

論文目録

氏名

天橋裕一



学位論文

題目

不織布を担体とした固定化流加培養を用いた *Candida tropicalis* によるキシリトール生産に関する研究

学位論文の基礎となる学術論文

題目

Production of Xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of Production Rate

著者名

Hiroyuki Horitsu, Yuuichi Yahashi, Kazuhiro Takamizawa, Keiichi Kawai, Tohru Suzuki and Noriyasu Watanabe

学術雑誌名

Biotechnology and Bioengineering に発表・発表予定

(巻・号・頁)

( 40 . 9 . 1085 ~ 1091 )

発行年月

1992 年 11 月

題目

Production of Xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis*: the Effect of D-Glucose feeding

著者名

YUUCHI YAHASHI, HIROYUKI HORITSU, KEIICHI KAWAI, TOHRU SUZUKI, AND KAZUHIRO TAKAMIZAWA

学術雑誌名

Journal of Fermentation and Bioengineering に発表・発表予定

(巻・号・頁)

( 81 . 2 . 148 ~ 152 )

発行年月

1996 年 2 月

題目

D-GLUCOSE FEEDING FOR IMPROVEMENT OF XYLITOL PRODUCTIVITY FROM D-XYLOSE USING *Candida tropicalis* IMMOBILIZED ON A NON-WOVEN FABRIC

著者名

Y. Yahashi, M. Hatsu, H. Horitsu, K. Kawai, T. Suzuki and K. Takamizawa

学術雑誌名

Biotechnology Letters に発表・発表予定

(巻・号・頁)

( 18 . 12 . 印刷中 )

発行年月

1996 年 12 月



既 発 表 学 術 論 文

題 目 Optimization of Kojic Acid Production Rate Using  
the Box-Wilson Method

著 者 名 KAZUHIRO TAKAMIZAWA, SHINOBU NAKASHIMA, YUICHI YAHASHI,  
KILUNGA B. KUBATA, TOHRU SUZUKI, KEIICHI KAWAI, AND HIROYUKI HORITSU

学術雑誌名 Journal of Fermentation and Bioengineering に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( 82 ・ 4 ・ 414 ~ 416 )

発行年月 1996 年 10 月

題 目 .....

著 者 名 .....

学術雑誌名 ..... に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( ..... ~ ..... )

発行年月 ..... 年 ..... 月

題 目 .....

著 者 名 .....

学術雑誌名 ..... に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( ..... ~ ..... )

発行年月 ..... 年 ..... 月

題 目 .....

著 者 名 .....

学術雑誌名 ..... に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( ..... ~ ..... )

発行年月 ..... 年 ..... 月



不織布を担体とした固定化流加培養を用いた *Candida*  
*tropicalis* によるキシリトール生産に関する研究

1996年

岐阜大学大学院連合農学研究科  
生物資源化学科  
(岐阜大学)

矢橋 裕一



②

不織布を担体とした固定化流加培養を用いた *Candida tropicalis* によるキシリトール生産に関する研究

矢橋裕一



## 目次

序章 .....	1
文献 .....	11
第一章 遊離菌体を用いた回分培養での培養条件の最適化 .....	17
1-1. 緒言 .....	17
1-2. 材料および実験方法 .....	21
1-2-1. 使用菌株および前培養 .....	21
1-2-2. 培地組成および調整法 .....	22
1-2-3. 培養方法 .....	22
1-2-4. 分析方法 .....	24
1-2-5. 最適化方法 .....	26
1-3. 実験結果および考察 .....	27
1-3-1. 通気速度が $K_La$ に及ぼす影響 .....	27
1-3-2. 1次計画の適用 .....	30
1-3-3. 2次計画の適用 .....	31
1-3-4. 最適点でのキシリトール生産結果 .....	41
1-4. 結論 .....	43
文献 .....	45
 第二章 遊離菌体を用いたグルコース流加培養 .....	48
2-1. 緒言 .....	48
2-2. 材料および実験方法 .....	51
2-2-1. 使用菌株および前培養 .....	51
2-2-2. 培地組成および調整法 .....	51
2-2-3. 培養方法(カラムリアクター) .....	51
2-2-4. 培養方法(2リットル規模のファーマンター) .....	51
2-2-5. グルコース流加方法 .....	52
2-2-6. 分析方法 .....	52



2-3. 実験結果および考察 .....	53
2-3-1. 流加基質の違いが菌体増殖に与える影響 .....	53
2-3-2. キシリトール生産におけるグルコース流加の効果 .....	53
2-3-3. 2リットル規模のファーメンターを用いたグルコース流加培養 .....	57
2-3-4. グルコースの流加による炭素源の物質収支の変化 .....	60
2-4. 結論 .....	62
文献 .....	64
 第三章 固定化菌体を用いたグルコース流加培養によるキシリトール生産 ..	66
3-1. 緒言 .....	66
3-2. 材料および実験方法 .....	68
3-2-1. 使用菌株および前培養 .....	68
3-2-2. 固定化方法 .....	68
3-2-3. 培地組成および調整法 .....	71
3-2-4. 培養方法 .....	71
3-2-5. グルコース流加方法 .....	71
3-2-6. 分析方法 .....	71
3-3. 実験結果および考察 .....	74
3-3-1. 固定化方法の選択 .....	74
3-3-2. 不織布固定化培養におけるグルコース流加効果 .....	76
3-3-3. 反復回分流加培養でのキシリトール生産 .....	80
3-4. 結論 .....	85
文献 .....	86
 終章 .....	89
 謝辞 .....	92



## 序章

現在、地球上で利用可能な天然資源のなかでバイオマスが太陽エネルギーと並んで有望視されている。バイオマスは太陽エネルギーが物質の形として変化し、エネルギーを蓄積したものとみなせる。地球上の陸地におけるバイオマス、すなわち生物有機体の総量は、乾燥重量として1兆8,000億トンと推定されている。これを炭素量に換算すると約8,000億トンになり、世界の年間エネルギー消費の約100倍、また世界の年間食糧消費の約2,000倍に相当し<sup>1)</sup>、きわめて膨大な量である。また年間に光合成によって新しくつくられるバイオマスは乾燥重量として1,550億トンであり、3分の2が陸上で、残りが海洋で生産される<sup>2)</sup>。しかし、農産廃棄物、木材加工廃棄物、食品加工廃棄物、畜産廃棄物など、生産過程や加工処理過程で廃棄物として処理され、未利用のままエネルギー資源の対象から除外されているバイオマス資源もかなりの量に達している。たとえば農産物の場合、人や家畜の食糧以外の部分も同時に収穫され廃棄されている。代表的作物の利用率と残渣率をTable1<sup>3)</sup>に示す。

これら未利用バイオマスのなかでも特に、リグノセルロースは全体のおよそ50%を占め、農業、林業、果実野菜加工業の残渣として年間10～50億トン産出されている<sup>4)</sup>。リグノセルロースは3つの主要な高分子、つまりセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。主な農産廃棄物および木質廃棄物中のリグノセルロースの組成をTable2<sup>5)</sup>に示す。木質系の材料では、セルロース50%、ヘミセルロース20～30%、リグニン20～30%、およびわずかの副成分で構成されている。しかし原料によって化学組成やその割合が変化するため、複雑な構造を有し、明確な構造はわかっていない<sup>6)</sup>。

リグノセルロースの構成成分のなかでもセルロースは、炭水化物のなかで最大量を占める多糖であり、高等植物の細胞壁の主要成分として毎年数十億トンも生産されており、木材、紙、セルロース誘導体などとして広く使われている<sup>1)</sup>。また加水分解による中性糖の製造と、それに続くアルコール発酵によるエタノールの製造はエ



Table 1 Waste rate of crops<sup>3</sup>).

Crop	Utilization (%)	Waste (%)	
Rice	37.5	Straw	50
		Husk	8.5
		Bran	2.5
		Dust	1.5
Maise	51		49
Soybean	63		37
Barley	63		37
Sweet potato	68		37



Table 2 Composition of agricultural and wood residues<sup>5)</sup>.

Substrate	Hexosans	Pentosans	Lignin	Ash (%)
Bagasse	33	30	29	4
Barley straw	40	20	15	11
Birch	40	33	21	4
Corn cobs	42	39	14	2
Corn stalks	35	15	19	5
Groundnut shells	38	36	16	5
Oat straw	41	16	11	12
Pine	41	10	27	8
Rice straw	32	24	13	12
Rice hulls	36	15	19	20
Saw dust	55	14	21	5
Sorghum straw	33	18	15	10
Wheat straw	30	24	18	10



エネルギー資源の代替として世界的な注目を集めている。セルロースの加水分解方法においても近年では、活性の強いセルラーゼ系酵素が生産可能となり、酵素加水分解法にも関心が持たれるようになった<sup>7)</sup>。このようにセルロースの有効利用を前提とした研究が盛んであるが、リグノセルロース系バイオマスを総合的に有効利用するため、他の成分の利用法も盛んに研究されている。その中でもヘミセルロースの利用に関する研究が最近活発に行われている。

ヘミセルロースを有効利用する上で、重要なのは主要な構成成分であるキシランである。キシランは $\beta$ -1,4結合したキシロース残基より成る主鎖から構成されており、側鎖にキシロース、その他のペントース、ヘキソース、ウロン酸、桂皮酸、酢酸を有している<sup>5)</sup>。加水分解により、それぞれの構成糖が単糖として得られ利用されている。そのなかでキシロースは綿実殻、バガスなどの農産廃棄物中のヘミセルロース加水分解により、年間1,000トン程度生産されているが、甘味は砂糖の40%で非消化性であり、高価なため甘味料としての需要はわずかである<sup>1)</sup>。しかしキシロースは多くの微生物により代謝可能であり、有用物質の生産のための基質として利用、研究されている。

キシロースの有効利用として、ドイツやイギリスなどでは古くから食料、飼料用として*Candida*属、*Mycelarium*属、*Hansenula*属等を用いて、各種農林産廃棄物から飼料用酵母(S.C.P.)の生産が研究されてきた<sup>8)</sup>。現在ではエタノール生産(キシロース発酵)に関する研究がもっとも盛んである。キシロース発酵の研究はキシロース資化性微生物の研究に端を発し、1960年の大西による好浸透圧性酵母(*Osmophilic Yeasts*)の研究によって始まった<sup>9,10)</sup>。この中で好浸透圧性酵母が様々な糖を還元し、糖アルコールを生産することを報告している。その後、ペントース代謝経路についての研究がおもに*C. utilis*を用いて行われている<sup>11-13)</sup>。また1980年代より、キシロースを糖源としたエタノール発酵の研究が盛んに行われるようになり、*Pachysolen tannophilus*、*Hansenula*属、*Kluyveromyces*属、*Pichia*属などの酵母についてもエタ



ノール発酵能があることが報告された<sup>14-16)</sup>。

キシロースの代謝については、微生物間で若干の相違が認められている。キシロース資化性微生物の代謝経路をFig.1<sup>15,16)</sup>に示す。細菌類では主に、キシロースイソメラーゼ(XI)により、直接キシルロースに異性化されることが明らかにされている。また酵母である*C. utilis*<sup>11)</sup>では細菌と同様にXIにより代謝することが報告されているが、多くの研究がなされている*P. stipitis*、*P. tannophilus*、*C. tropicalis*、*C. shehatae*等の酵母にはXIが存在しない。これらの酵母のキシロース代謝の初段階では、まずキシロースリダクターゼ(XR)の作用により、キシロースが還元され、キシリトールに変換される。次いでキシリトールは、キシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)により、キシルロースに変換される。生成したキシルロースは、リン酸化されてキシルロース5リン酸となり、HMP経路とEMP経路を経て代謝される。

キシロースを基質としてエタノール発酵を行う場合の問題点は、酸化還元バランスの不均衡が起こり還元型補酵素が菌体内に蓄積することである。例えばキシロース発酵性酵母である*P. tannophilus*では、代謝の初段階の酵素であるXRとXDHの補酵素が、各々NADPH及びNAD<sup>+</sup>であるため、培養中に酸素の欠乏が起こるとNADHの蓄積がはじまり、キシリトールが蓄積される<sup>19)</sup>。そこでこれを解決するために、様々な研究がなされた。例えば、酢酸<sup>20)</sup>、アジド化合物<sup>21)</sup>、ポリエチレングリコール添加の検討<sup>22)</sup>やNADHの水素受容体としてアセトン<sup>23)</sup>、アセトアルデヒド<sup>24)</sup>の添加等であるが、酸素供給量によって解決しようとする方法<sup>25-31)</sup>が、一般的に行われている。

キシロースの利用方法としてはSCP生産やキシロース発酵ばかりではなく、*Klebsiella oxytoca*による2,3-ブタンジオールの生産<sup>32)</sup>、*Aspergillus terreus*によるイタコン酸生産<sup>33)</sup>、*Rhizopus javanicus*によるグリセロールの生産<sup>34)</sup>などが研究されている。またキシロース発酵では副生産物として扱われるキシリトールも、その生理



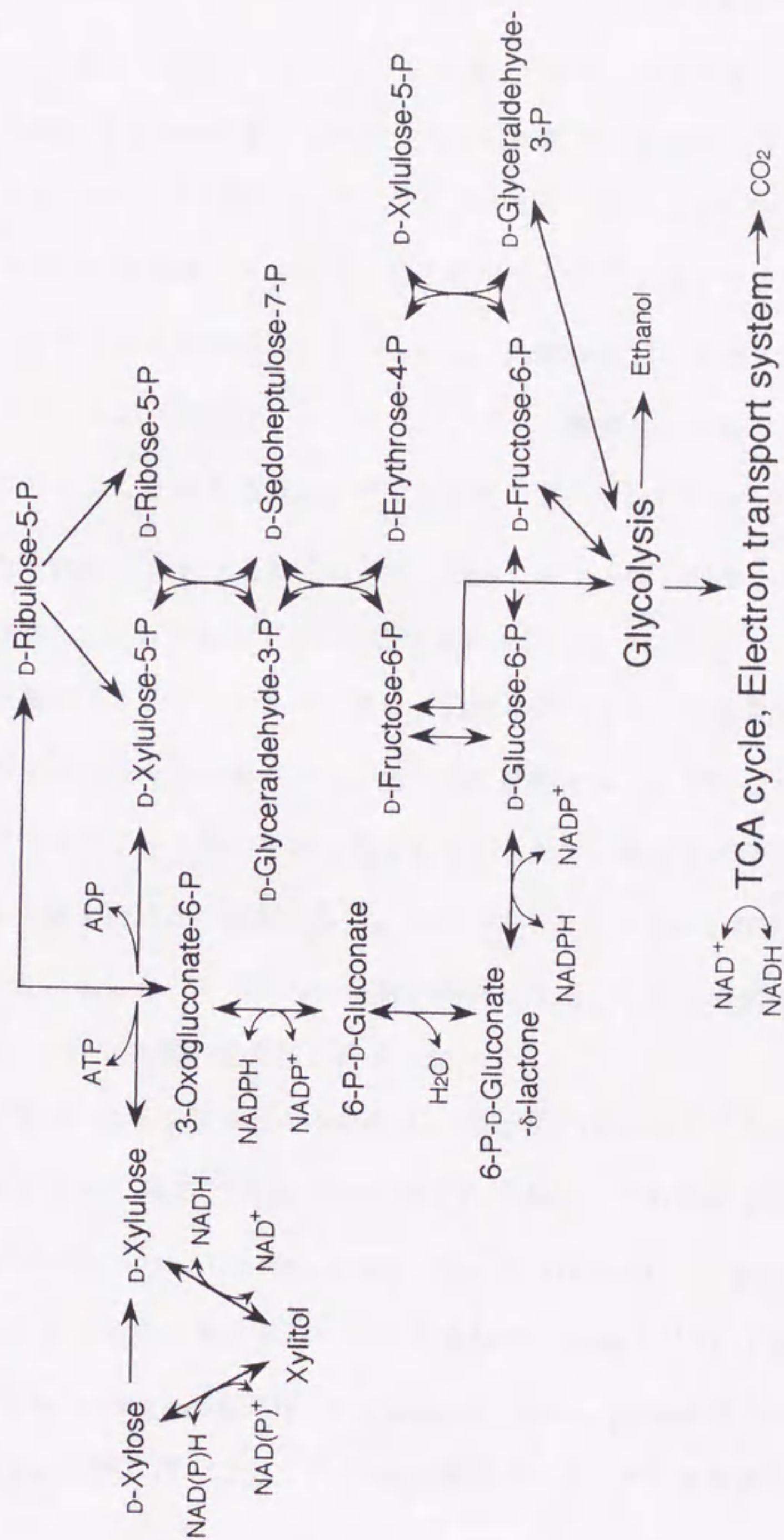


Fig. 1 Metabolism of D-xylose by microorganism<sup>15,16</sup>.



作用が注目されるようになり積極的に生産する研究も行われるようになった。

キシリトールは自然界に存在するポリアルコールで、砂糖と同程度の甘味度を有する、つまり他のポリオールより甘味度が高い天然甘味料である<sup>35)</sup>。その生理作用の1つに、代謝する際にインシュリンを必要としないという特徴を有している<sup>36-38)</sup>。このため糖尿病患者の砂糖に変わる代替甘味料として利用できる。さらに代謝する際にグルコース6リン酸(G6P)-デヒドロゲナーゼに依存しないので、G6P-デヒドロゲナーゼ欠乏症の患者にも甘味料として利用できる<sup>39)</sup>。またキシリトールの生理学的作用としてもっとも注目されているのは、抗齲蝕性<sup>40)</sup>である。現在生産されているキシリトールの大部分は、チューイングガム、機能性甘味料、ソフトドリンク、アイスクリームなどの食品製造分野で工業的に用いられている<sup>36,41)</sup>。これらの生理学的作用をTable3<sup>42)</sup>にまとめた。近年、健康に対する関心が高まるなかで、キシリトールはさらに注目されるようになるであろう。

現在工業的なキシリトールの生産は、白樺などのキシランを豊富に含む原料から加水分解で得られたキシロースを、化学的に還元することで行っている<sup>43)</sup>。この製造方法ではポリマーや他の単糖も含まれているので、高度な精製工程や副生産物を分離する工程を設ける必要がある<sup>44)</sup>。このためキシリトールの収率は50~60%と低く、生産物であるキシリトールの価格が高価になる。これらの問題から、微生物によるキシリトール生産の必要性が高まった。

微生物を用いたキシリトールの生産は、1966年にOhnishiらによって様々な好浸透圧性酵母において報告<sup>45)</sup>されたのが始まりである。この報告で彼らは*Hansenula anomala*、*Pichia miso*、*Candida polymorpha*、*C. tropicalis*、*C. guilliermondii*等の酵母がキシリトールの生産性が高いことを示した。Gongら<sup>16)</sup>は11種の*Candida*属20株、8種の*Saccharomyces*属21株、*Schizosaccharomyces pombe*8株のキシリトール生産性を評価し、実験に用いた全ての*Candida*属がキシリトール生産能を有していること



Table 3 Use and action of xylitol<sup>42)</sup>.

---

1	Anti-ketone action
2	Usable for carbon source
3	For laxative
4	Reduction of methemoglobin
5	Secretor of insulin
6	Prevention of secondary action of carcionostatic substrate
7	Elongation of preservation time of blood
8	Prevention of fatty acid liver caused by lack of choline
9	Prevention of lypolysis
10	Increase of erythrocyte
11	Reduction of GSSG
12	Decrease of fatty acid in blood
13	Increase of lactic acid and decrease of pyruvic acid
14	Secretor of adrenal cortical hormone
15	Prevention of arhythmia
16	For sweetner

---



を示した。さらにGongら<sup>46)</sup>は各種酵母によるキシロースからキシリトールへの変換を行い、*C. tropicalis*の2種類の突然変異株HXP1、HXP2が100g/lのキシロースから7~9日後に各々43.9、48.0g/lのキシリトールを生産し、0.87、0.96の高い収率が得られたことも報告している。またBarbosaら<sup>47)</sup>は、キシロースをキシリトールに変換する酵母44株を選択し、この中で*C. tropicalis*と*C. guilliermondii*のキシリトール生産性が高いことを報告している。また*C. guilliermondii* FTI-20037が104g/lのキシロースから77.2g/lのキシリトールを98時間後に生産したことを報告している。ChenとGong<sup>48)</sup>は砂糖きびかす中のヘミセルロースの酸加水分解物(グルコース30.1g/l、キシロース105.4g/l、アラビノース47.1g/lを含む)より*Candida* sp. B22が、0.85の収率でキシリトールを生産したことを報告している。このように酵母を用いたキシリトール生産において、多くの報告で*C. tropicalis*のキシリトール生産性が高いことが示されている。また酵母以外の細菌類*Enterobacter liquefaciens*<sup>49)</sup>、*Corynebacterium* sp.<sup>50)</sup>、*Mycobacterium smegmatis*<sup>51)</sup>や、真菌類*Petromyces albertensis*<sup>52)</sup>などにもキシリトール生産能が見いだされている。

キシリトール高生産株の検索のほかにも、培養法について検討した報告も多数発表されている。基本的な培養条件として、pHや温度の影響<sup>46,52,53)</sup>、基質(キシロース)濃度<sup>48,53,54)</sup>、窒素源とその濃度<sup>47,54-59)</sup>、酸素供給量<sup>46,53,54,60-66)</sup>について研究されている。またメタノール<sup>53,67)</sup>、ビオチン<sup>68)</sup>、キシロース以外の糖<sup>53,69,70)</sup>マグネシウムイオン<sup>71)</sup>などの添加効果についても調べられている。

さらに工夫を凝らした培養方法も考案されている。Kitpreechavanichら<sup>72)</sup>は、*Candida pelliculosa*の粗酵素抽出液中のXRと、*Methanogen* strain HUを用いて、NADPH再利用システムを考案し、そのシステムによるキシリトール生産を行った。さらにこのシステムの発展型として、Nishioら<sup>73)</sup>は粗酵素抽出液中のXRを*C. pelliculosa*の休止細胞と置き換え、種々のゲルを用いての固定化連続培養も行ってい



る。Tuzakiら<sup>51)</sup>はキシロースをキシリトールに変換する能力を持つ *Mycobacterium* *snegmatis* とキシロースイソメラーゼをアルギン酸カルシウムで固定化し、キシリトール生産を行った。50時間の反応で5%のキシロースから4%のキシリトールを生産し、収率は0.80であった。

このように微生物を用いたキシリトール生産についての研究は活発に行われているが、まだ実用化の目処がたっていない。この原因は化学合成法<sup>43,44)</sup>と比較して、生産コストが高いためであろう。

製品の製造コストを下げるためには、製造上の各工程における全てのコストを1つずつ検討する必要がある。これは微生物を用いた物質生産においても同じである。NyiriとCharles<sup>74)</sup>は色々な発酵プロセスについて解析した結果、原料、固定費、ユーティリティー、人件費の4つがコストに関わる主要素で、しかも寄与率はこの順序であると結論している。微生物による物質生産の生産速度を向上させると、培養時間が短縮されるので固定費、人件費が低減できるであろう。また小規模な設備で十分な生産性があげられるので、ユーティリティー、設備投資費、補修費が削減できる。収率の向上は原料費の削減に寄与すると共に、生産速度の向上と同様の効果ももたらすであろう。さらに菌体を再利用することによりシード調整にかかる費用は激減し、固定費が低減される。また培養後のブロスから菌体を分離する操作が簡略化されるので、下流工程での生産物の分離、精製が容易になりこれも固定費の削減に有効となる。このように微生物を用いた物質生産においては、その培養方法を検討することにより製造上のコストが大きく削減できる可能性をもっている。

このような背景から、農産廃棄物の有効利用の一手法として工業化されることが期待され、またその機能性から消費が拡大するであろうキシリトール生産に焦点を置き、効率的、経済的に微生物によりキシリトールを生産するための基礎を築くものとしてこの研究に取り組んだ。

この研究を行うにあたり、もっともキシリトール生産性の高い微生物として *C. tropicalis* を選択した。この酵母は以前の研究<sup>54)</sup>により、*P. tannophilus*<sup>19)</sup>と同様に代



謝の初段階の酵素であるXRとXDHの補酵素が、各々NADPH及びNAD<sup>+</sup>であり、XIをもたないため、酸素の欠乏でNADHが蓄積するためキシリトールが生産されることが明らかとなっている。また先に述べたように、キシリトール生産株をスクリーニングした多くの研究者<sup>14,45-47)</sup>により*C. tropicalis*が優れたキシリトール生産株であることが示されている。このためキシリトール生産には適した菌であると考えられる。*C. tropicalis*は(病原性は微弱ではあるが)カンジダ症の原因菌の1つに挙げられるが、この問題は遺伝子工学的な手法によりいずれ解決されるであろう。また本論文の主旨はキシリトール生産における培養方法の基礎を築くものであり、直ちにこのまま工業化するものではない。以上の理由から、*C. tropicalis*を用いてキシリトールの生産速度、収率の向上、および固定化技術を導入することによるシード調整の省略、下流工程の簡略化を目的に研究を行った。

#### 文献

- 1) 柴田和夫 (1981) バイオマス資源とエネルギー, 柴田和夫, 木谷収 (編), バイオマスー生産と変換(上), 初版, pp.3-11, 学会出版センター, 東京
- 2) Dunlap, C.E. and Chang, L.H. (1980) Cellulose degradation - A common link in utilization and recycle of agricultural wastes and residues, pp.19, CRC Press, Boca Raton, FL
- 3) 本多淳裕 (1986) エネルギー農業の可能性, バイオマスエネルギー～生物系資源・廃棄物の有効利用～, 初版, pp.39-50, (財)省エネルギーセンター, 東京
- 4) Lutzen, N.W., Nielsen, M.H., Oxiboell, K.M., Schiilein, M. and Olessen, B.S. (1983) Cellulase and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugar., Philos. Trans. R. Soc. London, 300, 283
- 5) Kuhad, R.C. and Singh, A. (1993) Lignocellulose biotechnology: current and future prospects., Critical Rev. Biotech., 13, 151-172
- 6) 樋口隆昌 (1993) 木質生化学, 初版, pp.185-234, 文永堂, 東京
- 7) 村尾沢夫, 荒井基夫, 坂本禮一郎 (1989) セルラーゼ, 初版, 講談社, 東京
- 8) Clayton, D., Callihmn, L.D. and Clemmer, J.E. (1979) Biomass from cellulosic materials. In: Rose, A.H. (ed.) Economic Microbiology, 4. Microbial biomass, pp. 208-270, Academic Press, London



- 9) Ohnishi, H. (1960) Studies on osmophilic yeasts part VII; Production of polyalcohols by *Saccharomyces rouxii* in the concentrated media of sodium chloride and sugars, and identification of polyalcohols produced, Agric. Biol. Chem., 24, 126-130
- 10) Ohnishi, H. (1960) Studies on osmophilic yeasts part VIII; Polyalcohol production by various genera and species of yeasts, Agric. Biol. Chem., 24, 131-140
- 11) Tomoyeda, M. and Horitsu, H. (1964) Pentose metabolism by *Candida utilis*: Part I, Xylose isomerase., Agric. Biol. Chem., 28, 139-143
- 12) Osmond, C.B. and Rees, T.A.P. (1969) Control of the pentose-phosphate pathway in yeast., Biophys. Acta, 184, 35-42
- 13) Bruinenberg, P.M. VanDijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1983) An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*, J. General Microbil., 129, 965-971
- 14) Maleszka, R. and Schneider, H. (1982) Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts 1., Can. J. Microbiol., 28, 360-363
- 15) Jeffries, T.W. (1982) A comparison of *Candida tropicalis* and *Pachysolen tannophilus* for conversion of xylose to ethanol., Biotechnol. Bioeng. Symp., 12, 103-110
- 16) Gong, C.S. Claypool, T.A., Mcracken, M.D., Maun, C.M., Ueng, P.P. and Tsao, G.T. (1983) Conversion of pentoses by yeasts., Biotechnol. Bioeng., 25, 85-102
- 17) Slininger, P.J., Bolen, P.L. and Kurtzman, C.P. (1987) *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose., Enzyme Microb. Technol., 9, 5-15
- 18) Girio, F.M., Peito, M.A. and Amaral-Collaco, M.T. (1989) Enzymatic and physiological study of D-xylose metabolism by *Candida shehatae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 199-204
- 19) Bruinenberg, P.M. DeBot, P.H.M., VanDijken, J.P. and Scheffers W.A. (1983) The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 287-292
- 20) Vega, J.L., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. (1987) Acetate addition to an immobilized yeast column for ethanol production., Biotechnol. Bioeng., 29, 429-435
- 21) Vogel, E.L., Skoog, K., Vogel, H. and Hagerdal, B.H. (1989)  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of the effect of azide on xylose fermentation by *Candida tropicalis*, Appl. Environ. Microbiol., 55, 1974-1980
- 22) Vogel, E.L. and Hagerdal, B.H. (1985) The utilization of metabolic inhibitors for shifting product formation xylitol to ethanol in pentose fermentation using *Candida tropicalis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 167-172



- 23) Alexander, N.J. (1986) Acetone stimulation of ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 203-207
- 24) Ligthelm, M.E., Prior, B.A. and DuPreez, J.C. (1989) Effect of hydrogen acceptors on D-xylose fermentation by anaerobic culture of immobilized *Pachysolen tannophilus* cells., Biotechnol. Bioeng., 32, 839-844
- 25) Watson, N.E., Prior, B.A., DuPreez, J.C. and Lategan, P.M. (1984) Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*, Enzyme Microbiol. Technol., 6, 447-450
- 26) DuPreez, J.C. Prior, B.A. and Monteiro, A.M.T. (1984) The effect of aeration on xylos fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus*, Appl. Microbil. Biotechnol., 19, 261-266
- 27) Ligthelm, M.E., Prior, B.A. and DuPreez, J.C. (1988) The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol., Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 63-68
- 28) DuPreez, J.C., Driessel, B. and Prior, B.A. (1989) Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen., Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 53-58
- 29) Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. (1989) Fermentation of D-xylose D-glucose L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*: Effect of oxygen transfer rate on fermentation., Biotechnol. Bioeng., 34, 398-402
- 30) Chung, I.S. and Lee, Y.Y. (1986) Effect of oxygen and redox potential on D-xylose fermentation by non-growing cells of *Pachysolen tannophilus*, Enzyme Microbiol. Technol., 8, 503-507
- 31) Bruinenberg, P.M., DeBot, P.H.M., Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1984) NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeast., Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 256-260
- 32) Jansen, N.B. Flockinger, M.C. and Tsao, G.T. (1984) Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca*, Biotechnol. Bioeng., 26, 362-369
- 33) Kautola, H. (1990) Itaconic acid production from xylose in repeated-batch and continuous bioreactors., Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 7-11
- 34) Lu, Z., Yang, C.W. and Tsao, G.T. (1995) Fermentation of glycerol by *Rhizopus javanicus*, Appl. Biochem. Biotechnol., 51/52, 83-95
- 35) Pepper, T. and Olinger, P.M. (1988) Xylitol in sugae-free confections., Food Technol., 10, 98-106
- 36) Emodi, A. (1978) Xylitol, its properties and food applications., Food Technol., 32, 20-32
- 37) Touster, O. (1974), In Sipple, H.L. and McNutt, K.W. (eds.) Sugar in Nutrition., pp.229, Academic Press, New York



- 38) Makinen, K.K. (1979) In Chichester, U. (ed.) Advances in food research Vol.25, pp.137, Academic Press, New York
- 39) Ylikahri, R. (1979) Metabolic and nutritional aspects of xylitol., Adv. Food Res., 25, 159-180
- 40) Havukkala, I. (1991) Trends in xylitology., Trends Glycosci. Glucotechnol., 3, 372-374
- 41) VanEys, J., Wang, Y.M., Chan, S., Tanphaichitr, V.S. and King, S.M. (1974) In Sipple, H.L. and McNutt, K.W. (eds.) Sugar in Nutrition, pp.613, Academic Press, New York
- 42) 吉川春寿、二宮春忠、朝倉稔生 (1974) 糖アルコールの代謝 共立出版 東京
- 43) Hyvoenen, L., Koivistoinen, P. and Voirol, F. (1983) Food technological evaluation of xylitol., Adv. Food Res., 28, 373-403
- 44) Melaja, A. and Hamalainen, L. (1977) Process for making xylitol., US Patent, 4,008,285
- 45) Ohnishi, H. and Suzuki, T. (1966) The production of xylitol L-arabitol and ribitol by yeasts., Agric. Biol. Chem., 39, 1139-1144
- 46) Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2., Biotechnol. Lett., 3, 130-135
- 47) Barbosa, M.F.S., Medeiros, M.B.D., Mancilha, I.M.D., Schneider, H. and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*., J. Indust. Microbiol., 3, 241-251
- 48) Chen, L.F. and Gong, C.S. (1985) Fermentation of sugar cane bagasse hydrolysate-acclimated yeast., J. Food science, 50, 226-228
- 49) Yoshitake, J., Ishizaki, H., Shimamura, M. and Imai, T. (1973) Xylitol production by an *Enterobacter* species., Agric. Biol. Chem., 37, 2261-2267
- 50) Yoshitake, J., Ohiwa, H., Shimamura, M. and Imai, T. (1971) Production of polyalcohol by a *Corynebacterium* sp. part I: Production of pentitol from aldopentose., Agric. Biol. Chem., 35, 905-911
- 51) Izumori, K. and Tuzaki, K. (1988) Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*., J. Ferment. Technol., 66, 33-36
- 52) Dahiya, J.S. (1991) Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose., Can. J. Microbiol., 37, 14-18
- 53) Meyrial, V., Delgenes, J.P., Molletta, R. and Navarro, J.M. (1991) Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*., Biotechnol. Letters, 13, 281-286



- 54) Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T. and Watanabe, N. (1992) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate., *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1085-1091
- 55) Jeffries, T.W. (1983) Effect of nitrate on fermentation of xylose and glucose by *Pachysolen tannophilus*., *Bio Technol.*, 1, 503-506
- 56) Onishi, H., Suzuki, T. and Onchi, T., (1980) Mechanism of fermentation conversion from polyalcohol fermentation to ethanol by *Pichia miso*., *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1829-1834
- 57) Palnitkar, S. and Lachko, A. (1992) Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during xylose fermentation by *Candida shehatae*., *Can. J. Microbiol.*, 38, 258-262
- 58) Witt, I. and Helmeyer, L. (1966) Regulation of pyruvate decarboxylase synthesis by coenzyme induction in *Saccharomyces cerevisiae*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 340-345
- 59) Silva, S.S., Mancilha, I.M., Queiroz, M.A., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C. and Vitolo, M. (1994) Xylitol formation by *Candida guilliermondii* in media containing different nitrogen sources., *J. Basic Microb.*, 34, 205-208
- 60) Barnett, J.A. (1976) The utilization of sugars by yeasts., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32, 125-234
- 61) Furlan, S.A., Bouilloud, P., Strehaiano, P. and Riba, J.P. (1990) Study of xylitol production from xylose under oxygen limiting condition., *Biotechnol. Letters*, 13, 203-206
- 62) Roseiro, J.C., Peito, M.A., Girio, F.M. and Amaral-Callaco, M. (1991) The effect of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*., *Arch. Microbiol.*, 156, 484-490
- 63) Scaffers, W.A. (1966) Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen., *Nature*, 210, 533-534
- 64) Sims, A.P. and Barnett, J.A. (1978) The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose, D-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts., *J. Gen. Microbiol.*, 106, 277-282
- 65) Furlan, S.A., Bouilloud, P. and Decastro, H.F. (1994) Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts., *Process Biochem.*, 29, 657-662
- 66) Vandeska, E., Kuzmanova, S. and Jeffries, T.W. (1995) Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates., *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 513-516
- 67) Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. (1988) L-iditol production from L-sorbose by methanol yeast *Candida boidinii*., *J. Ferment. Technol.*, 66, 517-523



- 68) Lee, H., Atkin, A.L., Barbosa, M.F.S., Dorshied, D.R. and Schneider, H. (1988) Effect of biotin limitaiton on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guillermundii*, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 81-84
- 69) Yahashi, Y., Horitsu, H., K., Kawai, Suzuki, T. and Takamizawa, K. (1996) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding., *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 148-152
- 70) Hsiao, H.Y., Chiang, C.L., Ueng, P.P. and Tsao, G.T. (1982) Sequential utilization of mixed monosaccharides by yeasts., *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 840-845
- 71) Mahler, G.F. and Guebel, D.V. (1994) Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, *Biotechnol. Letters*, 16, 407-412
- 72) Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nishio, N. and Nagai, S. (1984) Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxidoreductase system of *Methanogen* strain HU., *Biotechnol. Letters*, 6, 651-565
- 73) Nishio, N., Sugawa, K., Hayase, N. and Nagai, S. (1989) Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU., *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 356-360
- 74) Nyri, L.K. and Charles, M. (1977) Economic status of fermentation processes., *Ann. Rep. Ferm. Processes*, 1, 365-381



## 第一章 遊離菌体を用いた回分培養での培養条件の最適化

### 1-1. 緒言

微生物を用いた物質生産の効率化をはかる上で製造工程を考えた場合、原料コスト、運転コスト、精製コストをそれぞれ縮小する必要がある。またプラントの設計を考えた場合、プラントの簡略化、縮小化に努力し、設備投資を低く抑える必要がある。この中で生産速度の向上は実際に工業化した際、プラントを縮小可能であり、生産の効率化が図れるという点で有利である。このことは設備投資と運転コストの縮小化を意味し、生産コストが抑えられる。また微生物による生産ではコンタミネーションの危険が付きものであるが、生産速度を向上することにより反応時間を短縮化でき、この危険を最小限にとどめることができる。このように微生物を用いた物質生産における生産速度は極めて重要な意味を持ち、生産速度の向上により生産物の製造コストを低下できる。

渡辺<sup>1)</sup>は *Candida tropicalis* IFO 0618株を用いたキシロースからのキシリトール生産において、初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、通気量の3要因に着目し、この3要因がキシリトール生産性に与える影響を分散分析により統計学的に証明した。この結果をTable 1-1<sup>1)</sup>に示す。増殖速度に関しては通気量に有意差が認められた[Table 1-1(a)]。これは菌体の増殖が酸素供給量に支配されていることを示している。生産速度に関しては、初発キシロース濃度、および通気量と初発酵母エキス濃度の相互作用に有意差が認められた[Table 1-1(b)]。生産速度は3要因が複雑に作用しあい、単独で捉えることは難しいといえる。収率に関しては、通気量と初発酵母エキス濃度の相互作用に有意差が認められた[Table 1-1(c)]。

このように *C. tropicalis* によるキシリトール生産においても、過去の研究例に見られるように炭素源<sup>2,3)</sup>、窒素源<sup>4-8)</sup>、および酸素供給<sup>3,9-14)</sup>の3要因が非常に重要な意味を持っているといえる。そこで本章では生産速度の向上を目的とし、この3要因について遊離菌体による回分培養で最適化を試みた。



Table 1-1(a) Analysis of variance with growth rate<sup>1)</sup>.

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	F <sub>0</sub>	F
D-xylose	0.018	1	0.018	1.174	
Aeration rate	0.582	3	0.194	12.652	F <sub>3</sub> (0.05)=9.277
D-xylose × Aeration rate	0.094	3	0.031	2.043	
Yeast extract	0.006	1	0.006	0.391	
D-xylose × Yeast extract	0.010	1	0.010	0.652	
Aeration rate × Yeast extract	0.007	3	0.002	0.152	
Error	0.046	3	0.015		
Total	0.762	15			



Table 1-1(b) Analysis of variance with production rate.<sup>1)</sup>

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	$F_0$	F
D-xylose	1.713	1	1.713	45.884	$F_{1,3}(0.01)=34.116$
Aeration rate	0.414	3	0.138	3.696	
D-xylose × Aeration rate	0.051	3	0.017	0.455	
Yeast extract	0.083	1	0.009	0.241	
D-xylose × Yeast extract	0.009	1	0.009	0.241	
Aeration rate × Yeast extract	1.657	3	0.552	14.795	$F_{3,3}(0.05)=9.277$
Error	0.112	3	0.037		
Total	4.040	15			



Table 1-1(c) Analysis of variance with xylitol yield.<sup>1)</sup>

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	F <sub>0</sub>	F
D-xylose	72.250	1	72.250	1.957	
Aeration rate	589.000	3	196.333	5.318	
D-xylose × Aeration rate	29.000	3	9.667	0.262	
Yeast extract	64.000	1	64.000	1.734	
D-xylose × Yeast extract	0.250	1	0.250	0.007	
Aeration rate × Yeast extract	1186.750	3	395.583	10.716	F <sub>3</sub> (0.05)=9.277
Error	110.750	3	36.917		
Total	2053.000	15			



微生物による有用物質の生産において、その生産性を向上させるためにはもっとも効率のよい培養条件を確立する必要がある、培養条件の最適化は重要な意味を持つ。培養条件の最適化には大きく分けて2通りのアプローチがあり、その1つは統計学的手法である実験計画法であり、もう1つはモデル化により導き出される反応速度論式を利用する方法である<sup>15)</sup>。実験計画法を利用した最適化は、従来より行われてきた個々の要因についてそれぞれに最適点を求める逐次実験方法に対して、同時に複数の要因を最適化できる点、要因間での相互作用が評価できる点、最適点が予測できる点などで有効である<sup>16)</sup>。

実際に実験計画法を用いて微生物による物質生産の培養条件を最適化した例も報告されている。例えば、Kautolaら<sup>17,18)</sup>はイタコン酸生産においていくつかの金属イオンの添加効果について報告している。Takamizawaら<sup>19)</sup>は*Aspergillus oryzae*を用いたコウジ酸生産において、生産速度の向上を目的に初発グルコース濃度、初発ポリペプトン濃度について最適化した。またMadhaviら<sup>20)</sup>はオレンジカルス培養での比増殖速度について検討した。このように実験計画法は統計学的手法であるため、必然的に誤差が含まれてくる微生物、植物、動物細胞の培養条件を最適化するのに適した方法である。

本章では*Candida tropicalis*によるキシロースからのキシリトール生産において、その生産性の向上を目的に、統計学的手法である実験計画法を用いて生産速度の最適化を行った。

## 1-2. 材料および実験方法

### 1-2-1 使用菌株および前培養

キシロース資化性酵母である*Candida tropicalis* IFO 0618株を用いた。この菌株をYPD-寒天斜面培地(グルコース 20g/l, ポリペプトン 5g/l, 酵母エキス 5g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$



1g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l, pH 5.5)で30℃にて48時間培養後、4℃で保存した。

前培養はキシロースを唯一の炭素源とした生育用培地100mlに一白金耳植菌後、30℃で24時間振盪培養した。なお、生育用培地の組成はキシロース60g/l, 酵母エキス 10g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  3g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g/l, pH 5.0とし、消泡剤としてエイブル社製エイノールを加えた。

#### 1-2-2 培地組成および調整法

キシリトール生産用培地の組成は、キシロース 100-200g/l, 酵母エキス 10-30g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  3g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g/l, pH 4.0とした。キシロースを培養液量の40%、その他の成分を60%になるようそれぞれ溶解し、121℃で15分間オートクレーブ滅菌後、両液を無菌的に混合定容した。なおキシロースと酵母エキス濃度は各実験条件により変化させた。

#### 1-2-3 培養方法

##### a. 培養器

本章で用いたガラス製カラム型リアクターをFig.1-1に示す。このリアクターの出入口を全てシリコン栓あるいはシリコンチューブなどで密栓し、121℃で15分間オートクレーブ滅菌後、A部分にキシリトール生産用培地200mlを入れB部分より連続通気し、恒温槽中で30℃に保った。

##### b. 通気方法

培養器への通気は送気ポンプ(東京理科製 AC-0105)、もしくは酸素富加装置(テイジン製ハイサンソ TO-90)を用いた。この酸素富加装置は連続的に90%の酸素濃度を供給できる。通気装置と培養器の中間にメンブランフィルター(東洋濾紙製 LABODISK-50CS)を設置し、連続的に除菌した。通気量は流量計(小島製作所製 RK-1350V)にて測定、調節した。

##### c. 培養条件

生育培地で24時間培養した培養液を培養器中のキシリトール生産用培地200ml



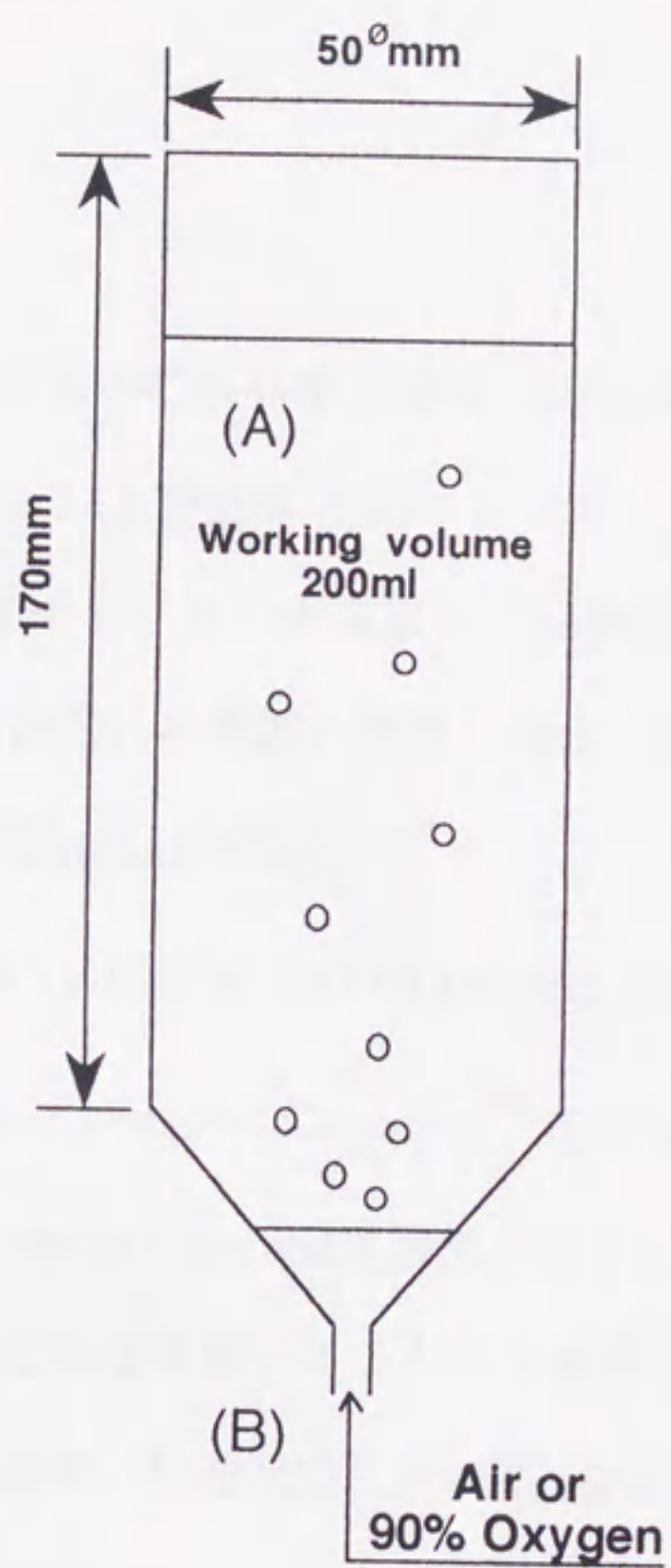


Fig. 1-1 Column reactor.



に、初発菌体量が0.3-0.5g/lとなるように無菌的に接種した。各実験にあわせて通気量を設定し、任意時間毎に3mlずつサンプリングした。培養時間はキシリトール濃度が最大値を示した後、減少が確認されるまでとした。また、水分蒸発量に見合った滅菌水をサンプリング毎に補い、発泡に応じて消泡剤(信越化学製 KM-70)を添加した。

#### 1-2-4 分析方法

##### a. 溶存酸素濃度

$K_La$ の測定、および培養中の溶存酸素濃度の変化を測定するために発酵用溶存酸素電極(EYELA製 DO-6)、および発酵用DOコントローラー(EYELA製 FM-11)を使用した。電極を1Nの亜硫酸ナトリウム水溶液と空気飽和純水を用いて校正し、オートクレーブ滅菌した後、無菌的に培養器に設置し測定に使用した。

##### b. 酸素移動容量係数( $K_La$ )の測定

酸素移動容量係数( $K_La$ )の測定にはTaguchiとHumphrey<sup>21)</sup>によって考えられたGassing out法のDaynamic methodとCooperら<sup>22)</sup>によって提唱された亜硫酸酸化法を組み合わせて用いた。Daynamic methodは通気を停止して菌体の呼吸により溶存酸素濃度を減少させ、その後通気を再開することによる溶存酸素濃度の増加速度から $K_La$ を計算する方法であり、実際の培養状態に近い $K_La$ を求めることができる。しかし90%酸素による通気では酸素電極の応答速度が溶存酸素濃度の変化速度を下回ったため、この方法での測定が不可能であった。このため90%酸素による通気条件での $K_La$ は亜硫酸酸化法での滴定値とDaynamic methodで得られた $K_La$ との相関を求めることにより算出した。

##### c. 菌体量

菌体量の測定は濁度法を用いた。数段階に希釈した菌体懸濁液の640nmにおける吸光度を測定し、それぞれの菌体乾重量を求めることによりFig.1-2に示される標準直線を得た。この関係より次の関係式が導かれる。



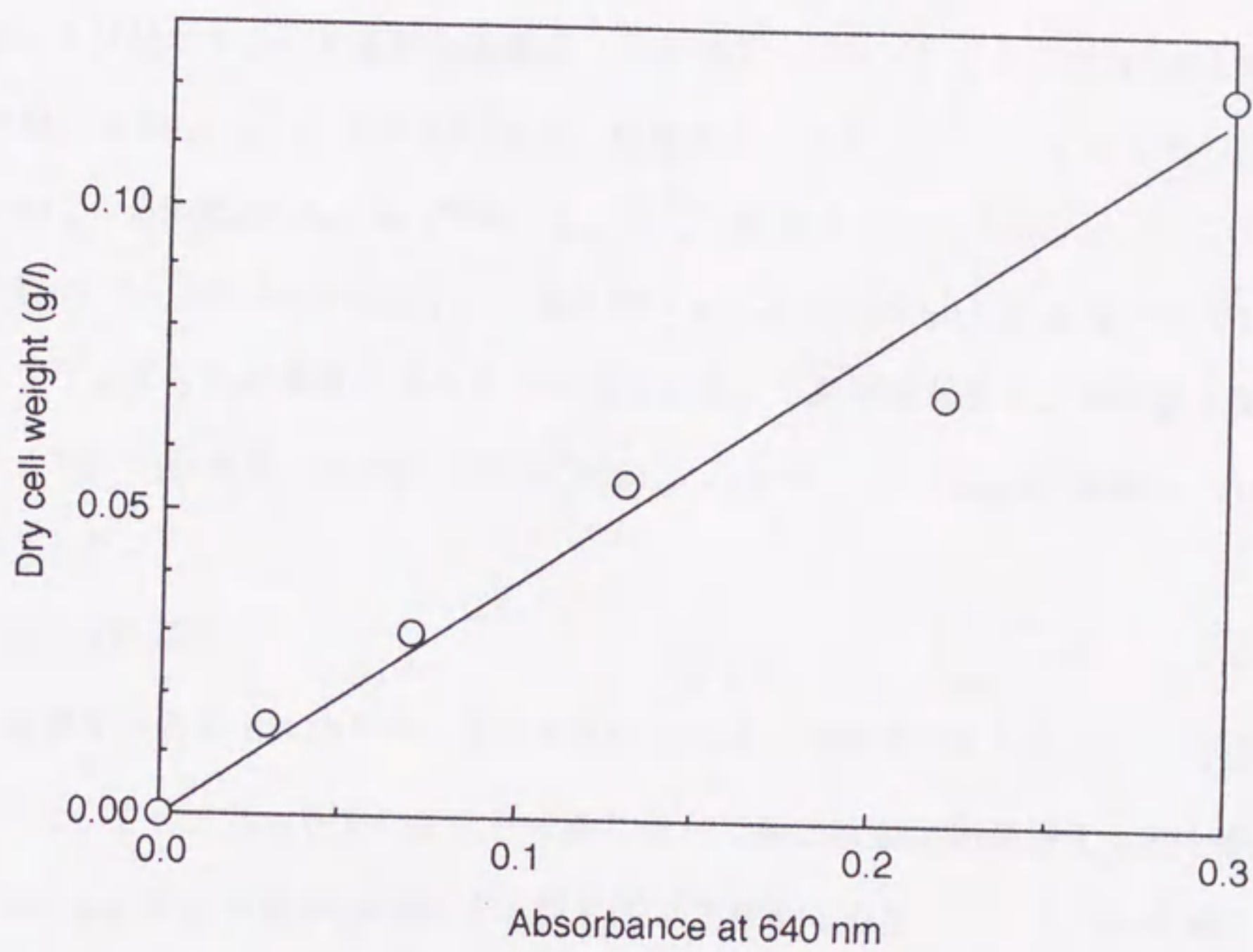


Fig. 1-2 Standard curve of dry cell weight vs. absorbance at 640nm.



$$OD_{640}=2.39X \quad \cdots (1)$$

ここで $OD_{640}$ は640nmにおける吸光度、 $X$ は菌体濃度を表す。

サンプリングした培養液を10～200倍に希釈し、分光光度計(島津製作所製 UV-1200)にて640nmにおける吸光度を測定し、式(1)により菌体乾重量を求めた。

#### d. 糖および糖アルコールの濃度

糖および糖アルコール濃度の測定は、高速液体クロマトグラフ(以後HPLCと略す；島津製作所製LC-5A)を用いて行った。移動相としてアセトニトリルと水の混合液(70/30；v/v)を流速0.8ml/minで流した。また分離用カラムにはShodex SUGAR(昭和電工製)のプレカラム(SZ5532P)と分離用カラム(SZ5532)を50℃に加温して用いた。サンプリングした培養液はあらかじめ遠心分離にて菌体を除去し、夾雑物を除くためフィルター(日本ミリポア製 COSMONICEフィルターW 13mm)で濾過し、20  $\mu$ lを試料とした。

#### 1-2-5 最適化方法

生産速度の最適化は1978年にBoxとWilsonによって提唱されたBox-Wilson法<sup>23,24)</sup>に従った。この方法は任意に変化させることが可能な独立変数(最適化する条件)を要因とし、求められる結果(最適化する結果)を応答変数として、いくつかの要因の組み合わせによる実験の結果より応答曲面の関数を予測し、最適点を検索するものである。当てはめる応答関数により2段階に分けられ、1次式を当てはめる部分を1次計画、2次式を当てはめる部分を2次計画と呼ぶ。

##### a. 1次計画

まず最初に解析を簡単にするために、次式によりそれぞれの要因を変数変換(コード化)する。

$$X_j=(T_j-T_{j0})/\Delta_j \quad \cdots (2)$$

ここで $X_j$ はコード化された値、 $T_j$ は実験で用いる値、 $T_{j0}$ は中心点の値、 $\Delta_j$ はきざみ幅をそれぞれ表す。



つぎにそれぞれのコード値を2水準(-1,+1)に取り、各要因の組み合わせによる2水準多元配置となる点を実験点として選択する。つまり要因数 $n$ の実験を考えた場合、 $2^n$ 型要因実験となる。このようなデータに回帰モデルを当てはめる場合、純粋な実験誤差と回帰モデルの不適合を分離する必要があるので、繰り返しのある実験計画を採用しなくてはならない。Box-Wilson法では、中心点(全ての要因のコード値を0とした点)で2回以上の実験を追加して純誤差を推定する。得られた1次回帰モデル式を分散分析で評価し、モデル式が適合すれば最大傾斜方向に中心点を移動して実験を組み直す。モデル式が適合しない場合は、2次回帰モデル式を当てはめるために2次計画へと進む。

#### b. 2次計画

2次回帰モデルを当てはめる場合、各要因について3水準以上の実験点をとる必要がある。そこで1次計画で得られたデータにいくつかの実験を追加して2次回帰モデルを当てはめる。ここで追加する実験は実験の効率化を考え、回転可能中心複合計画とした。この実験計画の特徴はそれぞれの実験点で中心点からの距離が等しくなることである。実験結果から1次計画と同様に得られた2次回帰モデル式の適合性を分散分析で評価し、各要因の傾きが0となる停留点を求める。

本章では最適化する要因を初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、および $K_{La}$ の3要因とし、中心点での繰り返し回数を6回とした。

### 1-3. 実験結果および考察

#### 1-3-1. 通気速度が $K_{La}$ に及ぼす影響

最適化する培養条件を選択するにあたり、酸素供給量のパラメータをスケールアップの指標としやすい $K_{La}$ とした。まず始めに実際の培養状態により近い $K_{La}$ が測定できるDynamic methodにより大気での通気条件における $K_{La}$ を測定した。通気量100, 200, 300, 400, 600, 800 (ml/min)に対する $K_{La}$ はそれぞれ20.43, 35.44, 36.84,



46.64, 51.55, 74.92となった(Fig.1-3)。この関係を一次式で表すと次のようになる。

$$K_{La}=[6.88 \times 10^{-2}] \times AR + 16.80 \quad (r=0.97, n=6) \cdots (3)$$

ここでARは通気量(ml/min)を表す。

次に空気を通気した低い酸素供給状態でのDaynamic methodと亜硫酸酸化法との相関を求めるため、各通気量における滴定値(滴定量の減少速度)を求めた。通気量200, 400, 600, 800, 1000 (ml/min)に対する滴定値はそれぞれ0.25, 0.40, 0.91, 1.21, 1.47となった。この関係を一次式で表すと次のようになる。

$$Ti=[1.60 \times 10^{-3}] \times AR - 0.13 \quad (r=0.99, n=5) \cdots (4)$$

ここでTiは滴定値(ml/h)を表す。

(3)式と(4)式を整理すると次の関係が成り立つ。

$$K_{La}=43.0 \times Ti + 22.3 \cdots (5)$$

この式を用いることにより亜硫酸酸化法で得られた滴定値からDaynamic methodで得られた $K_{La}$ に変換可能となる。

ところで $K_{La}$ は亜硫酸酸化法を用いた滴定値からも計算により求められる。単位時間に消費された亜硫酸イオンを酸素供給量として滴定値から算出し、これを酸素移動速度として $K_{La}$ を求め、通気量に対してプロットすると次の関係式が得られる。

$$K_{La}(Ti)=0.85 \times AR - 67.23 \quad (r=0.99, n=5) \cdots (6)$$

ここで $K_{La}(Ti)$ は亜硫酸酸化法の滴定値Ti(ml/h)から得られた酸素移動容量計数( $h^{-1}$ )を表す。

(3)式と(6)式を比較すると亜硫酸酸化法で求めた $K_{La}$ が大きな値をとることがわかる。この差は培養液の粘度や、消泡剤の影響であると考えられる。実際の培養では菌体の増殖に伴い、培養液の粘度が上昇し、また発泡状況に応じて消泡剤を添加するので、より実際の培養状態に近いDaynamic methodで得られた $K_{La}$ をこの実験系の $K_{La}$ として採用する。



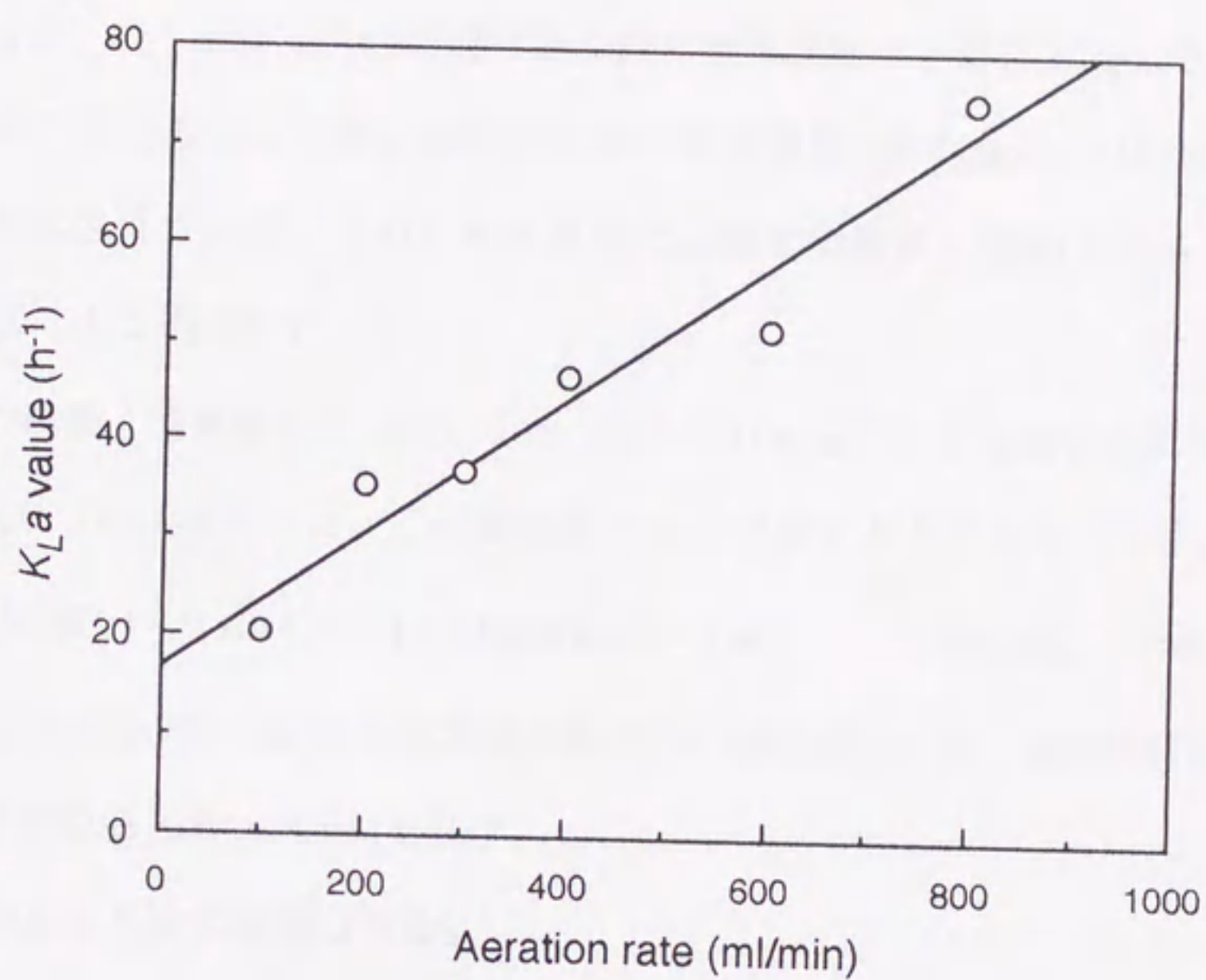


Fig. 1-3 The plots of  $K_La$  vs. aeration rate.



酸素供給量を増加させるためには通気量を増加させる方法が最も簡単であるが、本研究で用いたリアクターでは攪拌翼や破泡装置を備えていないので消泡等の問題から、経験的に5vvmつまり1000ml/hが限界であると判断した。このためより高い $K_{La}$ を得るために、通気する空気の酸素濃度を高くする方法を選択した。通常、このような高濃度酸素通気条件では菌体増殖への影響が懸念される。しかし佐藤<sup>25)</sup>の報告によると、*C. tropicalis*の増殖可能な溶存酸素濃度の上限は70ppmであり、常圧下で酸素ガスを供給したときに得られる溶存酸素濃度(35-40ppm)では増殖に影響がないことが示されている。このため本研究では酸素供給量を増加させる手段として、90%酸素による通気を行った。

測定の結果、通気量200, 400, 600, 800 (ml/min)に対する滴定値はそれぞれ1.87, 4.03, 9.50, 11.36となった。この関係を一次式で表すと次のようになる。

$$Ti(90\%O_2)=[1.69 \times 10^{-2}] \times AR(90\%O_2) - 1.80 \quad (r=0.98, n=4) \cdots (7)$$

ここで $Ti(90\%O_2)$ は90%酸素通気条件での滴定値(ml/h)、 $AR(90\%O_2)$ は90%酸素通気条件での通気量(ml/min)を表す。

(5)式と(7)式より次式が得られる。

$$K_{La}(90\%O_2)=0.73 \times AR(90\%O_2) - 54.88 \cdots (8)$$

ここで $K_{La}(90\%O_2)$ は90%酸素通気条件での酸素移動容量計数( $h^{-1}$ )を表す。

(3)式と(8)式の係数を比較すると、90%酸素通気条件では通常空気を通気した場合の約10.6倍高い $K_{La}$ が得られることになる。(8)式より、通気量の上限が1000ml/hと仮定して、 $K_{La}$ が最大 $675h^{-1}$ まで実験が可能であると判断した。

### 1-3-2. 1次計画の適用

緒言や方法でも述べたように、遊離菌体を用いた回分培養で初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ の3要因を最適化した。初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ のBox-Wilson法での中心点をそれぞれ150g/l、30g/l、 $308.2h^{-1}$



とし、きざみ幅をそれぞれ30g/l、3g/l、72.6h<sup>-1</sup>として、(2)式によりそれぞれの要因をコード化した。

$$A=(X_1-150)/30 \cdots (9.1)$$

$$B=(X_2-15)/3 \cdots (9.2)$$

$$C=(X_3-308.2)/72.6 \cdots (9.3)$$

ここでA、B、Cはそれぞれコード化した要因、X<sub>1</sub>は初発キシロース濃度(g/l)、X<sub>2</sub>は初発酵母エキス濃度(g/l)、X<sub>3</sub>はK<sub>L</sub>a(h<sup>-1</sup>)を表す。

コード化した値を組み合わせ、1次計画を適用した。2<sup>3</sup>型要因実験と中心点での6回の繰り返し実験により得られた結果をTable1-2に示す。この結果を最小二乗法で超平面に近似すると次の式が得られる。

$$P=0.040 \times A + 0.105 \times B + 0.140 \times C + 0.137 \cdots (10)$$

ここでPは生産速度(g/l・h)を表す。

この1次式の有意性を評価するために分散分析を行ったところ、Table1-3に示されるように回帰モデルの不適合が有意となった。つまり実験を行った範囲での生産速度を、コード化した3要因の1次式で表現することは統計学的に意味を持たない。この結果より推察すると、1次計画で実験を行った点が最適点に十分近く、2次計画が適用可能である。以上の評価が得られたので最適点への接近プロセスを省略して、最適点を検索するため2次計画へ移った。

### 1-3-3. 2次計画の適用

1次計画で得られたデータに2次計画で必要な6回の実験を追加し、合計20回の回分培養のデータを得た。そのデータをTable1-4に示す。このデータをコード値による2次式に回帰させたところ、以下の回帰式を得た。

$$P=0.1940A^2-0.0932B^2-0.1551C^2-0.0775AB+0.1875AC+0.1725BC \\ +0.0702A+0.0898B+0.1288C+2.4285 \cdots (11)$$

ここでPはキシリトール生産速度(g/l・h)を表している。



Table 1-2 The first step of experimental design and results for xylitol production rate.

Experimental number	A (coded value)	B	C	Production rate (g/l·h)	Yield (%)	D.C.W. (g/l)
1	-1	-1	-1	1.97	52.7	15.63
2	-1	-1	1	1.43	41.0	24.29
3	-1	1	-1	1.89	57.0	16.42
4	-1	1	1	2.24	55.9	20.65
5	1	-1	-1	1.73	51.8	12.51
6	1	-1	1	2.14	60.3	22.36
7	1	1	-1	1.54	55.7	9.49
8	1	1	1	2.44	59.0	22.50
9	0	0	0	2.56	63.9	20.23
10	0	0	0	2.35	63.9	16.13
11	0	0	0	2.33	55.2	17.31
12	0	0	0	2.53	63.7	13.30
13	0	0	0	2.47	62.9	18.25
14	0	0	0	2.30	58.1	15.82

A : coded value of initial D-xylose concentration

B : coded value of initial yeast extract concentration

C : coded value of  $K_La$



Table 1-3 Variance analysis of regression in first step.

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	$F_0$	F
Regression	0.2578	3	0.0859	6.98*	$F_3^2(0.05)=5.409$
A	0.0128	1	0.0128	1.04	
B	0.0882	1	0.0882	7.17*	$F_1^1(0.05)=6.608$
C	0.1568	1	0.1568	12.74*	$F_1^1(0.05)=6.608$
Unfit	1.4474	5	0.2895	23.52**	$F_5^5(0.01)=10.97$
Error	0.0615	5	0.0123		
Total	1.7667	13			

\*significant ( $P<0.05$ ), \*\* highly significant ( $p<0.01$ )

A : coded value of initial D-xylose concentration

B : coded value of initial yeast extract concentration

C : coded value of  $K_{La}$



Table 1-4 The second step of experimental design and results for xylitol production rate.

Experimental number	A (coded value)	B	C	Time (hours)	Production rate (g/l·h)		Yield (%)	D.C.M. (g/l)
					Observed	Predicted		
1	-1	-1	-1	30	1.97	1.98	52.7	15.63
2	-1	-1	1	28	1.43	1.52	41.0	24.29
3	-1	1	-1	28	1.89	1.97	57.0	16.42
4	-1	1	1	26	2.24	2.20	55.9	20.65
5	1	-1	-1	46	1.73	1.90	51.8	12.51
6	1	-1	1	36	2.14	2.19	60.3	22.36
7	1	1	-1	46	1.54	1.58	55.7	9.49
8	1	1	1	32	2.44	2.56	59.0	22.50
9	-a	0	0	24	1.78	1.76	53.4	9.45
10	a	0	0	42	2.16	2.00	60.0	17.05
11	0	-a	0	38	2.14	2.01	63.5	16.72
12	0	a	0	30	2.37	2.32	58.4	18.98
13	0	0	-a	36	1.89	1.77	55.0	10.12
14	0	0	a	32	2.27	2.21	57.7	22.99
15	0	0	0	34	2.56	2.43	63.9	20.23
16	0	0	0	36	2.35	2.43	63.9	16.13
17	0	0	0	28	2.33	2.43	55.2	17.31
18	0	0	0	34	2.53	2.43	63.7	13.30
19	0	0	0	30	2.47	2.43	62.9	18.25
20	0	0	0	32	2.30	2.43	58.1	15.82

A: coded value of initial D-xylose concentration

B: initial yeast extract concentration

C:  $K_L a$  value

Predicted production rates were estimated from experimental model.  $a=1.682$  in the star points.



次にこの回帰式の有意性を評価するために分散分析を行った(Table 1-5)。その結果、1次の回帰が95%水準、2次の回帰が99%水準でそれぞれ有意であり、3次以上の項に対応する回帰モデルの不適合は有意ではなかった。つまり2次式への回帰で生産速度と培養条件の関係を十分に表現できることが証明された。そこで回帰モデルの不適合の項を誤差項にプールして、分散分析表を作り直したところ(Table 1-6)、1次の回帰、2次の回帰共に99%水準で有意となった。さらにこの回帰式の有意性を証明するため、それぞれの実験点での予測値を求め実際に実験で得られた値と比較すると(Table 1-4)、予測値と実測値が非常に近似した値を取り、回帰式がこの遊離菌体を用いた回分培養の特徴を十分に表現していることが証明された。次に最適点を求めるため、この2次多項式の頂点を計算により求めた。

回帰式を1次変換する際に求められる固有値( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ )はそれぞれ-0.0282、-0.1089、-0.3053となり、すべてマイナスの値であった。これはこの2次式が極大値を持つことを意味している。従って、この頂点の座標が最適点となる。実際に頂点の座標を求めると $A=0.735$ 、 $B=2.002$ 、 $C=1.973$ となり、元の値に変換し直すと初発キシロース濃度172.0g/l、初発酵母エキス濃度21.0g/l、 $K_{La}451.50\text{h}^{-1}$ であった。このときの予想されるキシリトール生産速度は2.67g/l・hである。

回帰式による応答曲面を、実際に3次元のグラフに表すとFig.1-4になる。Fig.1-4(a)は初発酵母エキス濃度を最適点である21.0g/lに固定した場合の、初発キシロース濃度と $K_{La}$ の影響を表している。この図から $K_{La}$ が低く初発キシロース濃度が高い場合、生産速度は非常に低くなる傾向がみられる。これは高糖濃度による基質阻害と溶存酸素の不足に起因した、菌体増殖の不良が原因だと考えられる。

Fig.1-4(b)は初発キシロース濃度を最適点172.0g/lに固定した場合の、初発酵母エキス濃度と $K_{La}$ の影響を示している。この図では左右方向に山の尾根の様な形が観察される。これは初発酵母エキス濃度と $K_{La}$ には相互作用が存在し、窒素源と酸素供給量のつりあいが取れている状態では、比較的高い生産速度が得られることを示して



Table 1-5 Variance analysis of regression in second step.

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	$F_0$	F
Regression	1.8380	9	0.2042	16.59**	$F_5^2(0.01)=10.15$
(linear)	0.4041	3	0.1347	10.95*	$F_3^3(0.05)=5.409$
(square)	1.4339	6	0.2390	19.42**	$F_5^6(0.01)=10.67$
Unfit	0.1259	5	0.0252	2.05	
Error	0.1874	5	0.0123		
Total	2.0255	19			

\*significant ( $P<0.05$ )

\*\* highly significant ( $p<0.01$ )



Table 1-6 Remade table of variance analysis of regression in second step.

Factor	Sum of squares	Freedom	Unbiased variance	$F_0$	F
Regression	1.8380	9	0.2024	10.89	$F_{10}^2(0.01)=4.942$
(linear)	0.4041	3	0.1347	7.19	$F_{10}^3(0.01)=6.552$
(square)	1.4339	6	0.2390	12.75	$F_{10}^6(0.01)=5.386$
Error	0.1874	10	0.0187		
Total	2.0255	19			

\*significant ( $P<0.05$ )

\*\* highly significant ( $p<0.01$ )



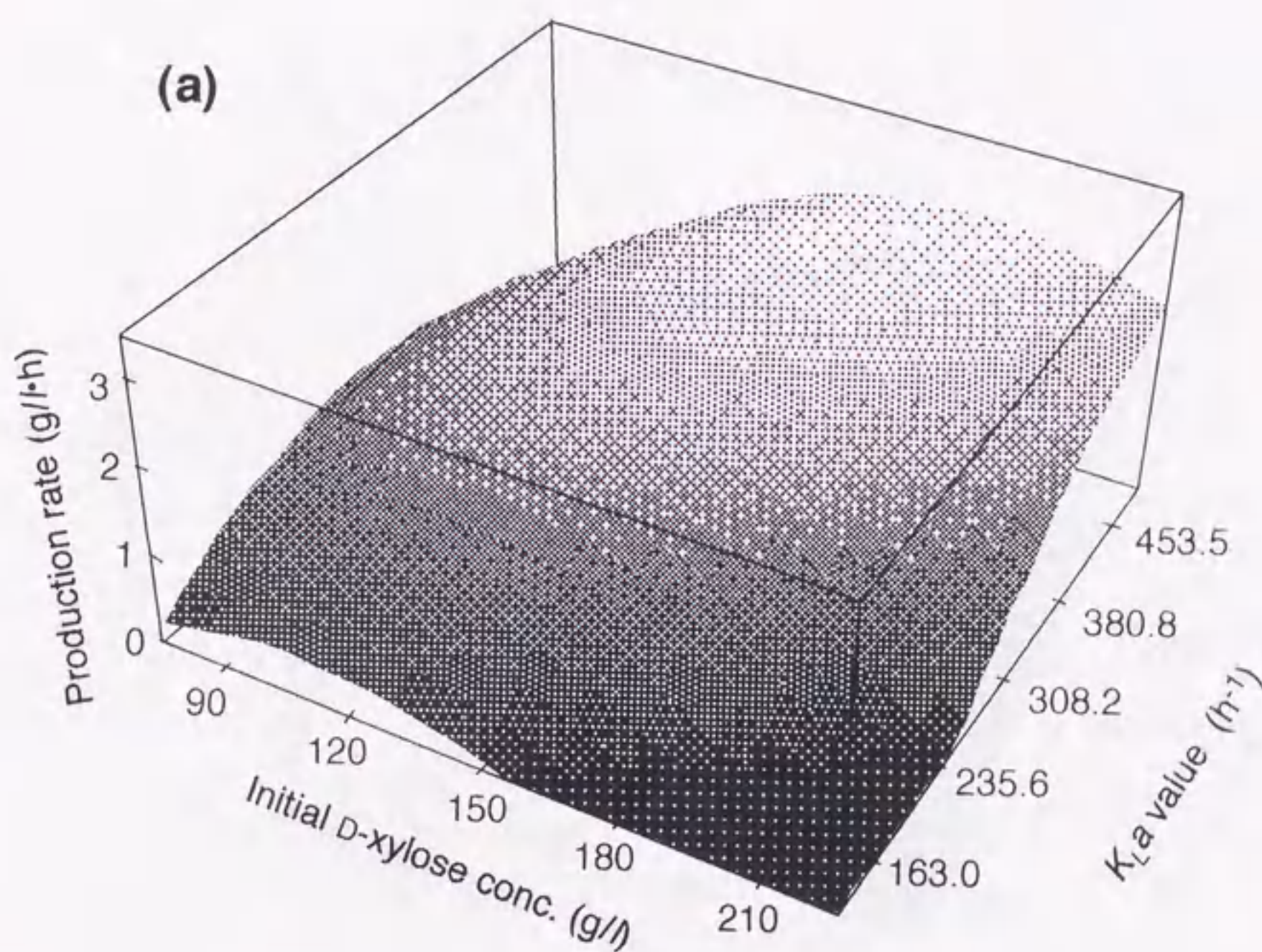
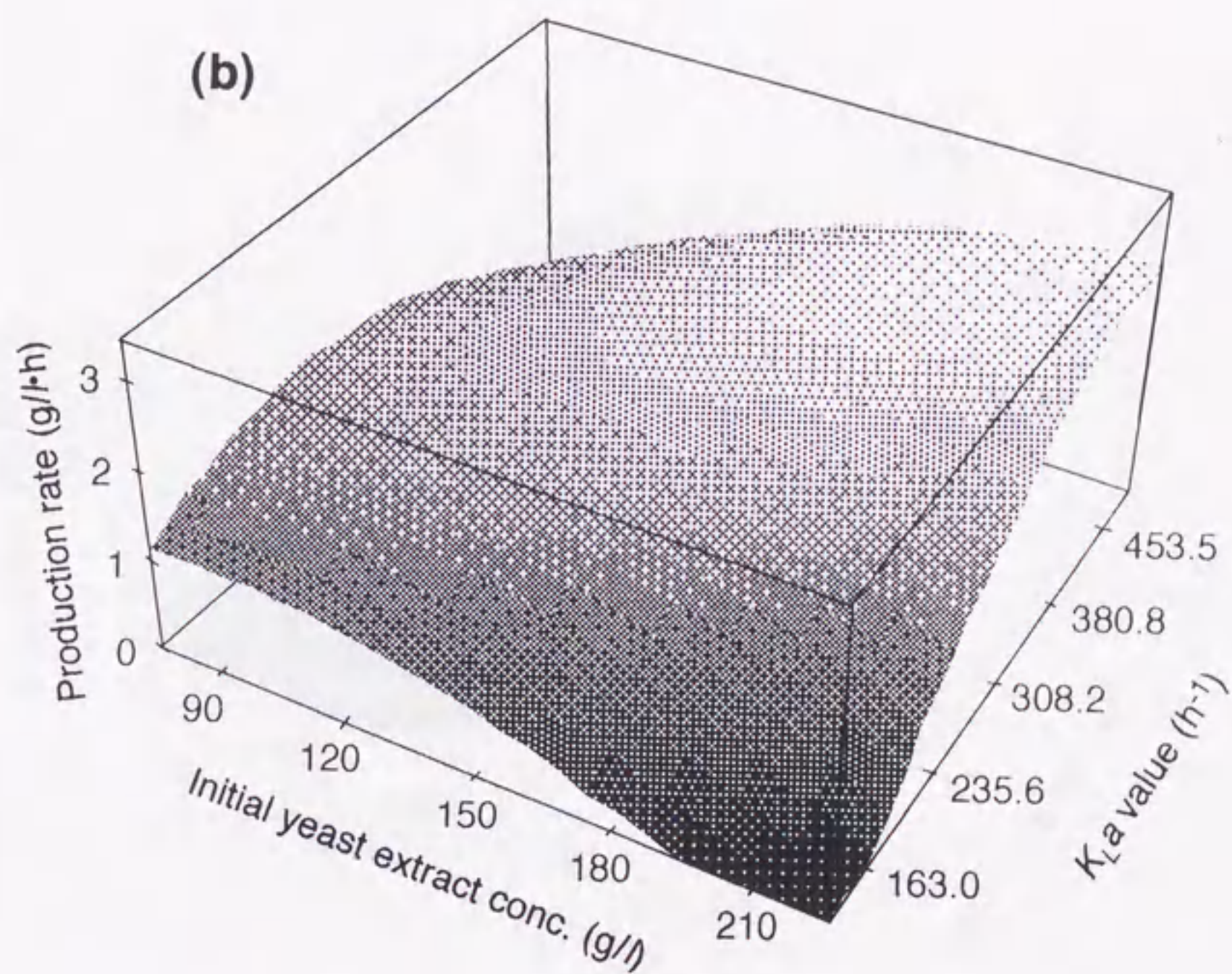


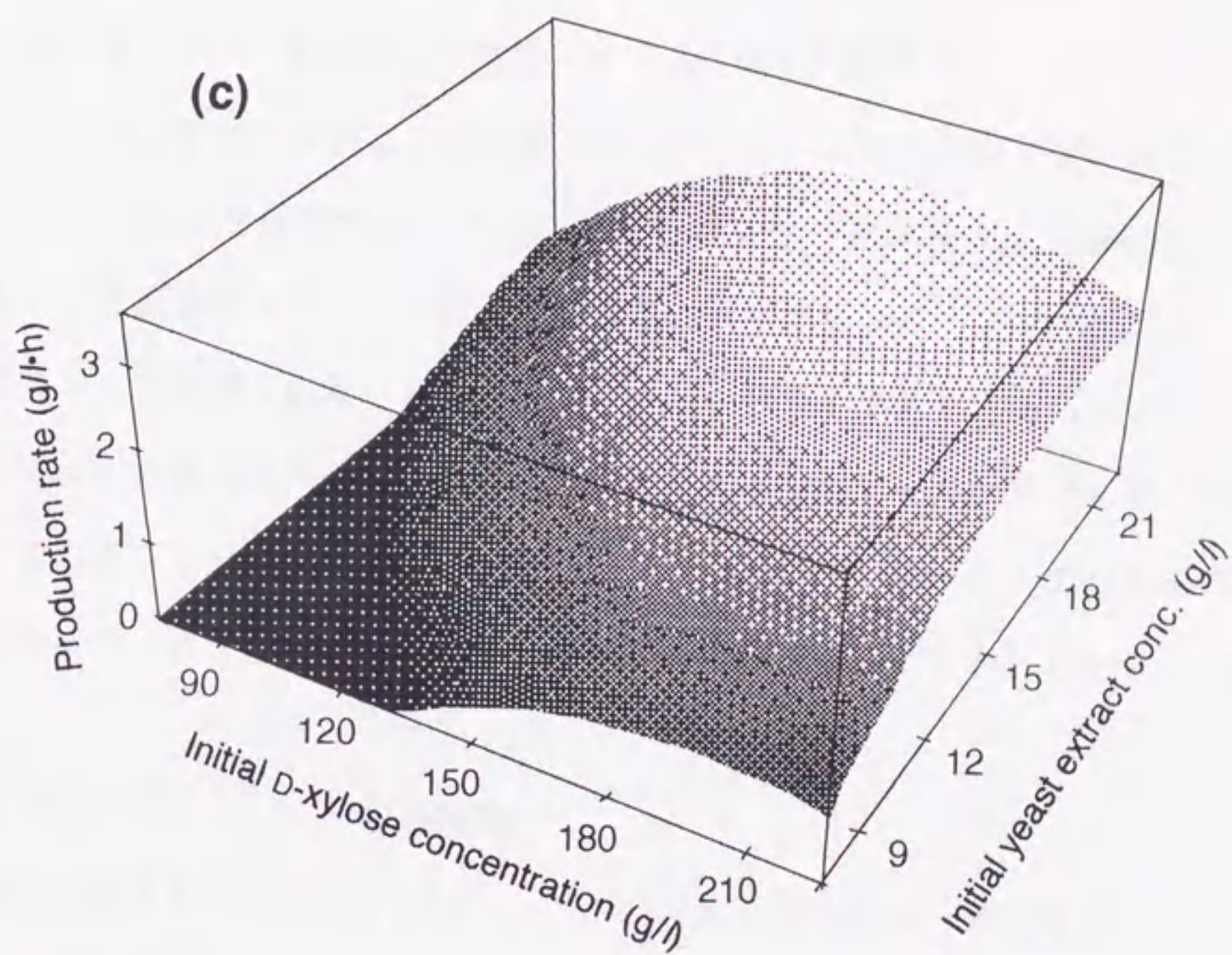
Fig. 1-4 Response surface of xylitol production rate.

- (a); fixed initial yeast extract concentration at optimum point (21.0 g/l)  
 (b); fixed initial D-xylose concentration at optimum point (172.0 g/l)  
 (c); fixed  $K_La$  at optimum point (451.5  $\text{h}^{-1}$ )











いる。酵母エキス濃度と $K_{La}$ のどちらも高い場合には、最適点付近にみられるように非常に高い生産速度を示すが、どちらも低い場合には、短時間の培養で得られる低い菌体濃度であっても、十分に溶存酸素濃度を減少させ、キシリトールを生産し始めるため、生産速度は高くなる傾向がみられる。

Fig.1-4(c)は $K_{La}$ を最適点 $451.5\text{h}^{-1}$ に固定した場合の、初発キシロース濃度と初発酵母エキス濃度の影響を示している。この図ではキシロース濃度、酵母エキス濃度のどちらも低い場合には、生産速度が極端に低くなる様子が観察できる。この様に $K_{La}$ が高い場合には、培養の前期で、炭素源であるキシロースや窒素源である酵母エキスは、そのほとんどを菌体増殖のために消費されるが、菌体量が十分確保できた後、呼吸による溶存酸素レベルの低下が起こり、残ったキシロースはキシリトール生産の基質として利用される。しかしキシロース、酵母エキスのどちらも不足している場合には、十分な菌体が確保できず、そのためキシリトール生産に必要な溶存酸素レベルの低下を引き起こすにいたらない。このためキシロース、酵母エキス共に菌体増殖にのみ費やされ、キシリトールへの変換はほとんど行われないう結果になる。

#### 1-3-4. 最適点でのキシリトール生産結果

次に実際に最適点での培養を行った。数回の回分培養の結果、最大キシリトール生産速度は平均で $2.71\text{g/l}\cdot\text{h}$ であり、これは実験計画法で求められた予測値 $2.67\text{g/l}\cdot\text{h}$ に極めて近い値となった。この結果はこの様な微生物反応における培養条件の最適設計において、この最適化手法が非常に有効であることの証明になると思われる。任意に設定可能な培養条件が複数存在し、最適化する応答変数が単純化できるならば、Box-Wilson法の適用は容易であり、かつ十分な成果が期待できる。

Fig.1-5はこの最適点における回分培養のキシロース濃度、キシリトール濃度、菌体濃度、及び溶存酸素濃度の経時変化を示している。この図より、溶存酸素濃度が低下した後に、キシリトール生産が行われていることが分かる。この現象は補酵素



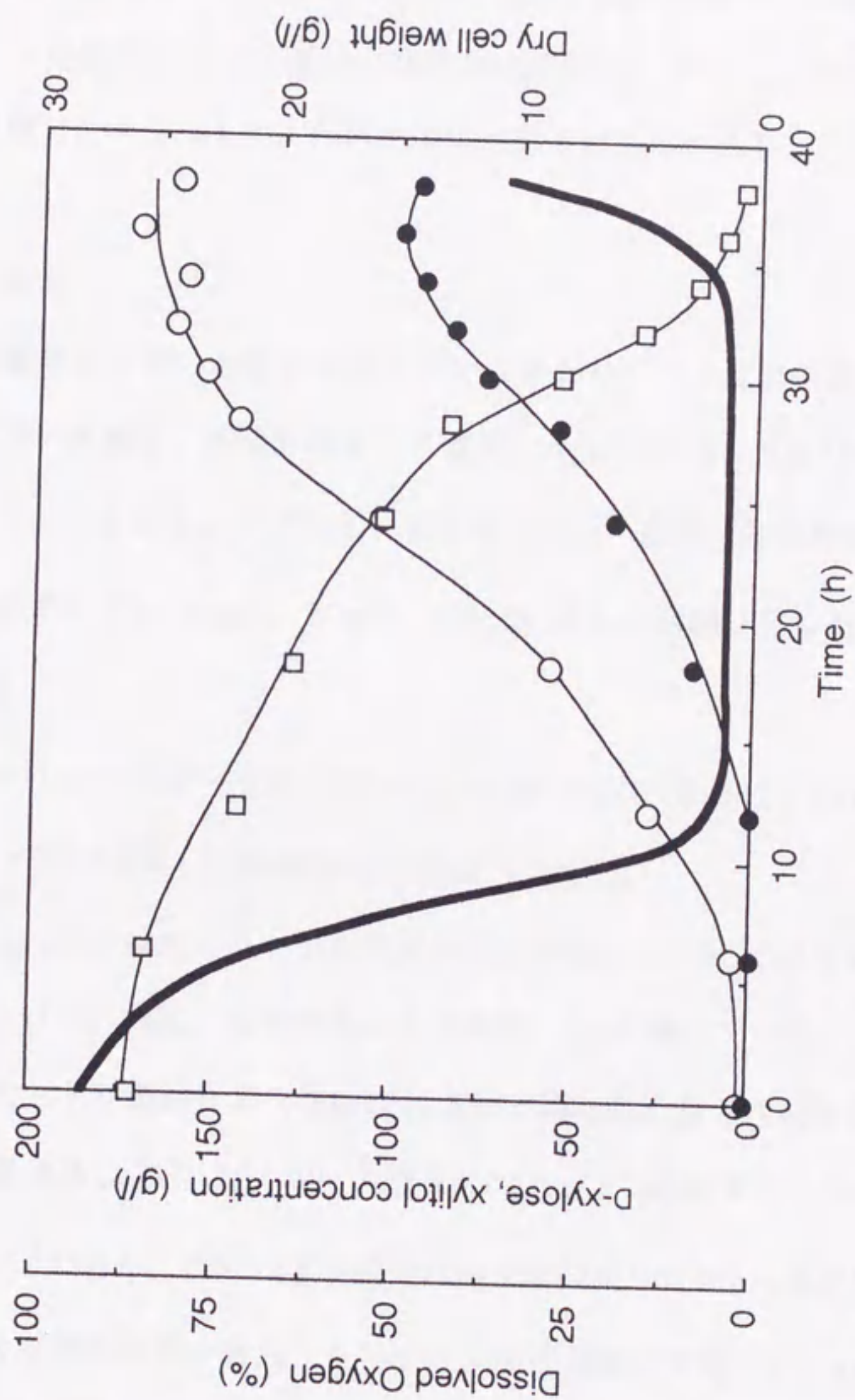


Fig. 1-5 Time course of batch culture at optimum condition.  
 The symbols indicate  $\square$  D-xylose,  $\bullet$  xylitol,  $\circ$  dry cell weight,  
 and bold line dissolved oxygen.



の酸化還元バランスに起因していると考えられる<sup>15)</sup>。培養中期までは菌体量が少ないので菌体の全呼吸量が低く、そのため溶存酸素レベルが高く維持され、菌体内の補酵素は酸化型に傾き、XRを介して生産されたキシリトールは、直ちにXDHの働きによりキシロースへ変換され代謝される。しかし培養の中期以降、著しい菌体の増加は菌体の全呼吸量を高め、その結果、溶存酸素レベルを減少させる。溶存酸素レベルが低下すると、菌体内補酵素は還元型に移行し、XDHの働きを阻害し菌体内に蓄積したキシリトールが培地中に放出されるのであろう。

#### 1-4. 結論

遊離菌体を用いた回分培養においてキシリトール生産速度の向上を目的に、初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ の3要因をBox-Wilson法で最適化した。それぞれの要因をコード化し、初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ の中心点をそれぞれ150g/l、30g/l、308.2h<sup>-1</sup>として実験を行った結果、以下に示す式を得た。

$$P=0.1940A^2-0.0932B^2-0.1551C^2-0.0775AB+0.1875AC+0.1725BC \\ +0.0702A+0.0898B+0.1288C+2.4285$$

ここでPはキシリトール生産速度(g/l·h)、A、B、Cはそれぞれコード化した初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ を表している。

この式により導かれる生産速度は実験で得られた値を説明できている。この結果より、最適点は初発キシロース濃度172.0g/l、初発酵母エキス濃度21.0g/l、 $K_{La}$  451.5h<sup>-1</sup>であり、このとき予測される生産速度は2.67g/l·hとなる。数回の最適点での回分培養の結果、最大キシリトール生産速度は平均で2.71g/l·hであり、実験計画法で求められた予測値に極めて近い値となった。

この研究で得られた結果と、これまでに報告されている主な数値の比較をTable1-



Table 1-7 Xylitol productivity of this study and others.

Strain	Production rate (g/l·h)	Yield	Reference
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0.8	0.80	Izumori K. and Tsuzaki K. <sup>26)</sup>
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	1.04	0.81	Barbosa M.F.S. <i>et al.</i> <sup>4)</sup>
<i>C. tropicalis</i> HXP2	1.67	0.96	Gong C.H. <i>et al.</i> <sup>14)</sup>
<i>C. boidinii</i> No.2201	0.4	0.49	Vongsuvanlert V. <i>et al.</i> <sup>27)</sup>
<i>Candida</i> sp L-102	1.53	0.88	Lu J. <i>et al.</i> <sup>28)</sup>
<i>Candida</i> sp.	2.19	0.81	Cao N.J. <i>et al.</i> <sup>29)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.44	0.54	Watanabe N. <sup>1)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.71	0.64	this study <sup>15)</sup>
(Predicted maximum)	2.67		



7に示す。キシリトール生産速度に関して、過去の研究では最大 $2.44\text{g/l}\cdot\text{h}^{\text{a)}}$ であったのに対して、Box-Wilson法で培養条件を最適化した結果 $2.71\text{g/l}\cdot\text{h}$ にまで高めることができた。この結果からBox-Wilson法での最適化は、このような微生物反応の培養条件の決定において非常に有効であることが示された。

最適点での実験結果について、キシリトール生産のメカニズムと培養条件の最適化による結果とを併せて考察すると、回分反応でキシリトール生産速度を向上させるためには、培養の前半で十分な通気と栄養源で菌体濃度を速やかに増加させ、培養の後半でこの菌体の呼吸により溶存酸素濃度を減少させることが有効な手段である。

#### 文献

- 1) 渡辺則康 1990年度 岐阜大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士論文
- 2) Chen, L.F. and Gong, C.S. (1985) Fermentation of sugar cane bagasse hydrolysate-acclimated yeast., J. Food science, 50, 226-228
- 3) Meyrial, V., Delgenes, J.P., Molletta, R. and Navarro, J.M. (1991) Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*., Biotechnol. Letters, 13, 281-286
- 4) Barbosa, M.F.S., Medeiros, M.B.D., Mancilha, I.M.D., Schneider, H. and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*., J. Indust. Microbiol., 3, 241-251
- 5) Jeffries, T.W. (1983) Effect of nitrate on fermentation of xylose and glucose by *Pachysolen tannophilus*., Bio/Technol., 1, 503-506
- 6) Onishi, H., Suzuki, T. and Onchi, T., (1980) Mechanism of fermentation conversion from polyalcohol fermentation to ethanol by *Pichia* *miso*., Agric. Biol. Chem., 44, 1829-1834
- 7) Palnitkar, S. and Lachko, A. (1992) Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during xylose fermentation by *Candida shehatae*., Can. J. Microbiol., 38, 258-262



- 8) Witt, I. and Helmeyer, L. (1966) Regulation of pyruvate decarboxylase synthesis by coenzyme induction in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 340-345
- 9) Barnett, J.A. (1976) The utilization of sugars by yeasts., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32, 125-234
- 10) Furlan, S.A., Bouilloud, P., Strehaiano, P. and Riba, J.P. (1990) Study of xylitol production from xylose under oxygen limiting condition., Biotechnol. Letters, 13, 203-206
- 11) Roseiro, J.C., Peito, M.A., Girio, F.M. and Amaral-Callaco, M. (1991) The effect of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*, Arch. Microbiol., 156, 484-490
- 12) Scaffers, W.A. (1966) Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen., Nature, 210, 533-534
- 13) Sims, A.P. and Barnett, J.A. (1978) The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose, D-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts., J. Gen. Microbiol., 106, 277-282
- 14) Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2., Biotechnol. Lett., 3, 130-135
- 15) Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T. and Watanabe, N. (1992) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate., Biotechnol. Bioeng., 40, 1085-1091
- 16) 田中豊, 垂水共之(編) (1986) パソコン統計解析ハンドブックⅢ実験計画法編, 初版, 共立出版, 東京
- 17) Kautola, H. (1990) Itaconic acid production from xylose in repeated-batch and continuous bioreactors., Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 7-11
- 18) Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y.Y. and Linko, P. (1991) Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* with varied metal additions., Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 154-158
- 19) Takamizawa, K., Nakashima, S., Yahashi, Y., Kubata, K.B., Suzuki, T., Kawai, K. and Horitsu, H. (1996) Optimization of kojic acid production rate using the box-wilson method., J. Ferment. Bioeng., 82, 414-416
- 20) Madhavi, D.L., Chand, N., Rajalakshmi, D. and Patwardhan, M.V. (1991) Computerized optimization of the relative growth of callus cultures of orange fruit tissues and the study of their biochemical properties., J. Exper. Bot., 42, 917-923



- 21) Taguchi, H. and Humphrey, A.E. (1966) Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation system., J. Ferm. Tech., 44, 881-889
- 22) Cooper, C.M.Fernstrom, G.A. and Miller, S.A. (1944) Performance of agitated gas-liquid contacters., Ind. Eng. Chem., 36, 504-509
- 23) Box, G., Hunter, W. (1957) Multi-factor experimental design for exploring response surfaces., Ann. Math. Stat., 28, 195-241
- 24) Box, G., Hunter, W., Hunter, J. (1978) Statistics for experiments. John Wiley & Sons, New York, pp.374
- 25) 佐藤誠吾 (1990) 高濃度酸素下における発酵生産と微生物増殖の制御., 発酵工学会誌, 68, 411-421
- 26) Izumori, K. and Tuzaki, K. (1988) Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*., J. Ferment. Technol., 66, 33-36
- 27) Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. (1988) L-identol production from L-sorbose by methanol yeast *Candida boidinii*., J. Ferment. Technol., 66, 517-523
- 28) Lu, J., Tsai, B., Gong, C.S. and Tsao, G.T. (1995) Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102., Biotechnol. Letters, 17, 167-170
- 29) Cao, N.J., Tang, R.T., Gong, C.S. and Chen, L.F. (1994) The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast., Appl. Biochem. Biotechnol., 45/46, 515-519

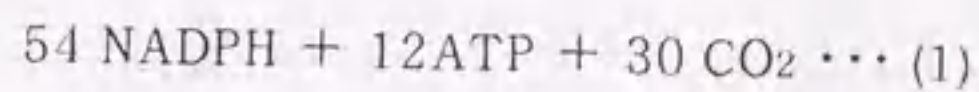
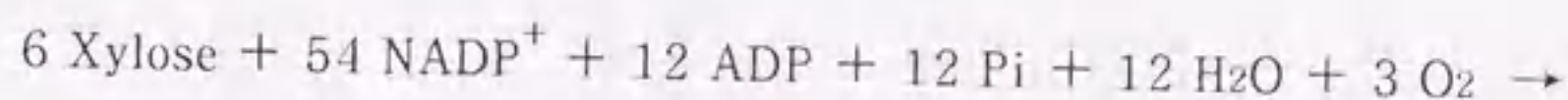


## 第二章 遊離菌体を用いたグルコース流加培養

### 2-1. 緒言

微生物を用いた物質生産の効率化を考えた場合、収率の向上は重要な要素である。収率を向上させるためには、目的とする物質以外の生産物を蓄積しない菌体を選抜する、もしくは目的とする物質以外の生産物を蓄積しない培養条件を設定するなどの方法が考えられる。目的とする物質以外の生産物には生産物の分離、精製で問題となるようないわゆる副生産物の他にも、培養液中から気相へ放出される炭酸ガスや、菌体の増殖による余剰菌体なども含まれる。このためこれら全ての副生産物のもとになる基質をより安価な基質に置き換えることでも、本質的な収率の増加、コストの削減が図れると考えられる。

キシロースからのキシリトール生産はその代謝過程が解明されているので、XRにより消費されるNADPHの再生を考慮することにより、Fig.2-1に示されるように理論収率が計算できる<sup>1)</sup>。まずキシロースは等モルのNADPHと反応し、キシリトールとNADP<sup>+</sup>に変換される。続いてキシリトールはNAD<sup>+</sup>と反応しキシロースとNADHを生じ、NADHは電子伝達系でNAD<sup>+</sup>に再生される。キシロースはペントースリン酸経路に入り、6モルのキシロースから5モルのグルコース6リン酸が導かれ、サイクル内で完全にCO<sub>2</sub>に分解されるまでに60モルのNADPHを再生する。以上の反応をまとめると次式が得られる。



(1)式より6モルのキシロースが完全に消費される際、54モルのNADPHが再生される計算になる。このNADPHと等モルのキシロースがキシリトールに還元されるので次の関係が成り立つ。



6 Xylose + 6 NADPH

6 Xylitol + 6 NAD<sup>+</sup>

6 NADH + 3 O<sub>2</sub> + 18 ADP + 18 Pi

6 xylulose + 6 ATP

6 xylulose 5-phosphate + H<sub>2</sub>O

5 glucose 6-phosphate + 60 NADP<sup>+</sup> + 35 H<sub>2</sub>O

→ 6 xylitol + 6 NADP<sup>+</sup>

→ 6 xylulose + 6 NADH

→ 6 NAD<sup>+</sup> + 18 ATP + 24 H<sub>2</sub>O

→ 6 xylulose 5-phosphate + 6 ADP

→ 5 glucose 6-phosphate + Pi

→ 60 NADPH + 30 CO<sub>2</sub> + 5 Pi

**Net**

6 xylose + 54 NADP<sup>+</sup> + 12 ADP + 12 Pi + 12 H<sub>2</sub>O + 3 O<sub>2</sub> → 54 NADPH + 12 ATP + 30 CO<sub>2</sub> Eq.(1)

54 xylose + 54 NADPH

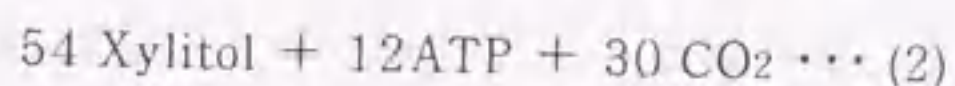
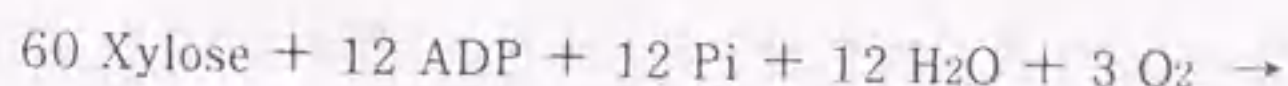
→ 54 xylitol + 54 NADP<sup>+</sup>

**Net**

60 xylose + 12 ADP + 12 Pi + 12 H<sub>2</sub>O + 3O<sub>2</sub> → 54 xylitol + 12 ATP + 30 CO<sub>2</sub> Eq.(2)

Fig. 2-1 Theoretical mass balance of xylitol production.<sup>1)</sup>





(2)式に示されるように合計60モルのキシロースから54モルのキシリトールが生産される計算になる。この計算から理論収率はモル収率で0.9、これに分子量をかけて0.912(g/g)となる。Box-Wilson法による最適点でのキシリトール生産<sup>2)</sup>は菌体の増殖を伴うのでこの理論収率より低い値となる。

リグノセルロース系廃棄物の主成分はセルロース、ヘミセルロース、およびリグニンであることを序章で述べた。このためこのリグノセルロース系廃棄物を加水分解した場合、必然的にグルコースも得られる。そこでこのグルコースを菌体の増殖の基質として積極的に利用する方法を開発することにより、経済的なキシリトール生産が可能になると考えた。しかし加水分解によって、リグノセルロース原料の加水分解を行った際に生成する副産物の酢酸や、フルフラールまたリグニン分解物のフェノール類は微生物の物質変換を阻害する。さらに酸による加水分解の場合は用いた硫酸の硫酸塩が残るなど、その他様々な副産物が生じ微生物に対して阻害作用を及ぼすと言われている<sup>3)</sup>。今後、これらの問題が解決されることが望まれるが、現時点での利用は不可能であるため、本章の研究では純粋なキシロースとグルコースを用いて実験を行った。

*C. tropicalis*のXRは誘導酵素であり、グルコースの存在により誘導が阻害される。このためキシロースとグルコースを用いてキシリトール生産を行う場合、グルコースの濃度を制限する必要がある。そこでグルコースを流加する流加培養法でキシリトール生産を行った。流加培養の利点は培養液中の基質濃度を任意に制御できることにある。

これまでのキシロース発酵またはキシリトール生産に関する報告にも、キシロース以外の炭素源が含まれている例<sup>4-7)</sup>は存在するが、これらは農産廃棄物を加水分解したものや、農産廃棄物の加水分解物を意識して合成したものであり、生産物の生



産速度、もしくは収率を積極的に向上させるための研究ではなかった。そこで本章では農産廃棄物の加水分解物中に多く存在するグルコースを菌体増殖に用いることにより、キシリトールの生産性を高めることを目的として研究を行った。

## 2-2. 材料および実験方法

### 2-2-1. 使用菌株および前培養

1-2-1に準じた。

### 2-2-2. 培地組成および調整法

流加基質を検討する実験ではキシロース20g/l、酵母エキス0.5g/lとし、他の実験ではキシロース150g/l、酵母エキス30g/lとした。他の培地成分、調整法は1-2-2に準じた。

### 2-2-3. 培養方法(カラムリアクター)

1-2-3に準じた。ただしグルコース流加実験ではリアクター上部よりグルコース水溶液を滴下した。通気は90%酸素で行い、通気速度は700ml/minに設定した。

### 2-2-4. 培養方法(2リットル規模のファーマンター)

#### a. 培養器

実験で用いたファーマンター(高崎科学器械製)は典型的なCSTRであり、その全容積は3lである。このファーマンターの出入口を全てシリコン栓あるいはシリコンチューブなどで密栓し、121℃で15分間オートクレーブ滅菌後、キシリトール生産用培地2lを入れファーマンター底部の金属製スパージャーより連続通気し、30℃に保った。また、ガス排出部分に環流冷却器を設置し、培養中の水分蒸発を防いだ。

#### b. 通気方法

培養器への通気は酸素富加装置(小島製作所製 MOX-4)を用いた。この酸素富加装置は連続的に90%の酸素濃度を供給できるものである。通気装置と培養器の間にメンブランフィルター(東洋濾紙製 LABODISK-50CS)を設置し、連続的に除菌した。



通気量はガス流量調節装置(林技研製)にて測定、調節した。

#### c. 培養条件

生育培地で24時間培養した培養液を $3,000\times g$ で10分間遠心分離することにより集菌し、培養器中のキシリトール生産用培地21に無菌的に接種した。攪拌速度は300rpm、通気量は5l/minに設定した。pHは1NのKOHを用いてpHコントローラー(林技研製)により4.0に調節した。任意時間毎に3mlずつサンプリングし、培養時間はキシリトール濃度が最大値を示した後、減少が確認されるまでとした。

#### 2-2-5. グルコース流加方法

##### a. カラムリアクターでの実験

各濃度のグルコース溶液(250, 500, 500, 600g/l)をペリスタポンプ(ATTO製 SJ 1211 L)にて各流加速度(20, 20, 30, 33.3ml/d)でリアクター上部より流加した。これにより、5, 10, 15, 20g/dのグルコース流加速度を得た。なお、用いたグルコース溶液、シリコンチューブは事前にオートクレーブ滅菌し、全ての操作は無菌的に行った。

##### b. ファーマンターでの実験

500g/lのグルコース溶液を流加速度242ml/dでペリスタポンプ(林技研製 101 FD)を用いてファーマンター上部より流加した。これにより、121g/dのグルコース流加速度を得た。なお、用いたグルコース溶液、シリコンチューブは事前にオートクレーブ滅菌し、全ての操作は無菌的に行った。

#### 2-2-6. 分析方法

##### 排出ガス中の炭酸ガス濃度

ファーマンター実験における排出ガス中の炭酸ガス濃度の測定は、CO<sub>2</sub>ガスアナライザー(COS製 GH-250E)を用いて行った。この装置は排出ガス中の炭酸ガス濃度を0-1%のレンジで測定可能である。この装置からの出力をペンレコーダーで連続的に記録し、炭酸ガス濃度を時間で積分して炭酸ガス生産量を計算した。



その他の分析は1-2-5に準じた。

## 2-3. 実験結果および考察

### 2-3-1. 流加基質の違いが菌体増殖に与える影響

流加基質の違いが菌体増殖に与える影響を検討するため、グルコースとキシロースを流加基質(20g/l)として培養実験を行った。この結果をFig.2-2に示す。グルコースを基質として用いた場合、9.5時間でグルコースを完全に消費し、最終菌体量は11.0g/lとなった。これに対してキシロースを用いた場合では、最終菌体量は12時間で8.4g/lであった。消費糖に対する菌体収率はグルコースの場合で0.46(g/g)、キシロースの場合で0.41となった。キシロースを基質として用いた場合ではキシリトールの生産が見られ、この分を消費基質から差し引いて計算し直すと菌体収率は0.45となり、糖基質の違いによる菌体収率は実質的に変わらないといえる。

グルコースを基質として用いた場合の菌体の最大増殖速度は、Fig.2-2(a)に示される5から7.5時間の直線回帰により $2.05\text{g/l}\cdot\text{h}$  ( $r=0.993$ ,  $n=6$ )であるのに対し、キシロースを基質として用いた場合の菌体の最大増殖速度は、Fig.2-2(b)に示される5から9時間の直線回帰により $1.24\text{g/l}\cdot\text{h}$  ( $r=0.998$ ,  $n=5$ )となった。菌体の増殖速度は基質にグルコースを用いる事により、キシロースの場合の1.7倍高い値が得られ、*C. tropicalis*の増殖にはグルコースが適していることが示された。この傾向はMeyrialら<sup>8)</sup>によって示された結果と一致する。彼らは*C. guilliermondii*を用いた培養で、グルコースを基質に用いた場合キシロースを基質に用いた場合に対し、2.2倍高い基質消費速度が得られたことを報告している。これらの結果からキシロースからのキシリトール生産において、グルコースを菌体増殖の基質として用いるという方策は有効であると考えられる。

### 2-3-2. キシリトール生産におけるグルコース流加の効果

初発グルコース濃度が高い場合キシロースの消費が抑制され、グルコースが十分



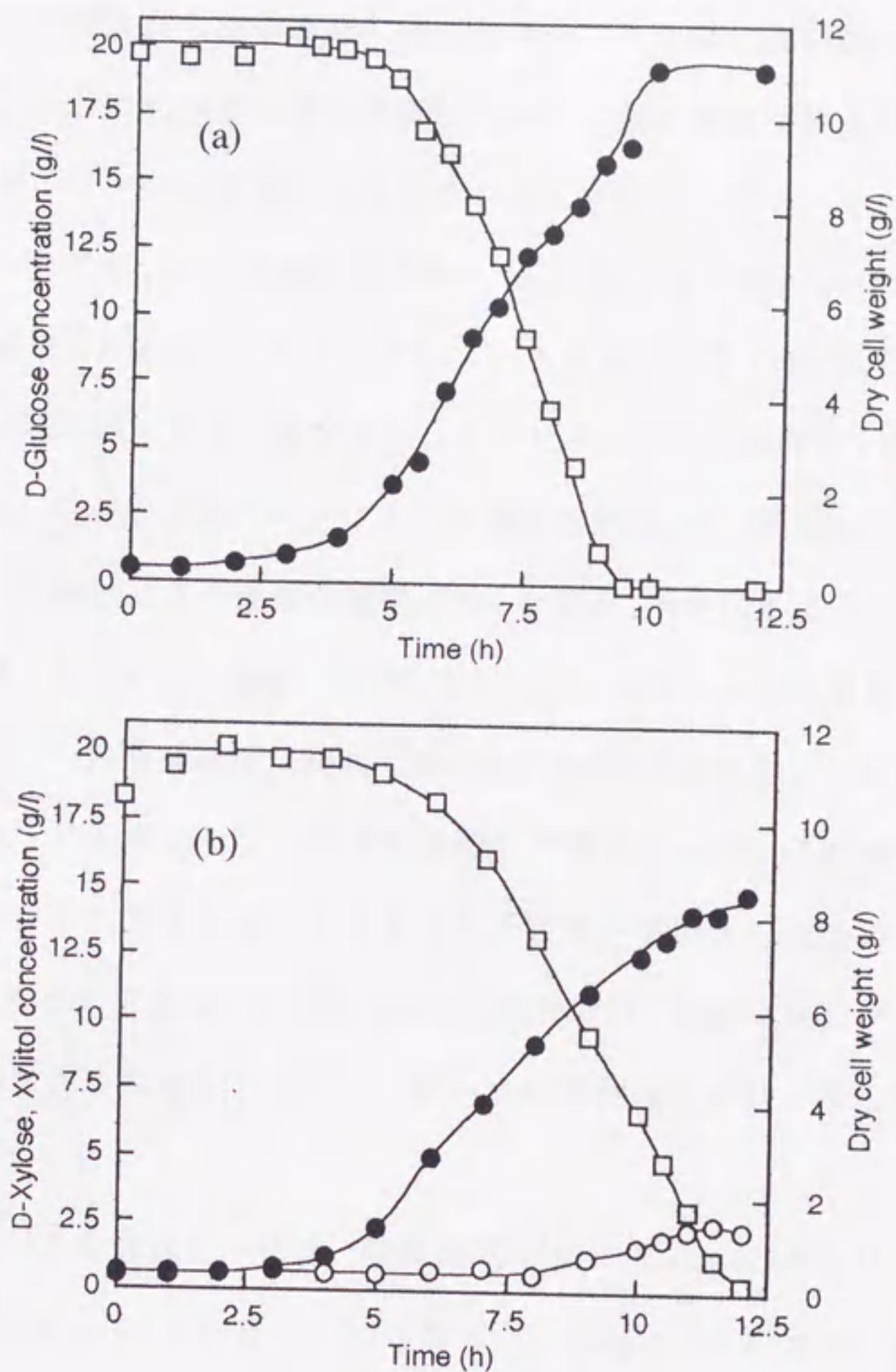


Fig. 2-2 Comparison of cell growth using different sugar sources.

The medium contained (a) 20 g/l D-glucose and (b) 20 g/l D-xylose. The symbols indicate  $\square$  D-glucose and  $\bullet$  dry cell mass in (a), and  $\square$  D-xylose,  $\circ$  xylitol and  $\bullet$  dry cell mass in (b).



に消費された後に菌体増殖やキシリトール生産にキシロースが利用され始めることが混合糖を用いた研究<sup>9,10)</sup>や農産廃棄物の加水分解物を用いた研究<sup>11,12)</sup>から明らかとなっている。この観点から菌体増殖に用いるグルコースは、連続的に培地に流加する方法を採用した。流加速度は流加培養法において最も重要な要因であり、本実験にあたってはグルコースの流加速度を決定しなくてはならない。そこで200mlのカラムリアクターでグルコースの流加速度を0、5、10、15、20g/dに設定して実験を行った。この結果をFig.2-3に示す。グルコースを流加しない場合、150g/lのキシロースは培養42時間後に完全に消費され、キシリトール生産速度は2.01g/l・h、収率は0.56となった。培養終了時のキシリトール濃度は84.5g/l、菌体量は23.1g/lであった。グルコースの流加により菌体の増殖はFig.2-3(c)に示されるように明らかに促進され、その結果としてFig.2-3(b)に見られるようにキシリトール生産量と生産速度が増加した。キシロース消費速度に関してはFig.2-3(a)に示されるように、5g/dの流加速度ではグルコースを流加しない場合と比較して高くなった。これはグルコースの流加により活性化された菌体が、より多くの炭素源を必要としたためキシロースの消費が多くなったためであろう。逆に20g/dの流加では、流加されたグルコースで菌体増殖が十分にまかなわれるため、キシロースの消費速度は低くなったと考えられる。

5g/dでグルコースを流加した場合、培養36時間後に94.0g/lのキシリトールを生産し、生産速度は2.61g/l・h、収率は0.63となった。10g/dでグルコースを流加した場合、培養42時間後に102.2g/lのキシリトールを生産し、生産速度は2.43g/l・h、収率は0.68となった。これらの結果は5g/dまたは10g/dのグルコース流加により、キシリトールの生産性が高められ、1.2-1.3倍の生産速度と1.1-1.2倍の収率がそれぞれ得られた。しかしさらに高い流加速度では、キシリトールの生産性の向上はあまり見られず、培地中にグリセロールとリビトールが蓄積した。20g/dでグルコースを流加した実験では、48時間の培養でグリセロールが6.2g/l、リビトールが8.2g/l生産され



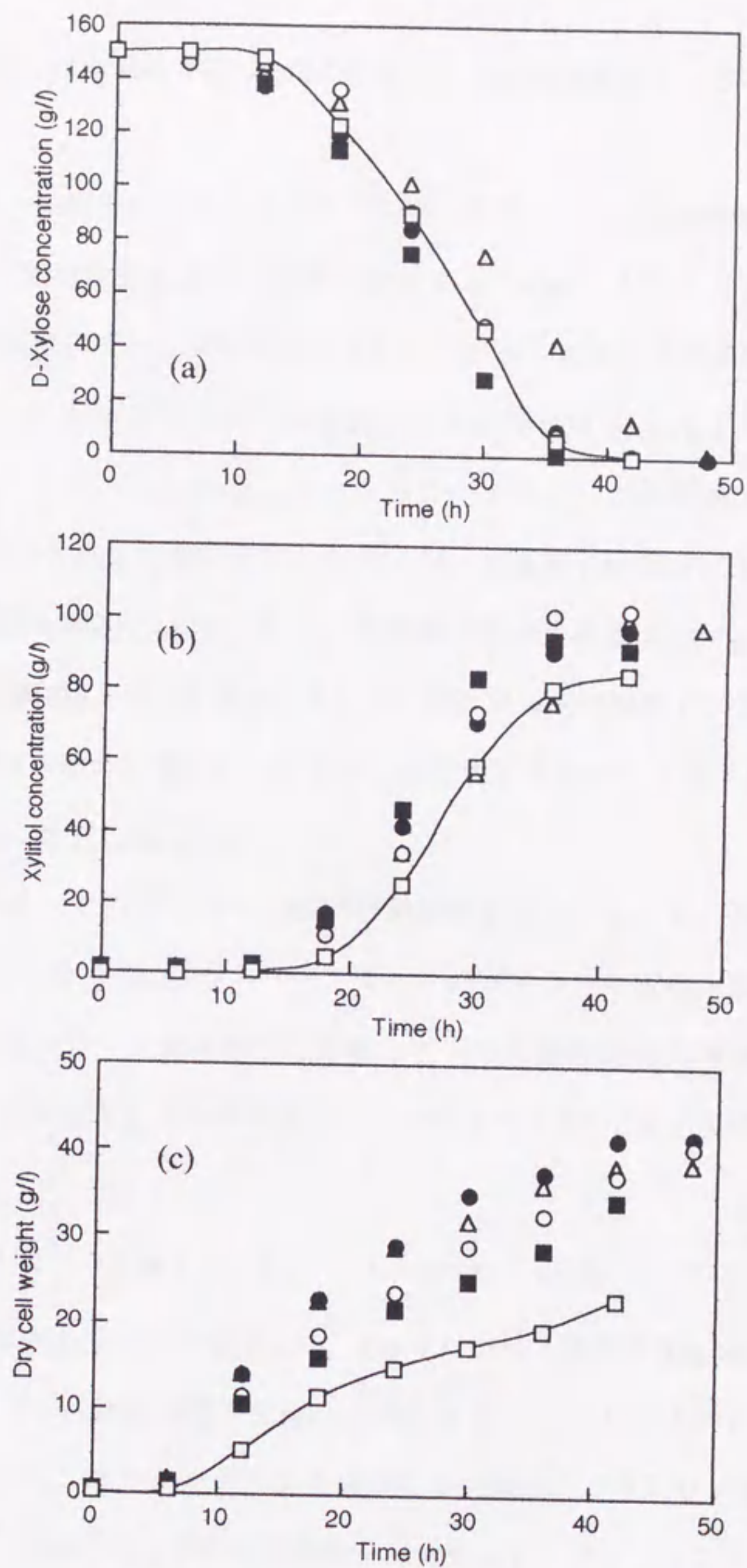


Fig. 2-3. Effect of D-glucose supplementation on xylitol production.

(a) D-Xylose consumption, (b) xylitol production, and (c) cell growth. The symbols indicate D-glucose feeding rates (g/d) for the column reactor (= 200 ml medium),  $\square$ : 0,  $\blacksquare$ : 5,  $\circ$ : 10,  $\bullet$ : 15,  $\triangle$ : 20.



た。このためこの実験系では10g/dのグルコース流加速度がもっとも適していると考えられる。

### 2-3-3. 2リットル規模のファーマンターを用いたグルコース流加培養

グルコース流加効果をさらに詳細に検討するために、カラムリアクターより大型の2リットル規模のファーマンターを用いたグルコース流加培養実験を行った。この結果をFig.2-4に示す。グルコースを流加しない場合[Fig.2-4(a)]、32時間の培養で93.9g/lのキシリトールを生産した。カラムリアクターでの実験(Fig.2-3)と比較して、収率は0.63とあまり違いは見られないが、培養終了時間が10時間短縮されたため、生産速度は2.94g/l・hに向上した。培養終了時の菌体量は22.7g/lで、カラムリアクターでの実験[Fig.2-3(c)]と差はなかった。排出ガス中の炭酸ガス濃度は、菌体の増殖に比例して0.6%まで増加し、培地中に残存するキシロース濃度が30g/lを下回った後、速やかに低下し始めた。

ファーマンターでのグルコース流加培養実験を行うにあたり、グルコース流加速度を決定した。Fig.2-5はカラムリアクターでのグルコース流加速度に対して、全ての培養条件でキシロースが培地中に存在している培養開始後36時間におけるキシリトール濃度をプロットしたものである。このプロットを2次式で回帰すると、次の式が得られる。

$$P = -0.21R^2 + 3.99R + 80.19 \quad (r=0.988, n=5) \cdots (3)$$

ここでPはキシリトール濃度(g/l)、Rはグルコース流加速度(g/d)を表す。

(3)式よりグルコース流加速度が9.5g/dの時、キシリトール生産がもっとも高められることが示された。またグルコースを流加しない場合のカラムリアクター(Fig2-3)とファーマンター[Fig.2-4(a)]での培養時間を比較すると、ファーマンターで培養した方が1.3倍速いことが示されている。そこでファーマンターでのグルコース流加速度は123.5g/dとした。ただし、実際にはグルコース流加用タンク内の溶液の減少速度を実測したところ、グルコース流加速度は121.0g/dであった。



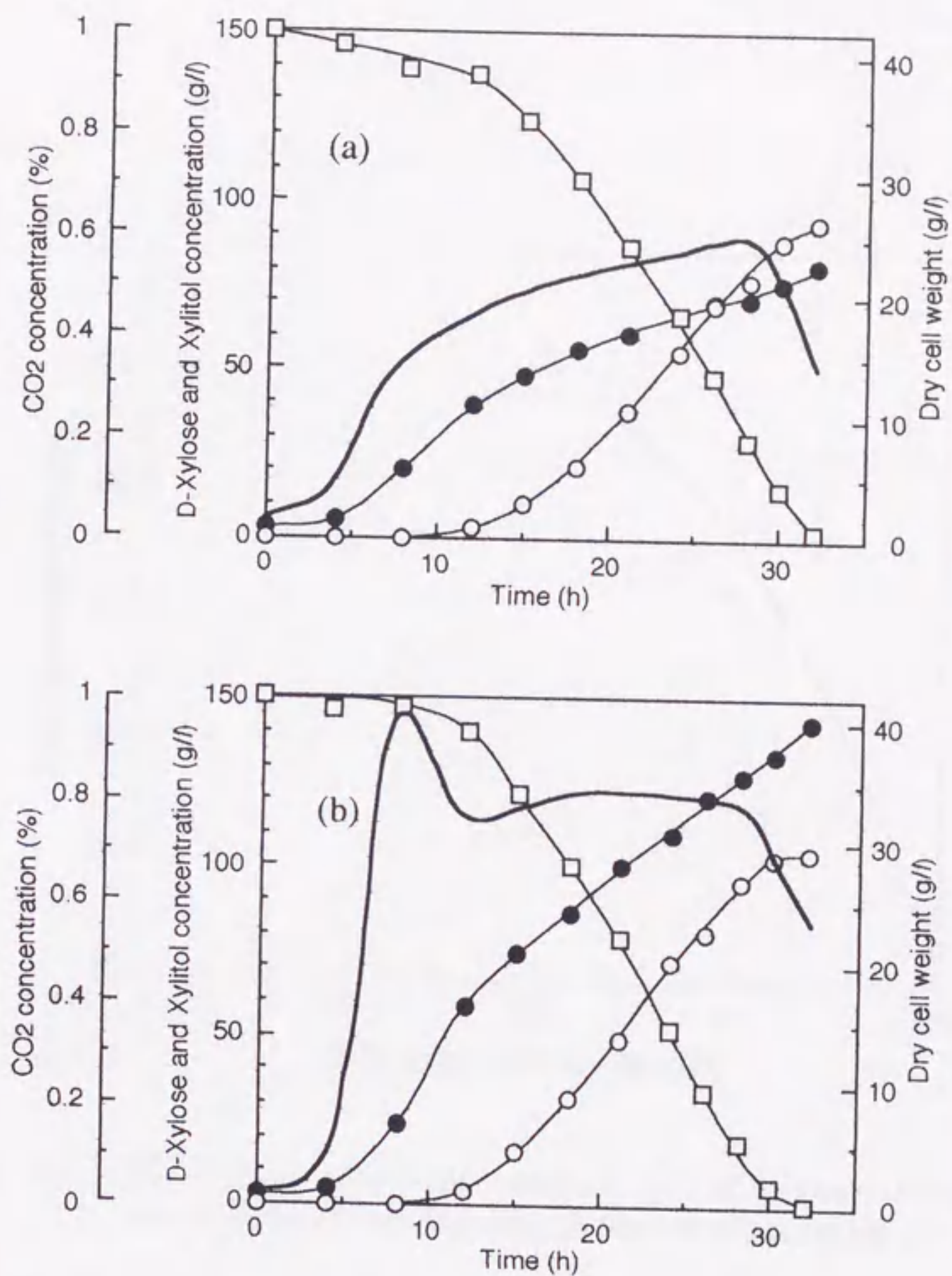


Fig. 2-4 Xylitol production using bench-scale fermentor.

Cultivation was performed without (a) and with (b) D-glucose supplementation. The symbols indicate  $\square$  D-xylose,  $\circ$  xylitol,  $\bullet$  dry cell weight, and bold line CO<sub>2</sub> concentration.



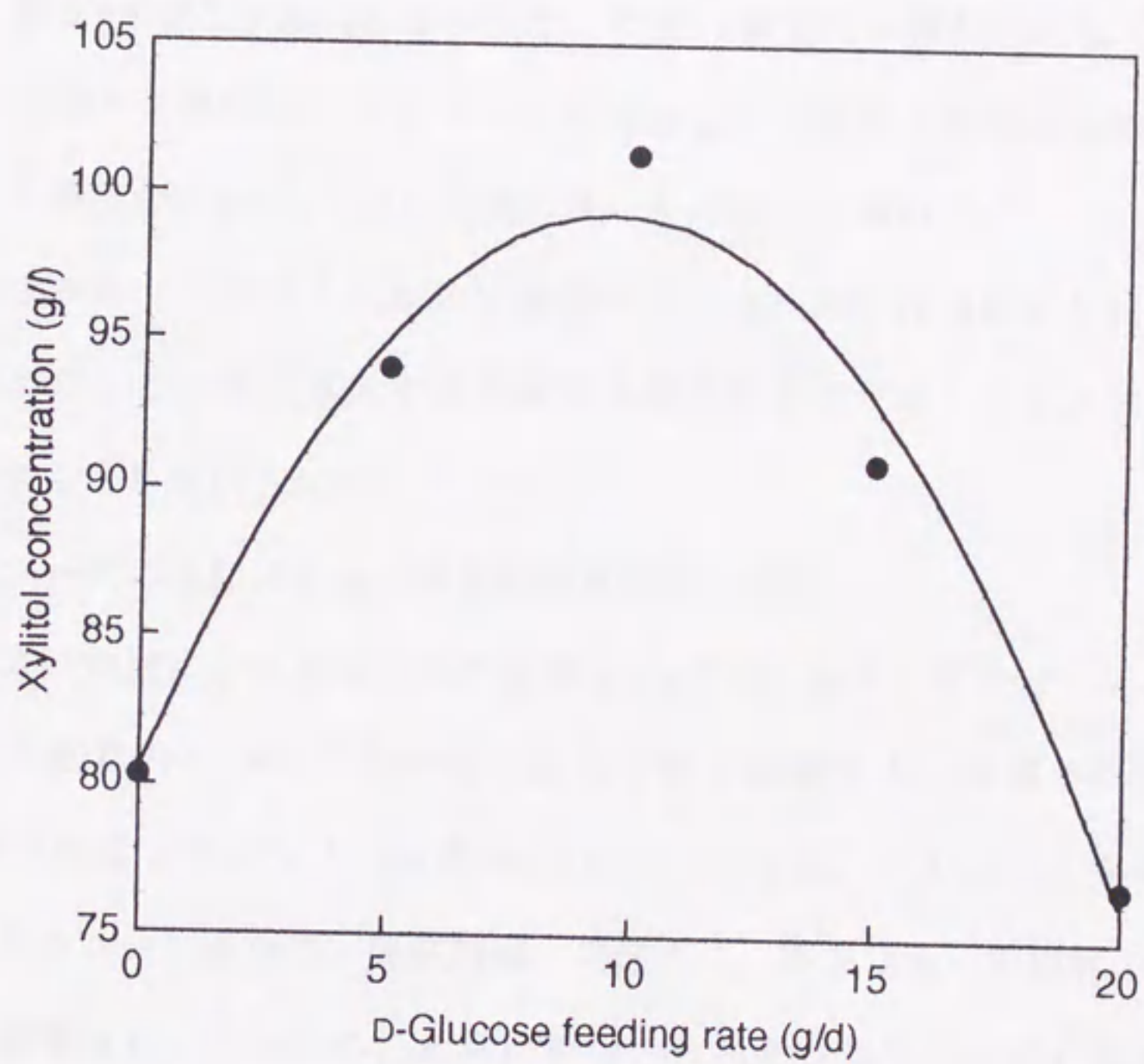


Fig. 2-5 The plots of xylitol concentration (g/l) vs. D-glucose feeding rate (g/d) at 36 h in the column reactor experiments.



フアーメンターでのグルコース流加培養では、Fig. 2-4(b)に示されるようにキシリトール濃度が培養32時間で104.5g/lに達し、3.26g/l・hの生産速度が得られた。菌体量は培養終了時で40.1g/lとなり、この値はカラムリアクターでの実験[Fig. 2-3(c)]と同様であった。排出ガス中の炭酸ガス濃度は、グルコースが培地中に存在する8時間目まで急激に増加し、その後28時間まで約0.8%で安定していた。培地中のグルコース濃度は、培養8時間で8.8g/lとなったが、培養12時間では検出されなくなった。排出ガス中の炭酸ガス濃度は、グルコースを流加しない場合と同様に培地中に残存するキシロース濃度が30g/lを下回った後、速やかに低下し始めた。

以上の結果から、キシリトールの生産性がグルコースの流加により高められることが証明された。また排出ガス中の炭酸ガス濃度を測定することにより、培養終了時を確認できることが示された。

#### 2-3-4. グルコースの流加による炭素源の物質収支の変化

グルコースの流加による炭素収支の変化をFig. 2-6に示す。グルコースを流加しない場合、全炭素量の35.8%が最終的に菌体増殖と炭酸ガスに変換された。その結果、32時間の培養でキシリトール収率は0.63となった。グルコースを流加した場合、加えたグルコースは全て、菌体増殖、炭酸ガス、キシリトール以外のポリオール生産に消費され、このためこれらに利用されるキシロース由来の炭素量が減少し、キシロースとして加えた炭素の20%のみが菌体増殖または菌体の活性維持に利用されたにすぎない。その結果、32時間の培養で297.4gのキシロースを消費し、242.7gのキシリトールを生産したのでキシリトール収率は0.82となった。ただしこの値は見かけの濃度から計算された値ではなく、グルコースの流加による培養液の増加を加味して計算した結果である。この収率は第1章で得られた最適点<sup>2)</sup>での収率の約1.3倍高い値である。

グルコースの流加は菌体増殖の活性化をもたらしたことにより、生産速度の向上にも役立った。第1章で得られた最適点<sup>2)</sup>での生産速度は2.71g/l・hであったのに対



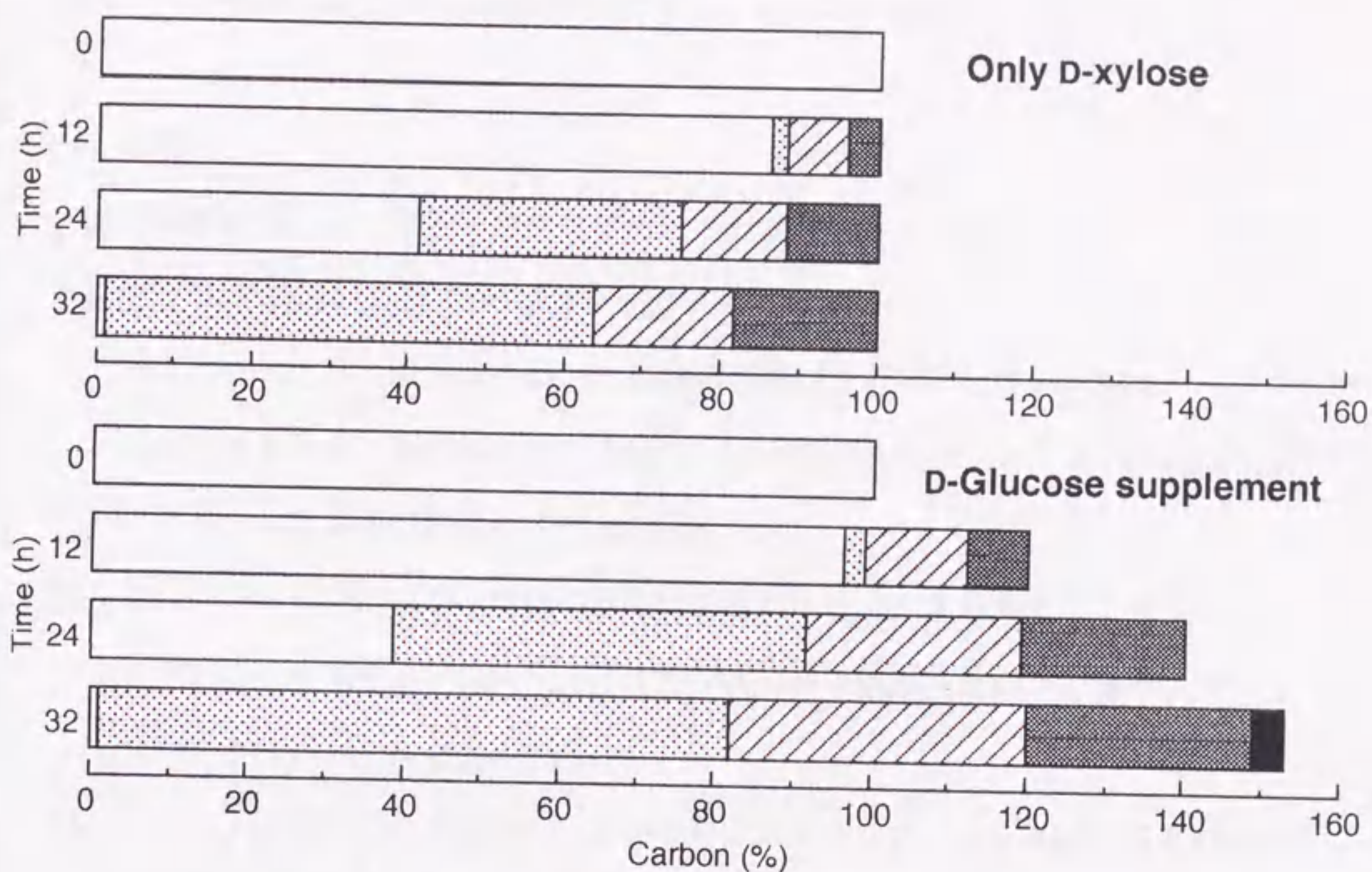


Fig. 2-6 Carbon balance changes with and without D-glucose supplementation.

Each area represents the percentage of total carbon in the cultivation broth and exhausted gas based on initial D-xylose. □: D-Xylose, ▤: xylitol, ▨: cells, ▩: CO<sub>2</sub>, and ■: other polyols (ribitol and glycerol). The amount of intracellular carbon was 0.49 g<sup>-C</sup>/g cell based on atomic ratio, C:H:O:N=1:1.7:0.5:0.2 (mol).



し、フアーメンターを用いたグルコース流加実験では $3.26\text{g/l}\cdot\text{h}$ の生産速度が得られた(Table 2-1)。この結果は初発菌体量が多いほど生産速度が高くなるという、Caoらによって行われた研究<sup>14)</sup>の結果と同じ事を意味している。彼らは初発菌体量を増加させることによりこの結論を得たが、フアーメンターを用いたグルコース流加実験ではグルコースにより菌体増殖を活性化することでこの結論を得た。

#### 2-4. 結論

微生物を用いたキシリトール生産における収率の向上を目的に、グルコース流加培養法について検討した。この結果以下に示すことが明らかとなった。

- (1). グルコースとキシロースを用いて菌体増殖試験を行ったところ、グルコースの培養ではキシロースの場合の1.7倍高い増殖速度が得られ、*C. tropicalis*の増殖にグルコースが適していることが示された。
- (2). グルコースの流加により菌体の増殖は活性化され、その結果としてキシリトール生産量と生産速度が増加した。またグルコース流加速度が高い場合、グリセロール、リビトールを生産した。
- (3). フアーメンターでのグルコース流加培養では、キシリトール濃度が培養32時間で $104.5\text{g/l}$ に達し、 $3.26\text{g/l}\cdot\text{h}$ の生産速度が得られた。また菌体量は培養終了時で $40.1\text{g/l}$ となった。
- (4). フアーメンターでのグルコース流加培養では、32時間の培養で $297.4\text{g}$ のキシロースを消費し、 $242.7\text{g}$ のキシリトールを生産したのでキシリトール収率は0.82と計算された。
- (5). 排出ガス中の炭酸ガス濃度を測定することにより、培養終了時を確認できることが示された。

以上よりグルコース流加培養では、キシリトール収率が向上し、また生産速度も高くなることが示された。



Table 2-1 Xylitol productivity of this study and others.

Strain	Production rate (g/l.h)	Yield	Reference
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0.8	0.80	Izumori K. and Tsuzaki K. <sup>15)</sup>
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	1.04	0.81	Barbosa M.F.S. <i>et al.</i> <sup>1)</sup>
<i>C. tropicalis</i> HXP2	1.67	0.96	Gong C.H. <i>et al.</i> <sup>16)</sup>
<i>C. boidinii</i> No.2201	0.4	0.49	Vongsuvanlert V. <i>et al.</i> <sup>17)</sup>
<i>Candida</i> sp L-102	1.53	0.88	Lu J. <i>et al.</i> <sup>18)</sup>
<i>Candida</i> sp.	2.19	0.81	Cao N.J. <i>et al.</i> <sup>14)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.44	0.54	Watanabe N. <sup>19)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.71	0.64	Section 1 in this study <sup>2)</sup>
(by feeding D-glucose)	3.26	0.82	Section 2 in this study <sup>13)</sup>



## 文献

- 1) Barbosa, M.F.S., de Medeiros, M.B., de Mancilha, I.M., Schneider, H., and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*, J. Industrial Microbiol., 3, 241-251
- 2) Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki T., and Watanabe, N. (1992) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate., Biotechnol. Bioeng., 40, 1085-1091
- 3) Kuhad, R.C. and Singh, A. (1993) Lignocellulose biotechnology: current and future prospects., Critical Rev. Biotech., 13, 151-172
- 4) Roberto, I.C.C., Silva, S.S., Felipe, M.G.A., Mancilha, I.M. and Sato, S. (1996) Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol- effect of pH and nitrogen source., Appl. Biochem. Biotechnol., 57, 339-347
- 5) Pfeifer, M.J., Silva, S.S., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C. and Mancilha, I.M. (1996) Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037., Appl. Biochem. Biotechnol., 57, 423-430
- 6) Dominguez, J.M., Gong, C.S. and Tsao, G.T. (1996) Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast., Appl. Biochem. Biotechnol., 57, 49-56
- 7) Parajo, J.C., Dominguez, Z. and Dominguez, J.M. (1996) Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*- effect of the initial cell concentration., Biotechnol. Letters, 18, 593-598
- 8) Meyrial, V., Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1991) Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour., Biotechnol. Letters, 13, 281-286 .
- 9) Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1989) Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*: effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance., Biotechnol. Bioeng., 34, 398-402
- 10) Grootjen, D.R.J., van der Lans, R.G.J.M., and Luyben, K.Ch.A.M. (1991) Conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* under oxygen-limited conditions., Enzyme Microb. Technol., 13, 648-654
- 11) Roberto, I.C., Felipe, M.G.A., Lacis, L.S., Silva, S.S., and Mancilha, I.M. (1991) Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production., Biores. Technol., 36, 271-275



- 12) Roberto, I.C., Mancilha, I.M., Souza, C.A., Felipe, M.G.A., Sato, S., and Castro, H.F. (1994) Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*, *Biotechnol. Letters*, 16, 1211-1216
- 13) Yahashi, Y., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T., and Takamizawa, K. (1996) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding., *J. Ferment., Bioeng.*, 81, 148-152
- 14) Cao, N.J., Tang, R., Gong, C.S., and Chen, L.F. (1994) The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast., *Appl. Biochem. Biotech.*, 45, 515-519
- 15) Izumori, K. and Tuzaki, K. (1988) Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*., *J. Ferment. Technol.*, 66, 33-36
- 16) Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2., *Biotechnol. Letters*, 3, 130-135
- 17) Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. (1988) L-identol production from L-sorbose by methanol yeast *Candida boidinii*., *J. Ferment. Technol.*, 66, 517-523
- 18) Lu, J., Tsai, B., Gong, C.S. and Tsao, G.T. (1995) Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102., *Biotechnol. Letters*, 17, 167-170
- 19) 渡辺則康 1990年度 岐阜大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士論文



### 第三章 固定化菌体を用いたグルコース流加培養によるキシリトール生産

#### 3-1. 緒言

微生物による物質生産において、効率的な生産を可能にする技術として固定化技術が挙げられる。この利点は生体触媒である菌体を安定化させる、系内に高濃度で保持する、系外への流出を防ぐので、リアクター運転時の安定性が高まる、反応速度、収率の向上が見込まれる、菌体の除去作業が容易になる、菌体を繰り返し利用できるなどの効果が期待できる。固定化方法としては、共有結合、イオン結合、物理的吸着、生化学的特異結合などにより不溶性の担体に固定化する担体結合法、グルタルアルデヒドのような複数の官能基を持つ試薬によって菌体の細胞壁、あるいは細胞膜を強固にし、菌体間を架橋して固定化する架橋法、低分子化合物を重合または会合させるか、あるいは高分子化合物を可溶の状態から不溶の状態に移行させることによって生ずる高分子ゲル(格子型)、マイクロカプセルあるいは限界濾過膜内へ菌体を閉じこめる包括法、さらにこれらを適当に組み合わせた複合法などがある。現在までに研究、実用化された例は、担体結合法、包括法がほとんどで、酵母菌体を固定化した例は食品分野を中心に活発である。例えばセラミックスを担体とした担体結合法だけでも、醤油<sup>1-3)</sup>、ビール<sup>4)</sup>、日本酒<sup>5)</sup>など数多くの報告例がある。

これに対し、固定化菌体、固定化酵素を用いたキシリトール生産については、報告例が少ない。IzumoriとTuza<sup>6)</sup>はキシロースをキシリトールに変換する能力を持つ *Mycobacterium smegmatis* とキシロースイソメラーゼをアルギン酸カルシウムで包括固定化し、キシリトール生産を行った。その結果、50時間の反応で5%のキシロースから4%のキシリトールを生産し、収率は0.80であったと報告している。また Nisio<sup>7)</sup>は、*Candida pelliculosa* の休止細胞中のXRと、*Methanogen* strain HUを用いて、NADPH再利用システムを考案し、種々のゲルを用いての固定化連続キシリトール生産を行った。Roca<sup>9)</sup>はXR遺伝子を組み込んだ *S. cerevisiae* を3価のアルミニウムイオンで強化したアルギン酸ゲルに包括固定化した。この菌体でキシリトール生



産を行い、高い生産性が得られたことを報告している。

近年になって全く新しい素材を担体とした固定化方法の開発も盛んに行われるようになった。その注目すべき素材の1つに不織布が挙げられ、基質の透過性、取り扱いやすさ、経済性の点から有用性が認められつつある。不織布とは文字通り織らない布のことであるが、広義には「繊維(短繊維あるいは長繊維)集合体を機械的、化学的あるいは加熱という手段を用いて接着または交絡させてシート状またはウェブ構造にしたもの」と解釈されている<sup>9)</sup>。アメリカのPellon社が1952年にナイロン75%、綿またはレーヨン25%からなるウェブを、ニトリルゴムで接着したのが産業的な不織布製造の始まりとされている<sup>10)</sup>。不織布の特徴は用いる繊維、接着方法によって異なるが概ね次のようなものが挙げられる。

- (1) 多様な外観を呈し紙、布、フェルト形状のものができる。
- (2) 触感は多様で硬軟いずれも可能である。
- (3) 厚さが自由に変えられる。
- (4) かさ高で多孔性のため通気性がよく、吸湿性、吸水性、保水性に富む。
- (5) 使用される繊維とバインダは合成高分子が主であるから、防しわ性、寸法安定性、弾性が高く、速乾性である。
- (6) 縫い合わせ、溶着、接着ができる。
- (7) 切断した端がほつれない。
- (8) 織物やニットのようなドレープ性がない。
- (9) 科学加工性(染色、抗菌加工等)に富む。
- (10) 各種殺菌処理( $\gamma$ 線、熱、エチレンオキシドガスなど)が可能である。

現在一般的な不織布の用途としては衛生医療品、家庭用品、各種フィルターやワイパー、土木建設用、農業用、電気絶縁用などがある<sup>11)</sup>。固定化基質としては、その経済性、安定性、加工のしやすさなどから近年になり研究されるようになった。

不織布を固定化担体として利用した例をいくつか挙げる。Sakuraiら<sup>12)</sup>は *Aspergillus niger* の菌糸体を気相で増殖固定化し、これを液体培養することによりグ



ルコン酸の生産を行った。Kawabataら<sup>13)</sup>は菌体を特殊加工した不織布表面に固定化し、アスパラギン酸の連続生産を行った。動物細胞ではヒト肺繊維芽細胞を不織布に固定化して培養したという報告<sup>14)</sup>、細胞を平面的ではなく立体的に増殖させる報告<sup>15)</sup>などがある。また酵素を不織布繊維表面上にコーティングする技術<sup>16-18)</sup>や、不織布繊維をプラズマで処理することで表面を親水化させる方法<sup>19)</sup>も考案されている。このように不織布固定化法はこれまでの固定化法同様、もしくはそれ以上の好結果が得られている。

本章ではバイオプロセス中のシードの調整工程と下流工程のプロセス中の菌体除去工程を簡略化する目的で各種固定化法について、キシリトール生産での有効性を評価し、さらに生産性の改善を図った。

### 3-2. 材料および実験方法

#### 3-2-1. 使用菌株および前培養

1-2-1に準じた。

#### 3-2-2. 固定化方法

##### a. アルギン酸カルシウム包括法

生育培地で24時間前培養した培養液を $3,000 \times g$ で10分間遠心分離することにより集菌し、滅菌水で洗浄後、同条件で集菌したものを固定化に供した。固定化方法はCheethanら<sup>20)</sup>の方法を参考にして次のように行った。4gのアルギン酸ナトリウムを100ml容の三角フラスコ中で50mlの純水に溶解後、オートクレーブ滅菌した。冷後、洗浄菌体湿重10gを含む菌体懸濁液50mlを加え混合した後、氷温で連続攪拌中の塩化カルシウム溶液に滴下した。その後、同液中で0℃、2時間浸漬する事によりビーズの安定化を図った。以上の操作は全て無菌的に行った。また口径の異なった点滴ノズルを用いることにより、直径約2mmおよび4mmのビーズ状アルギン酸カルシウムゲルを調整した。このビーズ状アルギン酸カルシウムゲルを30ml植種に用い



ることにより、初発菌体量は菌体乾重量で約3g/lとなる。

#### b. ポリアクリルアミドゲル包括法

生育培地で24時間前培養した培養液を $3,000\times g$ で10分間遠心分離することにより集菌し、滅菌水で洗浄後、同条件で集菌したものを固定化に供した。固定化方法はYamamotoら<sup>21)</sup>の方法を参考にして次のように行った。洗浄菌体湿重10gを100mlビーカー中で32mlの滅菌水に懸濁し、アクリルアミドモノマー6gと $N,N'$ -メチレンビスアクリルアミド0.32gを加えた。さらに重合促進剤として5%  $\beta$ -ジメチルアミノプロピオニトリル4ml、重合開始剤として2.5%  $K_2S_2O_8$ 溶液4mlを加え混合後、室温で15分間放置してゲル化した。形成したゲルはゲルカッターを通し、さらにナイフで1辺約2mmおよび4mmの立方体に形成した。以上の操作は全て無菌的に行った。この立方体状ポリアクリルアミドゲルを30ml植種に用いることにより、初発菌体量は菌体乾重量で約5g/lとなる。

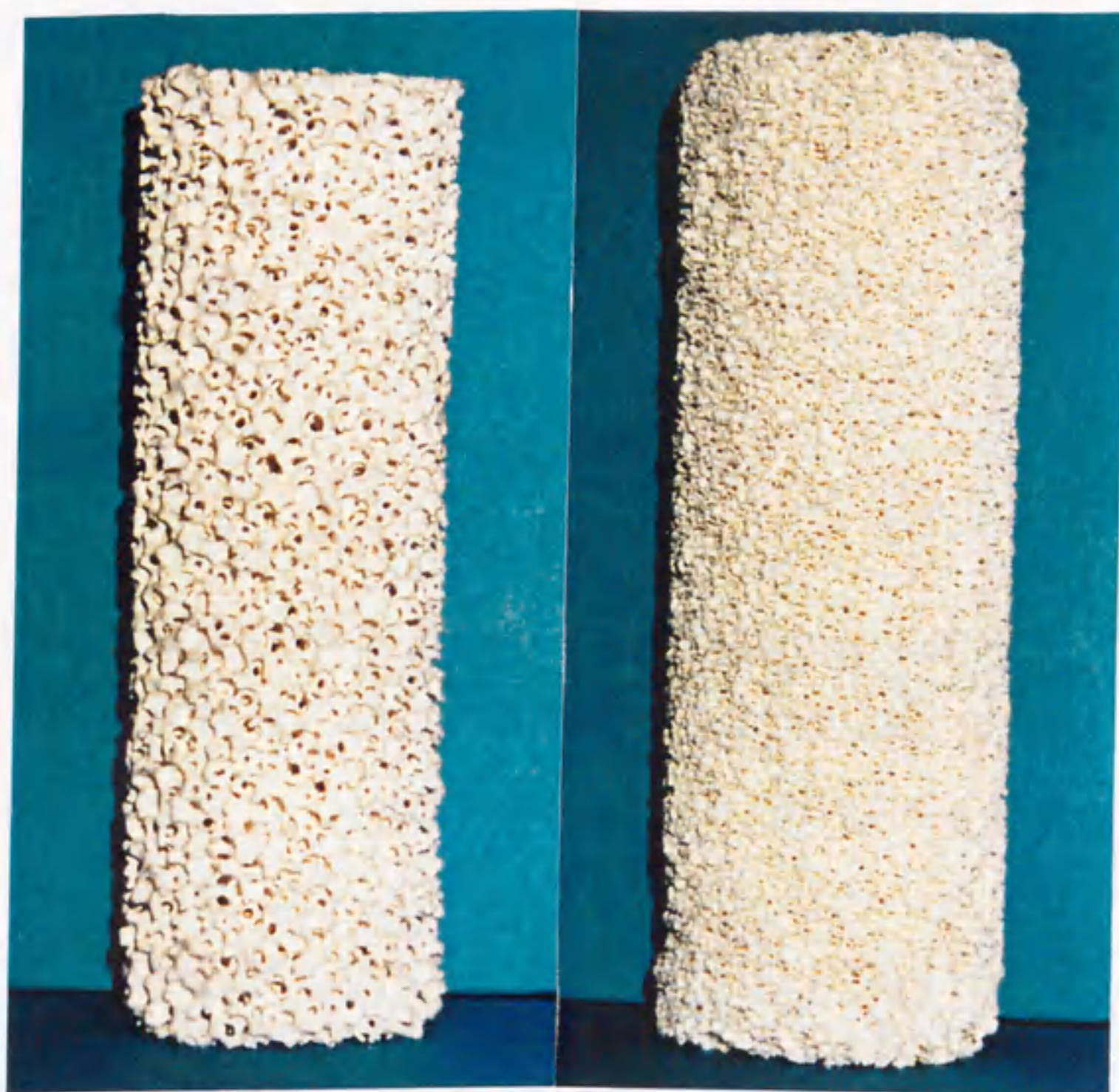
#### c. セラミックス吸着法

固定化担体として用いた繊維状円筒型セラミックスは外形35mm  $\phi$ 、内径10mm  $\phi$ 、高さ100mm、目の粗さ13及び20ppi(pores per inch)であり、この組成は $Al_2O_3:SiO_2=90:10$ である。この円筒型セラミックスをFig.3-1に示す。あらかじめ円筒型セラミックスをカラムリアクター内に挿入して、リアクターと共にオートクレーブ滅菌しておき、初発菌体濃度が約0.5g/lとなるように植種したキシリトール生産用培地200mlを投入した。酵母菌体のセラミックス担体への吸着固定化は、酵母菌体表面とセラミックス表面のゼータ電位の差により引き起こされる<sup>22)</sup>ので、本実験においては特別な固定化操作を特に行わず、セラミックス担体の入ったカラムリアクター内で、通気によって対流することにより自然に吸着する方法をとった。

#### d. 不織布吸着法

固定化担体として用いた不織布は厚さ2.1mm、重さ $200g/m^2$ でポリエステル繊維を素材としている。この不織布を $10\times 11.5cm$ の長方形に切断し、線径1.6mmのステンレス製ワイヤーをコイル状に加工した支持体に巻き、端を縫いつけて固定した。





(a)

(b)

Fig. 3-1 Photograph of cylindrical ceramics used for immobilizing carrier.  
(a) 13ppi (pores per inch); (b) 20ppi



用いたステンレス製コイル状支持体と不織布固定化担体をFig.3-2に示す。あらかじめ不織布担体をカラムリアクター内に挿入して、リアクターと共にオートクレーブ滅菌しておき、初発菌体濃度が約10g/lとなるように植種したキシリトール生産用培地200mlを投入した。酵母菌体の不織布担体への吸着固定化は、特別な固定化操作を特に行わず、不織布担体が入ったカラムリアクター内で、通気によって対流させることにより(Fig.3-3)自然に吸着する方法をとった。

### 3-2-3. 培地組成および調整法

キシロース150g/l、酵母エキス30g/lとした。他の培地成分、調整法は1-2-2に準じた。

### 3-2-4. 培養方法

1-2-3に準じた。ただしグルコース流加実験ではリアクター上部よりグルコース水溶液を滴下した。通気は90%酸素で行い、通気速度は700ml/minに設定した。

3-3-3の反復回分流加培養では各回の培養終了後、不織布担体を取り出し滅菌水で余剰菌体を取り除いたのち、不織布担体をリアクターに戻して新鮮培地を供給した。培養時間は72時間で一定とした。

### 3-2-5. グルコース流加方法

2-2-5に準じた。

### 3-2-6. 分析方法

1-2-5に準じた。

不織布に固定化された菌体量は次の方法で測定した。培養終了後の不織布固定化担体を取り出し、付着した菌体を500mlの洗浄水(純水)で洗浄した。洗浄水を交換して洗後の水の懸濁が目視で観察されなくなるまでこの操作を繰り返した。用いた洗浄水を全て回収し、この一部を吸引濾過後105℃で乾燥し、乾重量を測定した。





(a)

(b)

Fig. 3-2 Photograph of stainless coil and nonwoven fabric used for immobilizing carrier.

(a) Stainless coil used for a support of nonwoven fabric;  
(b) Nonwoven fabric



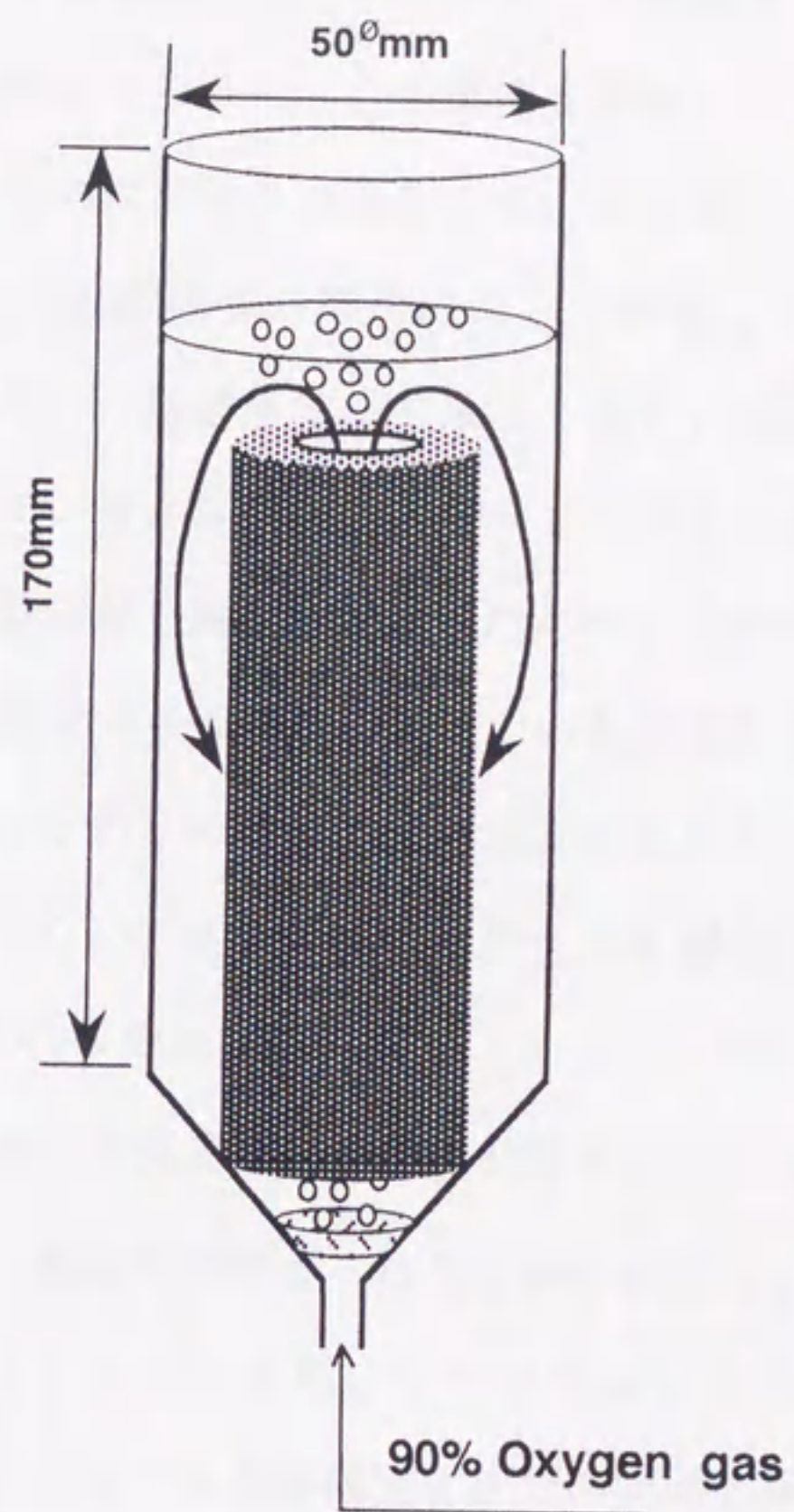


Fig.3-3 Schematic illustration of immobilization procedure on nonwoven fabric.



### 3-3. 実験結果および考察

#### 3-3-1. 固定化方法の選択

もっとも優れた固定化能を有する固定化方法を選択するため、アルギン酸カルシウム、ポリアクリルアミドによる包括法とセラミック、不織布を担体とした吸着法について、それぞれの固定化能、キシリトール生産性を評価した。ここでの固定化能は下流工程での菌体除去工程の簡易化を目的としているので、担体に保持されている菌体量ではなく、培地中の遊離菌体の増加によって評価している。この結果と、比較のために遊離菌体を用いた最適点での結果(1-3-4)をTable3-1に示す。包括固定化法を用いた場合、アルギン酸カルシウム、ポリアクリルアミドのどちらもゲル内から菌体が漏出し、この菌体が培地中で増殖したため、最終的な遊離菌体量は20g/l以上となった。これは遊離菌体を用いた最適点での最終菌体量と大差なく、固定化による下流工程での利点はないといえる。また比表面積がキシリトール生産性に与える影響について検討するため、サイズの違うビーズを調整して実験を行ったが、これについても効果は見られなかった。

過去の報告例<sup>1,2)</sup>において、酵母菌体を用いた嫌気発酵では菌体をセラミックス担体へ吸着固定化する事により、生産性が高まったことが示されている。そこで細孔のサイズの違う2種類のセラミック担体を用いてキシリトール生産実験を行った(Table3-1)。13ppiのセラミック担体では包括固定化法での実験と同様に、漏出菌体の増殖が著しく、培養終了時の遊離菌体量は遊離菌体を用いた実験と同じであった。20ppiのセラミック担体を用いた場合には菌体の漏出はやや改善されたが、培養終了時の遊離菌体量は17.6g/lとなり、下流工程での菌体除去工程の簡易化をもたらすには及ばないであろう。このように一般的な固定化法では菌体固定化能が低く、本章の目的である菌体除去工程の簡易化のための固定化には適さないことが判明した。

不織布を吸着固定化担体として用いた場合(Table3-1)には、培養開始時点に初発菌体として加えた菌体で培地は濁っていたが、1、2時間の培養でこの菌体が完全に不



Table 3-1 Comparison of immobilizing materials on production of xylitol.

Immobilizing method	Cultivation time (h)	Xylitol produced (g/l)	Production rate (g/l·h)	Yield	Leaked cell in broth (g/l)
Ca-alginate (2mm) <sup>1</sup>	40	86.2	2.16	0.50	23.2
Ca-alginate (4mm) <sup>1</sup>	44	75.6	1.72	0.47	21.0
Polyacrylamide (2mm) <sup>1</sup>	44	61.1	1.39	0.36	26.2
Polyacrylamide (4mm) <sup>1</sup>	44	63.0	1.43	0.40	20.8
Ceramic (13ppi) <sup>2</sup>	36	54.6	1.52	0.45	25.3
Ceramic (20ppi) <sup>2</sup>	64	28.1	0.44	0.33	17.6
Nonwoven fabric <sup>2</sup>	80	12.5	0.16	0.19	0.0
Free cells <sup>3</sup>	36	99.8	2.71	0.64	25.9

1,2: initial D-xylose concentration was 170 g/l (1) and 150 g/l (2).

3: culture condition was described in section 1.



織布に固定化されて、培地が澄んだ状態となった。そして培養終了時までこの状態が保たれ、菌体の漏出は見られなかった。このように不織布の固定化能は他の固定化法と比較して高いことが示されたが、キシリトールの生産性は非常に低い結果となった。

### 3-3-2. 不織布固定化培養におけるグルコース流加効果

3-3-1では不織布固定化法の菌体固定化能が高いことが示されたが、キシリトール生産性が低く、このままの利用は困難である。第2章においてグルコースの流加がキシリトールの生産性を向上させることを示した<sup>23)</sup>。そこで不織布固定化培養でのグルコースの流加効果について検討した。Fig.3-4にこの経時変化を、またFig.3-5に培養開始時および培養開始24時間後の固定化菌体の様子を示す。グルコースを流加しない場合(a)ではキシロースの消費が非常に緩やかなのに対し、グルコースを流加した場合(b)、64時間でキシロースをほぼ完全に消費した。またキシロースの消費と連動してキシリトールの蓄積も見られ、64時間で86.6g/lまで生産された。このように固定化菌体においても、グルコースの流加によりキシリトール生産性の改善が見られ、グルコース流加のキシリトール生産での有効性が確認された。また固定化された菌体量を培養終了時で比較すると、グルコースを流加しない場合ではリアクターあたり乾重量で3.74gであったのに対し、グルコースを流加した場合では5.80gとなり、約1.6倍増加した。この差は肉眼でも観察できた(Fig.3-5)。第2章の遊離菌体を用いたグルコース流加実験<sup>23)</sup>においても、培養終了時の菌体量はグルコースを流加しない場合で23.1g/l、グルコースを流加した場合では37.1g/lとなり、約1.6倍の増加が観察されている。この結果からグルコースの流加は遊離菌体同様、固定化菌体についてもその増殖を活性化し、このためキシリトールの生産性が向上できたと考えられる。

つぎにグルコース流加速度が不織布固定化培養でのキシリトール生産性に与える影響について検討するため、グルコース流加速度を0～20g/dに設定して実験を行った。この結果をTable3-2に示す。キシリトール生産性の向上において、グルコース



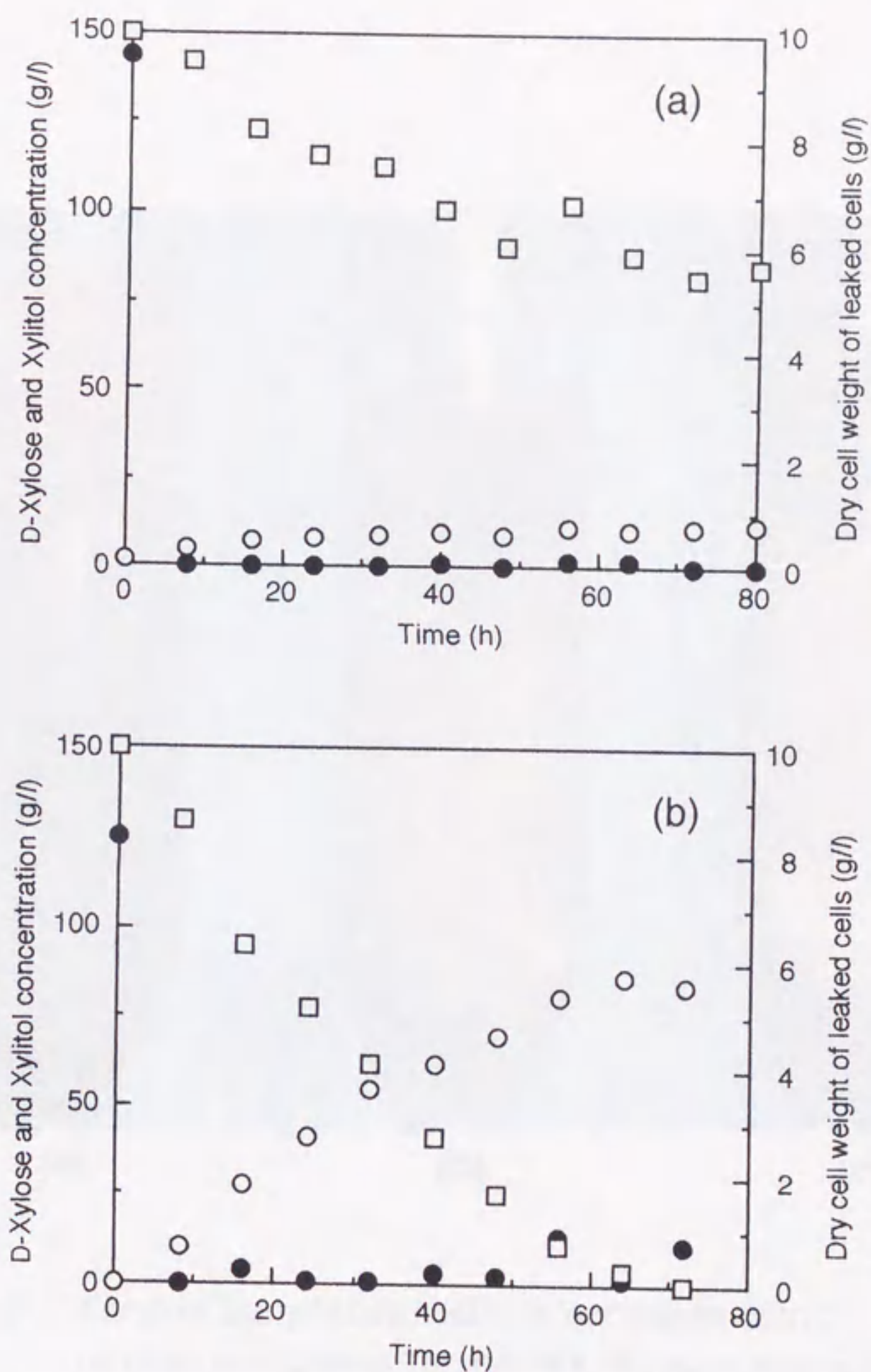


Fig. 3-4 Xylitol production using immobilized cells on nonwoven fabric.  
Cultivation was performed without (a) and with (b) D-glucose feeding.  
The symbols indicate  $\square$  D-xylose,  $\circ$  xylitol,  $\bullet$  dry cell weight of leaked cells.



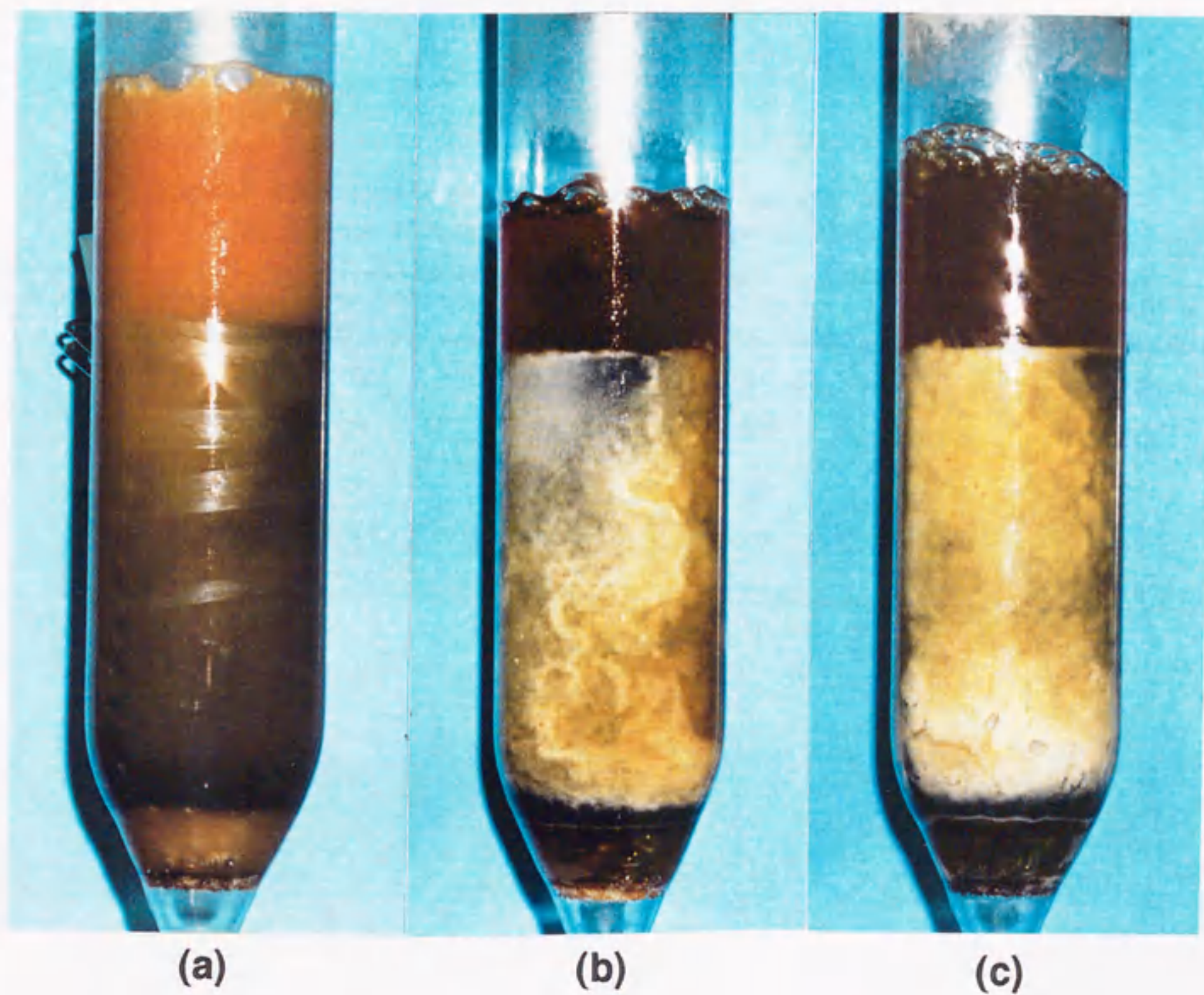


Fig. 3-5 Photo of immobilized cells on nonwoven fabric.  
(a) initial of cultivation; (b) after 48 h cultivation without D-glucose feeding; (c) after 48 h cultivation with D-glucose feeding of 10 g/d



Table 3-2 The effect of D-glucose feeding rate on xylitol productivity using immobilized cells on nonwoven fabric.

D-glucose feeding rate (g/d)	Cultivation time (h)	Xylitol produced (g/l)	Production rate (g/l·h)	Yield	Leaked cell in broth (g/l)
0	80	12.5	0.16	0.19	0.0
5	80	73.3	0.92	0.62	0.0
10	64	86.6	1.35	0.60	0.1
15	72	100.9	1.40	0.67	0.8
20	56	101.6	1.81	0.69	1.8



流加の効果は低い流加速度においても十分に見られた。これは第2章の遊離菌体を用いたグルコース流加実験<sup>23)</sup>と同様の結果である。収率についてもグルコースの流加で改善されたが、流加速度の高低に関わらず0.60~0.69とほぼ一定の値を示し、この傾向は遊離菌体での結果と一致している。10g/dの流加速度では菌体の漏出は観察されなかったが、15g/d以上の流加速度では遊離菌体量が増加した。これは系内の菌体量がグルコースの流加により不織布の固定可能を上回ったためと考えられる。グルコース流加速度が15および20g/dの場合では、培養終了時に4および7g/lの未消費のグルコースが培地中に存在していた。これは培養中期以降、不織布担体上で増加した菌体が通気による培地の対流を妨げ、リアクター系内が閉塞し、このため菌体への酸素供給が不足して基質の消費速度が低下したためであると推察される。本研究で用いた*C. tropicalis*は嫌気条件下で擬菌糸を形成することが知られているが、顕微鏡観察により不織布固定化菌体が擬菌糸を形成していることが示された。この結果は先の推察を支持している。以上の結果からこの実験系でのグルコース流加速度は、10g/d程度が最良であると判断した。

### 3-3-3. 反復回分流加培養でのキシリトール生産

反復回分培養法は、回分培養終了後培養液から菌体を分離し、その一部または全量を発酵槽に戻し、新たに調整した培地を加えて次の回分培養を行う培養法である。この方法の利点は、前培養の必要がないこと、主発酵槽の洗浄、殺菌操作が省けること、初期菌体濃度を高くして培養できることなど回分培養の操作時間を短縮できることである。しかし、培養液からの菌体分離操作が必要で、かつ無菌的に処理せねばならないことなどの問題点もある<sup>24)</sup>。しかし、この問題点も不織布固定化培養では培地中に遊離している菌体がほとんど存在しないため、培養液からの菌体分離操作は非常に簡略化されるであろう。そこで不織布固定化反復回分グルコース流加培養でのキシリトール生産性について実験を行った。ここでの培養時間は72時間、グルコース流加速度は3-3-2の実験結果より10g/dに設定した。経時変化のグラフをFig.3-6に示す。5回の反復培養後も不織布担体の目立った劣化は観察されな



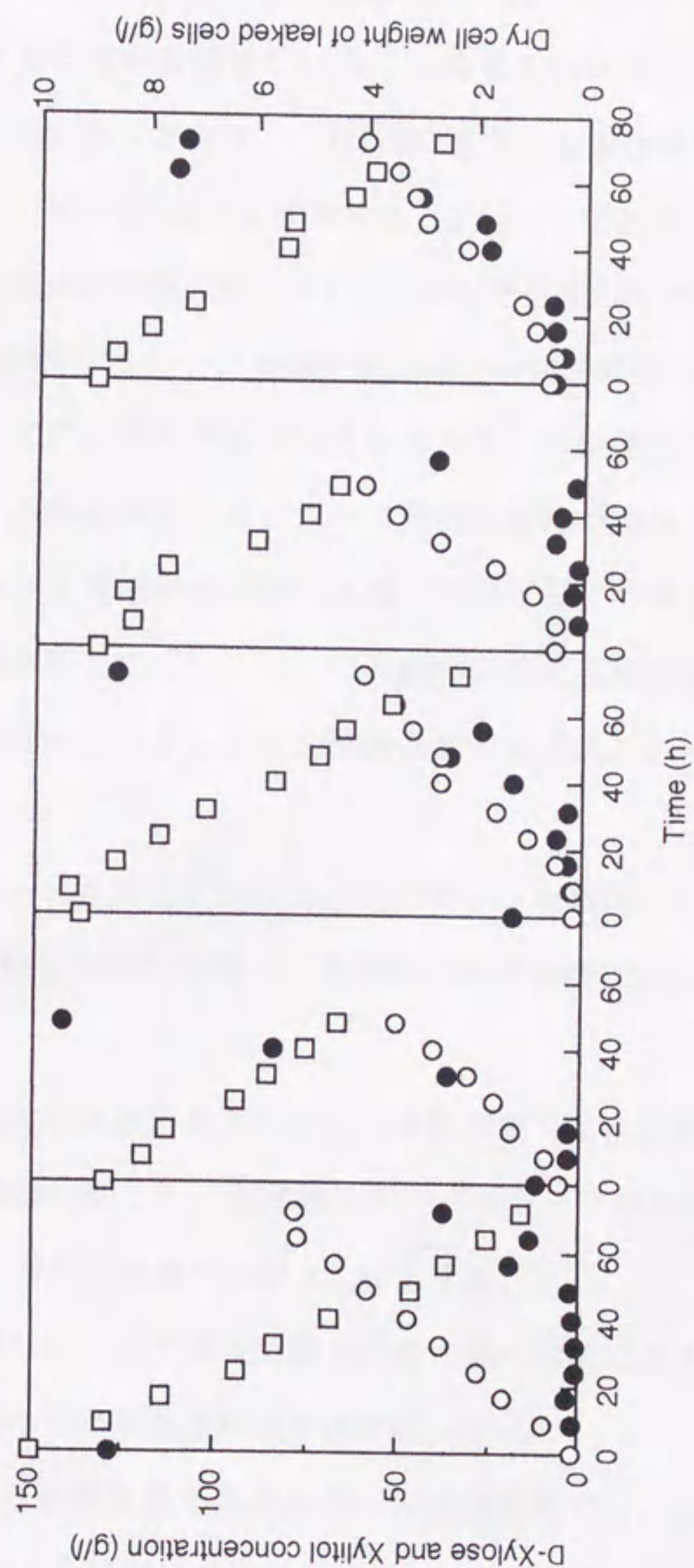


Fig. 3-6 Repeated D-glucose fed-batch cultivation for xylitol production by immobilized cells on nonwoven fabric.

The symbols indicate  $\square$  D-xylose,  $\circ$  xylitol,  $\bullet$  dry cell weight of leaked cells.



かった。しかし2回目の培養以降、培養中期より不織布担体から漏出した遊離菌体の増加が観察された。この理由としては2回目の培養からは初発菌体量が増加したことが考えられる。また、不織布担体内部で擬菌糸を形成して増殖した菌体により、3-3-2のグルコース流加速度が高い実験で得られた結果と同様リアクター系内が閉塞し、通気による培地の対流を妨げたことも考えられる。しかし全培養期間を通して遊離菌体量は9g/l以下であり、これは第2章での遊離菌体を用いたグルコース流加培養での培養終了時の37.1g/lと比較すると1/4以下である。キシロース消費速度、キシリトール生産速度は図の傾きより5回の培養を通して安定していた。このため不織布固定化反復回分グルコース流加培養の高い安定性が示された。

Table3-3にすでに報告されているキシリトール生産性と本研究で得られた生産性を比較する。不織布固定化グルコース流加培養法での生産速度、収率はともに高い値ではないが、反復培養が可能である、下流工程での菌体除去が容易である、という優れた特性を有していた。そこで不織布固定化反復回分グルコース流加培養の特性を評価するため、培養に必要な時間を計算で求めた。ただしここで以下の仮定を設ける。

- (1). キシリトール生産は1,000lの規模で行い、植種用のシードは100ml、2l、50lの順で3段階に分けて培養し、各段階の培養時間は実験の前培養と同じ24時間とする。
- (2). 不織布固定化反復回分グルコース流加培養では、実験結果をもとに72時間の培養で収率は0.60とし、遊離菌体でのグルコース流加培養では、第2章の結果をもとに32時間の培養で収率は0.82とする。
- (3). 全培養時間はシード調整時間も含めた延べ時間で考え、タンクの洗浄、殺菌や液の移送などの培養遅れ時間は考慮しない。

以上の条件から遊離菌体でのグルコース流加培養では、シード調整に必要な時間も含めた1回のバッチ操作にかかる時間は104時間となり、5回では520時間、10回では1040時間となる。これに対し不織布固定化グルコース流加反復培養では1回目で



Table 3-3 Xylitol productivity of this study and others.

Strain	Production rate (g/l·h)	Yield	Reference
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0.8	0.80	Izumori K. and Tsuzaki K. <sup>6)</sup>
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	1.04	0.81	Barbosa M.F.S. <i>et al.</i> <sup>25)</sup>
<i>C. tropicalis</i> HXP2	1.67	0.96	Gong C.H. <i>et al.</i> <sup>26)</sup>
<i>C. boidinii</i> No.2201	0.4	0.49	Vongsuvanlert V. <i>et al.</i> <sup>27)</sup>
<i>Candida</i> sp L-102	1.53	0.88	Lu J. <i>et al.</i> <sup>28)</sup>
<i>Candida</i> sp.	2.19	0.81	Cao N.J. <i>et al.</i> <sup>29)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.44	0.54	Watanabe N. <sup>30)</sup>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	2.71	0.64	Section 1 in this study <sup>31)</sup>
(by feeding D-glucose)	3.26	0.82	Section 2 in this study <sup>23)</sup>
(by immobilization on N.F.)	1.35	0.60	Section 3 in this study <sup>32)</sup>

N.F.: Nonwoven fabric



144時間、以後72時間づつ加算されるので5回の反復培養で432時間、10回では792時間となる。この計算結果を比較すると、2回目のバッチ操作までは遊離菌体を用いた流加培養の方が短時間であるが、3回目からは不織布固定化流加培養が短時間となり、5回で88時間、10回で248時間の差となる。この計算はシード調整を3段階として1,000lの規模での培養を想定しているが、さらに規模が大きくなるとシード調整に要する時間が長くなり、全培養期間に必要な時間の差は大きくなるであろう。またこの計算にはタンクの洗浄、殺菌や液の移送などの時間を考慮していないが、シード調整を入れて1回の生産のために4回の培養を行う遊離菌体を用いた培養では、この時間が大きなものとなる。さらに規模が大きくなると液の移送操作が必然的に多くなるので、コンタミネーションの危険性が高くなるであろう。

また収率からキシリトール生産量を算出すると、遊離菌体を用いた流加培養では1回の培養操作で123kgが生産され、ここから全培養期間における平均生産速度は1.18kg/hとなる。同様に不織布固定化流加培養では1回の培養操作で90kgが生産されるが、全培養期間における平均生産速度は1回目の培養で0.63kg/h、5回の反復培養で1.04kg/h、10回の反復培養で1.13kg/hとなり、さらに繰り返しが可能であるなら1.25kg/hに近づく。不織布固定化流加培養では繰り返し培養回数が少ない場合に平均生産速度は低くなるが、繰り返し培養回数を増す毎に遊離菌体を用いた培養と同様、もしくはそれ以上の生産性が得られる。このように不織布固定化流加培養では、反復培養が可能のため単位時間あたりの生産性についても良い結果が得られることが明らかとなった。

不織布固定化培養では下流工程での菌体除去操作においても効果を発揮するであろう。現実の発酵生産において、発酵生産物の単離と精製に占めるコストは、全製造コストのうち、低いもので20%、高いものでは60%を占めるとされている<sup>33)</sup>。この中で菌体除去操作が占める割合は不明であるが、生産物が可溶性で菌体外物質の場合、下流工程ではまず菌体を取り除くことから始める。菌体除去の方法は遠心分離もしくは濾過が一般的であるが、適当な界面活性剤を加えて通気する泡による分



離<sup>34)</sup>や、凝集剤による凝集沈降<sup>35)</sup>なども研究されている。不織布固定化培養では遊離菌体を用いた培養と比較して、培養終了時の培養液中に含まれる菌体量が1/4以下である。このため、一般的な濾過による菌体分離操作を考えた場合、下流工程の設計段階で濾過装置の規模が1/4以下に設定できる。もしくは同規模の濾過装置を用いる場合には、メンテナンスにかかる時間と費用が節約できるだろう。このため不織布固定化培養を用いた場合、下流工程でのコストが低減できると思われる。

### 3-4. 結論

キシリトール生産プロセスに固定化技術の導入を図り、以下の知見を得た。

- (1). ポリエステル製不織布を固定化担体として用いた場合、培養液への菌体漏出がなく、培養液中での菌体増殖がなかったことから不織布固定化担体の固定化能の高さが証明された。
- (2). 不織布固定化菌体においても、グルコースの流加によりキシリトール生産性の改善が見られ、グルコース流加のキシリトール生産での有効性が再確認された。
- (3). 不織布固定化菌体においてグルコース流加速度は、低い流加速度でキシリトール生産速度を向上可能で、流加速度が高いほど生産速度も高くなった。また5～20g/dの範囲でキシリトール収率に影響を与えなかった。
- (4). グルコース流加速度が15および20g/dの場合では菌体の増殖が著しく、リアクター系内が閉塞し酸素供給が不足したため、不織布固定化菌体が擬菌糸を形成した。
- (5). 不織布固定化反復回分グルコース流加培養でのキシリトール生産性について実験を行った結果、5回の反復培養後も不織布担体の目立った劣化は観察されず、安定した培養が可能であった。
- (6). 不織布固定化反復回分グルコース流加培養の経済性を評価するため、シード調整も含めた全培養工程に必要な時間を試算した結果、遊離菌体を用いた流加培



養と比較して全培養時間が短縮できることが示された。

- (7). 全培養期間における単位時間あたりのキシリトール生産性の試算では、不織布固定化流加培養の反復培養回数を増すことにより遊離菌体を用いた流加培養と同程度、もしくはそれ以上となることが判明した。
- (8). 培養終了時の培養液中に含まれる菌体量が1/4以下であるため、一般的な濾過による菌体分離操作を考えた場合、下流工程の設計段階で濾過装置の規模が1/4以下に設定できる。

以上より不織布固定化反復回分グルコース流加培養が、シード調整、下流工程でキシリトール生産コストを削減できることが示された。

#### 文献

- 1) Horitsu, H., Maseda, Y. and Kawai, K. (1990) A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 295-300
- 2) Horitsu, H., Wang, M.Y. and Kawai, K. (1991) A modified process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 269-271
- 3) Horitsu, H. (1993) A new approach that uses bioreactor with inorganic carriers (ceramic) in the production of fermented foods and beverages., *Ceramic transactions*, 31, 381-389
- 4) 中西弘一, 村山博, 佐藤広三, 長柄寛, 安井哲二, 三井俊介 (1989) 粒状セラミックスを用いた固定化酵母によるビール連続醸造., *発酵工学会誌*, 67, 509-514
- 5) 松浦一雄, 広常正人, 浜地正昭 (1989) 多段水平型バイオリアクターを用いた清酒の連続醸造., *発酵工学会誌*, 70, 17-23
- 6) Izumori, K. and Tuzaki K. (1988) Production of xylitol from D-xylulose by *Mycobacterium smegmatis*., *J. Ferment. Technol.*, 66, 33-36
- 7) Nishio, N., Sugawa, K., Hayase, N. and Nagai, S. (1989) Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU., *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 356-360
- 8) Roca, E., Meinander, N. and Hahnagerdal, B. (1996) Xylitol production by immobilized recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous packed-bed bioreactor., *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 317-326
- 9) 宮本武明, 本宮達也 (1992) 新繊維材料入門, pp.159-180, 日刊工業新聞社, 東京
- 10) 三浦義人 (1980) 総論, 三浦義人, 土林貞雄 (監修), 不織布産業の新展開, 初版, pp.1-2, シーエムシー, 東京



- 11) 三浦義人 (1980) 原料資材の展開, 三浦義人, 土林貞雄 (監修), 不織布産業の新展開, 初版, pp.3-70, シーエムシー, 東京
- 12) Sakurai, H., Lee, H.W., Sato, S., Mukataka, S. and Takahashi, J. (1989) Gluconic acid production at high concentrations by *Aspergillus niger* immobilized on a nonwoven fabric., J. Ferment. Bioeng., 67, 404-408
- 13) Kawabata, N., Hatanaka, H. and Odaka, H. (1995) Continuous production of L-aspartic acid from ammonium fumarate using immobilized cells by capture on the surface of nonwoven cloth coated with a pyridinium-type polymer., J. Ferment. Bioeng., 79, 317-322
- 14) Mitsuda, S., Matsuda, Y., Itagaki, Y., Suzuki, A., Kumazawa, E., Higashio, K. and Kawanishi, G. (1990) Non-woven fabrics as new cell matrices for IMR-90 human embryonic lung diploid fibroblast cells., J. Ferment. Bioeng., 70, 289-291
- 15) Petti, S.A., Lages, A.C. and Sussman, M.V. (1994) Three-dimensional mammalian cell growth on nonwoven polyester fabric disks., Biotechnol. Prog., 10, 548-550
- 16) Tokuda, H., Sato, S., Mukataka, S., and Takahashi, J. (1991) Immobilization of extracellular enzyme on non-woven fabrics by the gas phase cultivation method., J. Brew. Soc. Japan, 86, 689-694
- 17) Asakura, T., Kitaguchi, H., Demura, M., Sakai, H., Kaneko, M., Kurioka, A., and Komatsu, K. (1992) ESR analysis of spin-labeled glucose oxidase and spin-labeled silk fibroin coated on non-woven fabrics., J. Seric. Sci. Jpn., 60, 466-474
- 18) Demura, M., Takenoshita, H., Asakura, T., Sakai, H., Kurioka, A., Komatsu, K. and Kaneko, M. (1992) Enzyme-immobilization in non-woven fabrics by blend coating using silk sericin and silk fibron., J. Seric. Sci. Jpn., 61, 66-72
- 19) 後藤徳樹 (1992) 低温プラズマによる繊維・プラスチック製品の表面改質加工, 染色工業, 40, 476-490
- 20) Cheethan, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. (1979) Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels., Biotechnol. Bioeng., 21, 2155-2168
- 21) Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. and Chibata, I. (1976) Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells., Eur. J. Appl. Microbiol., 3, 169-183
- 22) Horitsu, H., Morisita, E., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T. and Maeda, M. (1992) A study of yeast adsorption on ceramic beads by zeta potential., Biosei. Biotech. Biochem., 56, 1501-1502
- 23) Yahashi, Y., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T. and Takamizawa, K. (1996) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding., J. Ferment. Bioeng., 81, 148-152
- 24) 西澤義矩 (1985) 培養技術., 田口久治, 永井史朗 編, 微生物培養工学, 初版, pp. 118-152, 共立出版, 東京



- 25) Barbosa, M.F.S., de Medeiros, M.B., de Mancilha, I.M., Schneider, H., and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*, J. Industrial Microbiol., 3, 241-251
- 26) Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2., Biotechnol. Letters, 3, 130-135
- 27) Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. (1988) L-identol production from L-sorbose by methanol yeast *Candida boidinii*, J. Ferment. Technol., 66, 517-523
- 28) Lu, J., Tsai, B., Gong, C.S. and Tsao, G.T. (1995) Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102., Biotechnol. Letters, 17, 167-170
- 29) Cao, N.J., Tang, R., Gong, C.S., and Chen, L.F. (1994) The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast., Appl. Biochem. Biotech., 45, 515-519
- 30) 渡辺則康 1990年度 岐阜大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士論文
- 31) Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki T., and Watanabe, N. (1992) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate., Biotechnol. Bioeng., 40, 1085-1091
- 32) Yahashi, Y., Hatsu, M., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T. and Takamizawa, K. (1996) D-glucose feeding for improvement of xylitol production from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a nonwoven fabric., Biotechnol. Letters, 18, In press
- 33) Stanbury, P.F. and Whitaker, A. (1988) 発酵生産物の単離と精製, 石崎文彬 (訳), 発酵工学の基礎, 初版, pp.191-216, 学会出版センター, 東京
- 34) Rubin, A.J., Cassel, E.A., Henderson, O., Johnson, J.D. and Lamb, J.C. (1966) Microfloculation: new low gas-flow rate foam separation technique for bacteria and algae., Biotechnol. Bioeng., 8, 135-151
- 35) Gasner, C.C. and Wang, D.I.C. (1970) Microbial recovery enhancement through flocculation., Biotechnol. Bioeng., 12, 873-887



## 終章

農産廃棄物の有効利用の一手法として工業化されることが期待され、またその機能性から消費が拡大するであろうキシリトール生産について、効率的、経済的に微生物によりキシリトールを生産するための基礎研究として、生産速度、収率の向上、および固定化技術の導入について研究を行った。

第1章では遊離菌体を用いた回分培養においてキシリトール生産速度の向上を目的に、初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ の3要因をBox-Wilson法で最適化した。それぞれの要因をコード化して実験を行った結果、以下に示す式を得た。

$$P = 0.1940A^2 - 0.0932B^2 - 0.1551C^2 - 0.0775AB + 0.1875AC + 0.1725BC \\ + 0.0702A + 0.0898B + 0.1288C + 2.4285$$

ここでPはキシリトール生産速度( $g/l \cdot h$ )、A、B、Cはそれぞれコード化した初発キシロース濃度、初発酵母エキス濃度、 $K_{La}$ を表している。

この結果より最適点は初発キシロース濃度172.0g/l、初発酵母エキス濃度21.0g/l、 $K_{La}$  451.5 $h^{-1}$ であり、このとき予測される生産速度は2.67 $g/l \cdot h$ となる。数回の最適点での回分培養の結果、最大キシリトール生産速度は平均で2.71 $g/l \cdot h$ であり、実験計画法で求められた予測値に極めて近い値となった。この結果からBox-Wilson法での最適化は、このような微生物反応の培養条件の決定において非常に有効であることが示された。

最適点での実験結果について、キシリトール生産のメカニズムと培養条件の最適化による結果とを併せて考察すると、回分反応でキシリトール生産速度を向上させるためには、培養の前半で十分な通気と栄養源で菌体濃度を速やかに増加させ、培養の後半でこの菌体の呼吸により溶存酸素濃度を減少させることが有効な手段であると考えられた。

第2章では農産廃棄物の加水分解物中に多く存在するグルコースを菌体増殖に用いることにより、キシリトール収率を高めることを目的として研究を行った。グル



コースの流加により菌体の増殖は活性化され、その結果としてキシリトール生産量と生産速度が増加した。フーマンターを用いた2l規模でのグルコース流加培養では、キシリトール濃度が培養32時間で104.5g/lに達し、3.26 g/l・hの生産速度が得られた。また菌体量は培養終了時で40.1g/lとなった。また収率については32時間の培養で297.4gのキシロースを消費し、242.7gのキシリトールを生産したのでキシリトール収率は0.82と計算された。

第3章ではバイオプロセス中のシードの調整工程と下流工程のプロセス中の菌体除去工程を簡略化することを目的として、不織布固定化法についてキシリトール生産での有効性を評価し、さらに生産性の改善を図った。その結果、不織布固定化菌体においても、グルコースの流加によりキシリトール生産性の改善が見られ、グルコース流加のキシリトール生産での有効性が再確認された。不織布固定化反復回分グルコース流加培養でのキシリトール生産性について実験を行った結果、5回の反復培養後も不織布担体の劣化は観察されず、安定した培養が可能であり、培養終了時の培養液中に含まれる菌体量は遊離菌体を用いた場合の1/4以下であった。

このように菌体の利用法として遊離菌体から固定化菌体へ、また培養方策としては回分、流加、反復流加とバイオプロセスの効率化を考えた流れで研究を進めた。ここで培養方策の1つとして重要な位置を占める連続培養については、本論中ではふれなかった。しかし用いた微生物の増殖速度が高いため、連続化が有効であると考え連続培養の実験も行ったが、遊離菌体での連続培養では培養開始120時間程度で菌糸を形成し、流動が悪化して安定した培養が得られなかった。また固定化菌体の連続培養では菌体の増殖に伴い、系が閉塞して継続が不可能であった。

不織布固定化担体を用いた流加培養法は遊離菌体による流加培養法に比べてキシリトール生産速度、収率ともに低下するが、培養液中に菌体の漏出がほとんどないという極めて魅力的な特徴を有していることが判明した。さらに反復培養を安定して行えるという工業的に有利な長所も合わせ持っている。そこで不織布固定化反復



回分グルコース流加培養システムを遊離菌体を用いたグルコース流加培養法と比較評価するため、1,000lの規模でキシリトール生産を行った場合のシード調整から本培養終了までに必要な全培養時間を試算した。その結果、3回以上の反復培養を行うことで、遊離菌体を用いた流加培養法と比較して全培養時間が短縮できることが示された。また全培養期間における単位時間当たりのキシリトール生産性においても、不織布固定化流加培養の反復回数を増すことにより遊離菌体を用いた流加培養と同程度、もしくはそれ以上の生産性となることが判明した。

このように不織布固定化担体を用いたグルコース流加反復培養法が、キシリトール生産に適していることが判明した。しかし実際に工業化するためには、安全性が保証される菌体の開発や、安価な原料の供給などが重要な問題となる。*Candida tropicalis*は序章でも述べたように、病原性は微弱ではあるもののカンジダ症原因菌の一つに挙げられるが、この問題は遺伝子工学的な手法で解決されるであろう。最も重要な問題は安価な原料の供給源だと考えられる。今後、リグノセルロースの効率的な加水分解方法が開発されることを期待する。



## 謝辞

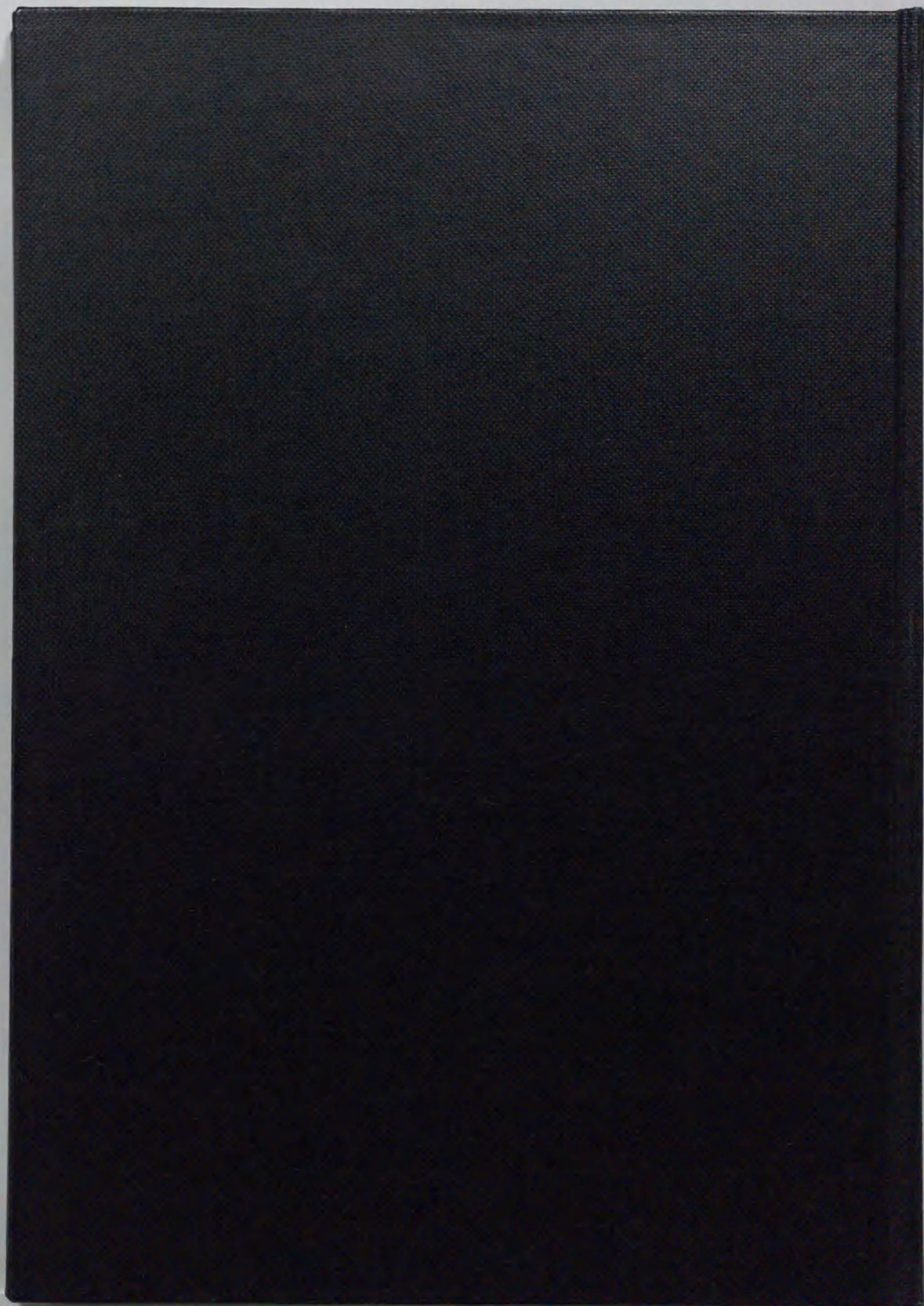
本研究を行うにあたり、終始かわらぬご指導を賜りました岐阜大学教授 高見澤一裕先生、中村征夫先生、静岡大学教授 岡部満康先生、並びに中京女子大学教授（岐阜大学名誉教授）堀津浩章先生に心より御礼申し上げます。

本論文の作成及び審査におきまして、適切なご指導を賜りました信州大学教授 寄藤高光先生、岐阜大学教授 河合啓一先生、岐阜大学助教授 発正浩先生に心から感謝いたします。また研究を進めるにあたりご助言を賜りました岐阜大学助教授 鈴木徹先生に深く感謝いたします。

本論文作成の機会を与えて下さいました名古屋コンテナ株式会社 社長 古賀和夫氏、常務 古賀正明氏、並びに御支援を賜りました環境事業部の皆様に厚く御礼申し上げます。また日常生活におきまして大変お世話になりました名古屋コンテナ株式会社の皆様に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり御協力いただきました小川美也津氏、内田昭二氏、有賀しのぶ氏、ならびに岐阜大学農学部生物資源利用学科生物機能工学講座微生物工学研究室の皆様に心から感謝いたします。また研究生活を送るにあたり、物心ともに支えてくれた家族と常にそばで励まし続けてくれた妻 尚子に感謝します。







# Biotechnology Letters

*The premier journal for rapid publication  
in all aspects of biotechnology*

Editor

Colin Ratledge

Professor of Microbial Biochemistry

Department of Biological Sciences, University of Hull, Hull, HU6 7RX, UK

Telephone (0)1482 - 465243; fax (0)1482 - 465458; e.mail c.ratledge@biosci.hull.ac.uk

CR/EJS

28 October 1996

Dr K. Takamizawa  
Department of Biotechnology  
Faculty of Agriculture  
Gifu University  
Yanagido 1-1  
Gifu 501-11  
JAPAN

Dear Dr Takamizawa

BL 337

I am delighted to inform you that your paper is now accepted for publication. It will appear in this Journal, Volume 18, No. 12 (December 1996).

## OFFPRINTS

These are to be ordered from the Publishers using the enclosed Offprints Order Form which must be returned, preferably by fax to ITP Journals in London (Fax No. +44 (0) 171-410-6930) within 24 hours of receipt of this letter. Orders received after printing has begun cannot be accepted. Do not delay in returning your Order Form. Do NOT return to me.

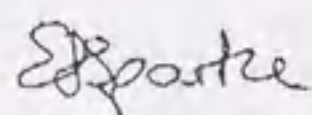
## PUBLISHING AGREEMENT

Copyright, which is for your protection of papers appearing in the Journal, is vested in the Publishers. Please complete and return the enclosed form to Ms Andrea Müller at the Journals Department of Chapman & Hall in London, (see form for address).

Thank you for considering BIOTECHNOLOGY LETTERS for publication of your paper. We hope that you find this a satisfactory means of communicating your work to interested readers. If your library does not yet take this Journal, we would be pleased to send your librarian a complementary copy. Please send your request to Ms A. Müller at the Publishers. We look forward to being of future service to you.

With kind regards

Yours sincerely



Colin Ratledge  
Editor - Biotechnology Letters



