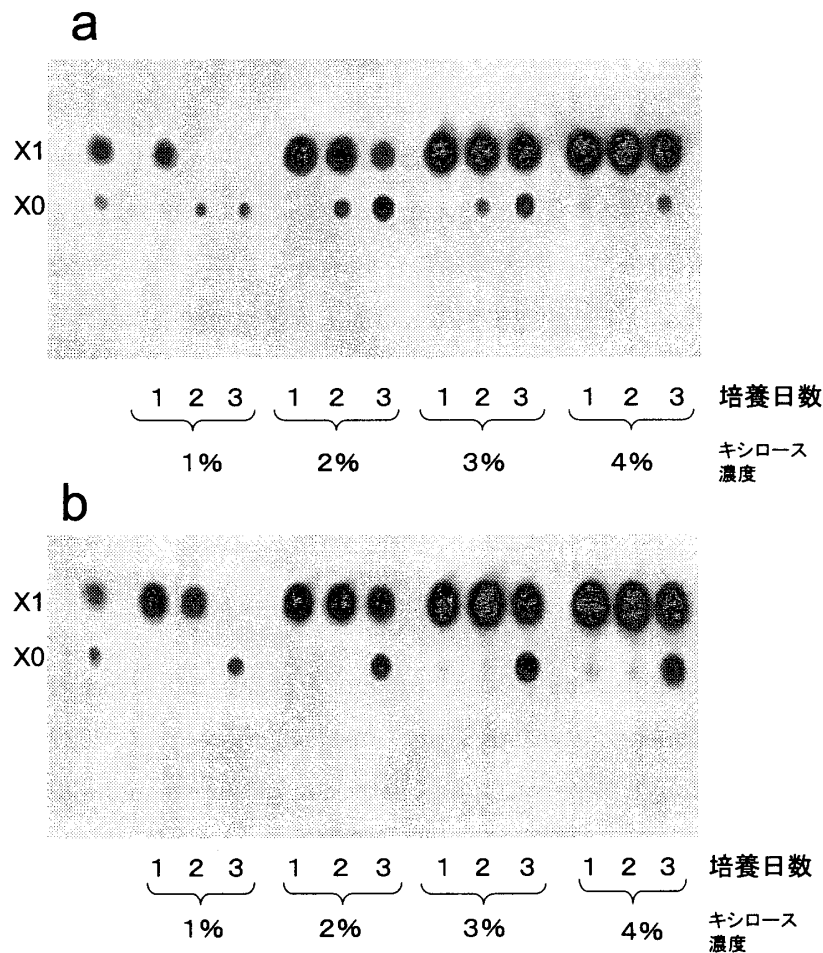


図4 キシロースの濃度がキシリトール生産に与える影響

a, IFO 1633; b, IFO10305
X1, xylose; X0, xylitol

母は活発に生育するとともに、キシリトールを生産することがわかった。ただし、培養液中に残存するキシロース量も増大し、キシリトールを取り出すには分離する必要があり、実用的でない。分離の手間を省くため、できる限りキシリトールへと変換する条件の検討が必要である。

以上示したように、今回入手した *Candida* 族酵母においてキシリトール生産株が得られた。これらを用いてフラスコ培養においていくつか条件検討を行ったところ、培養液への酸素の供給により、キシリトール生産性が大きく変化することがわかった。Saha と Bothast の報告⁶⁾によると、増殖期は酸素を多く供給し、定常期に達したところで酸素の供給を制限するとキシリトールの生産量が増えることが観察されている。フラスコ培養ではそのような酸素供給の制御は困難であるため、ジャーフェーマンターを用いた条件の最適化が必要である。また、増菌した酵母を固定化しバイオリクターとしてキシリトールの生産が可能であると考えられ、今後の検討課題としたい。一方、原料の濃度については、高ければ高いほど後の濃縮工程に必要なエネルギーがかからず有利であるが、酵母という生物を使う以上 20%程度が限度と考えられる。育種などの技術を用いてさらに耐糖性のある酵母を開発する必要がある。

IV. 要 約

Candida 族の酵母 12 株についてキシリトール生産能を検討したところ、9 株についてキシリトール生産を確認した。これらを用いてキシリトールの生産条件を検討したところ、培養液への酸素供給がキシリトール生産に大きく影響を与えることがわかった。キシリトール生産の経時変化を検討したところ、キシロースの資化を終えたところでキシリトールの生産が最大になった。その収率は、最大で 25% であった。培養開始時のキシロース濃度について検討したところ、キシロース濃度を上げるとキシリトールの生産量も増加するが、培地中に残存するキシロース量も増加した。

V. 参考文献

- 1) 崎山淳子：キシリトールの特性と食品への応用。月刊フードケミカル、1997(6), 23-28。
- 2) キシリトールに肌荒れ改善効果を発見：Shiseido Technical Letter, <http://www.shiseido.co.jp/s9604let/html/let0017t.htm> (1999)。
- 3) S. S. Silva, M. G. A. Felipe, and I. M. Mancilha: Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70/72**, 331-339 (1998).
- 4) N. S. Han and J. F. Robyt: Separation and detection of sugars and alditols on thin layer chromatograms. *Carbohydr. Res.*, **313**, 135-137 (1998).
- 5) 川端康之、戸枝一喜、畠恵司: 変敗したネマガリタケ水煮缶詰から分離された *Bacillus subtilis* によるネマガリタケの軟化機構。日食微誌、**16**(3), 157-161 (1999)。
- 6) B. C. Saha and R. J. Bothast: Production of xylitol by *Candida peltata*. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, **22**, 633-636 (1999).