キシロオリゴ糖の製造と性質†

藤川茂昭*, 岡崎昌子*, 松元信也*, 古賀邦正**

Properties and Production of Xylooligosaccharide

Shigeaki FUJIKAWA,* Masako OKAZAKI,* Nobuya MATSUMOTO*
and Kunimasa KOGA*** *Suntory Limited, Institute for Fundamental Research*
(1-1-1, Wakayama-dai, Shimamoto-cho, Osaka 618, Japan)** *Department of R & D Planning and Administration, Suntory Limited*
(Mori Bldg. No. 31, 5-7-2, Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan)

Properties and production of xylooligosaccharide with a bioreactor were studied. Substrate (xylan) was packed in a reactor. And buffer with an amount of enzyme was passed through the reactor. Enzyme absorbed to xylan hydrolyzed xylan to form xylooligosaccharide. Xylooligosaccharide was eluted earlier than the enzyme from the reactor. The amount of enzyme to form xylooligosaccharide with this reactor was less than that with a batch reactor.

Sweetness of xylobiose (main component of xylooligosaccharides) was 30% that of sucrose. Xylobiose solution showed lower water activity than sucrose and maltose solution. The amount of non-freezing water of xylobiose solution was larger than that of sucrose and maltose. Administration of xylooligosaccharide promoted the growth of bifidobacteria in human intestine, lowered fecal pH, and helped to maintain the fecal water content at an optimal 80 %.

近年、保湿性、抗う蝕性、ビフィズス菌選択増殖活性など、さまざまな機能を有する糖が明らかになり、その機能を見出し利用していく研究開発が行われている。また、食生活の変化もその一因であろうが、食物繊維の効用が最近注目されるようになってきた。植物の構成多糖であるセルロース、ヘミセルロースは古くから食されてきた食物繊維である。キシロオリゴ糖はヘミセルロースの主要成分であるキシランから得られるキシロースが β -1,4 結合した糖である。

大豆から抽出して得られる大豆オリゴ糖以外の多くのオリゴ糖は、澱粉糖や砂糖、乳糖を原料にして酵素による糖の転移反応や合成反応を利用して生成されるのに対して、キシロオリゴ糖は、加水分解で得られるオリゴ糖である。ただ、これまで工業レベルで安価に製造するこ

とが技術的に難しく、大量に工業的には製造されていないため、その評価も多くはなされていない^{1,2)}。

本稿では、酵素分解によりキシロビオースを主成分とするキシロオリゴ糖を効率的に製造する方法および、生成したキシロオリゴ糖の性質を述べる。

1. キシロオリゴ糖の製造

1) キシロビオース生成酵素の検索

図1には検索した酵素のなかから代表的なものを示した。Aspergillus 由来の酵素はキシロースの生成収率は高いがキシロビオース生成収率が少ない。また、Humicola, B. pumilus 由来の酵素はキシロースの生成は抑えているが、キシロビオース生成収率が若干劣っている。一方、Trichoderma 由来の酵素はキシロビオース生成収率が高く、キシロース生成も抑えていることから、本酵素をキシロビオース生成酵素として選抜した^{3,4)}。

本酵素のエタノール分画を行った結果、エタノール濃度 30~50%沈澱画分にキシロースの副生を抑え、純度の高いキシロビオースを生成することができる酵素を得る

† "Proceedings of the Amylase Symposium, 1989"

* サントリー(株)基礎研究所 (618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1)

** サントリー(株)研究企画部 (102 東京都千代田区麹町 5-7-2 第31 森ビル)

図 1. キシロビオース生成酵素の評価

ことができた。本キシロビオース生成酵素を、ゲル濾過、CM セファロース分画を行い、電気泳動的に単一の酵素を得た。そしてゲル濾過により分子量は12,000と推定された⁵⁾。

2) バッチ反応でのキシロオリゴ糖生成

エタノール沈澱で調整して得たキシロビオース生成酵素を用い、原料にパーチウッドからアルカリ抽出したキシランを用い、キシラン濃度5%, pH 4.5, 55°C で攪拌を行い、生成するキシロビオースを経時的に分析した結果を図2に示した。その結果、反応2時間でキシランの約90%が分解し、キシロビオースを主成分とするキシロオリゴ糖を生成することができた。

酵素分解物を、活性炭で脱色し、脱塩、濃縮することによって、キシロビオースを主成分とするキシロオリゴ糖シロップを得た。

このキシロオリゴ糖シロップからイオン交換カラムクロマト、結晶化によりキシロビオースを単離した⁶⁾。

図 2. キシロビオース生成の経時変化 (回分式)

反応条件：基質，5%キシラン；酵素，600 U/g キシラン；反応温度，55°C；pH 4.5。

本稿ではキシロビオースを主成分とするミクスチャーをキシロオリゴ糖と称する。このキシロオリゴ糖中のキシロビオース以上の重合度の糖の含有率は70%である。

3) バイオリクター化と基質

製造コストの低減，とりわけ酵素の回収利用を図るため，バイオリクターを用いたキシロオリゴ糖の製造の検討を行った。

原料を高濃度のアルカリで溶解抽出した後，中和して不溶化し固液分離することにより水に不溶のキシランが得られる。一方，原料を高圧で煮沸することにより，キシランが適度に分解され可溶性キシランとして抽出され，これを脱色し，水溶性キシランを得ることもできる。

水溶性キシランを基質に用いたキシロオリゴ糖の製造のバイオリクター化には，一般的な固定化酵素を用いたバイオリクターの検討がなされている⁷⁾。しかし，水に不溶のキシランを用いたバイオリクター化には基質が不溶物であるため，一般的な固定化酵素法は用いることができない。そこでわれわれは，基質を充填しネイティブの酵素を基質に流す，基質充填型リアクターの検討を行った⁸⁾。

4) キシロオリゴ糖生成酵素の性質

キシロビオース生成速度に与える基質濃度とキシロビオース濃度の関係を Lineweaver-Burk プロットで求めた結果を図3に示した。基質キシラン濃度は0.2~1.0%，キシロビオース濃度は0~0.5%で，40°C，30分反応を行い，キシロビオースの生成速度を HPLC で求めた。その結果，本酵素は生成物であるキシロビオースによって，きつ抗的に阻害を受けることが明らかになった。このことは，キシロビオース生成速度をあげるには，生成するキシロビオースをすみやかに系外に抜出すことが効

図 3. X2 の X2 生成活性に及ぼす影響

図 4. 酵素 TX のキシランへの吸着

基礎濃度, 5%; 酵素濃度, 0.44%; 反応温度, 40°C; pH 4.5.

果的であることを示している。

図 4 に, 本酵素によるキシランの加水分解におけるキシランの分解率と, 反応液上澄みに遊離する酵素活性の経時変化を示した。

酵素は, キシランと混合後, いったんキシランに吸着した後, キシランの分解とともに上澄み側に遊離した。

そしてこの吸着酵素の比率は約 85~90%であった。このような酵素, 基質の親和性を利用した酵素の再利用型キシロビオース生産により酵素量の低減化が図れると考え、酵素を担体に固定化せず、遊離の形で用いたキシロビオースの連続生産を試みることにした。

5) 基質充填型バイオリアクター

図 5 に実験に用いた装置の概略を示した。バーチカルからアルカリ抽出により得たキシランとセライトとを混合したものをこのカラムに充填し, カラム全体を 40°C に保ちながら, その上部に酵素を一定量負荷し 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を下降流で通液した。流出液はフラクションコレクターで分取し, 糖組成, 酵素活性の測定を行った。

図 6 にカラムからのキシロビオース, キシロースおよび酵素活性の溶出パターンを示した。酵素活性は, 糖の溶出がほぼ終了してから溶出してくることがわかった。この結果, 酵素は基質にいったん吸着し, 生成する糖より遅れてカラムから溶出することが確認されたため, 遅れて出てくる酵素を次のカラムに導入することにより,

図 5. 基質充填型カラムリアクターの装置

図 6. キシランセライト充填カラムリアクターによる X2 の生成

図 7. リアクターの多段化とキシラン分解

酵素の再利用が図れると考え、多段層の基質充填カラムを想定して実験を行った。

キシラン 6.25 g とセライトとを等量混合し、それを充填したカラムを 1 段で使用し酵素 2500 unit を付加し、酢酸緩衝液を流し、40℃ で加水分解を行った。同様に同じ酵素量 2500 unit に対し、カラムの段数、すなわちキシラン量を 2, 4, 8 倍と増加させた条件での実験を行った。

図 7 に多段化したリアクターの結果をまとめた。基質が増す、すなわち段数が増すに従い、酵素活性の回収率は低下し 4 段目から溶出してくる酵素活性はわずか 4 % であった。キシラン分解率は 4 段までは、ほぼ 90% を維持したが、8 段では 70% 程度に低下した。4 段以上では酵素活性が大きく減少するため、それ以上の段数ではキシラン分解率が低下したものと考えた。したがって酵素効率、4 段までは段数の増加とほぼ比例して向上するが、8 段ではこの向上の傾きは鈍ってくる。溶出酵素活性の低下は、カラム内での酵素活性の失活のためであることが別実験で確認されている。すなわち、この条件ではキシランの高い分解率を保つには 4 段が適当であると判断した。

カラムリアクターの場合糖化液はカラムから濾過されて清澄液として溶出するため、濾過工程を省略できるメリットも併せてもっている。

図 9. 各種糖溶液の水分活性値

図 8. キシロビオースの甘味度

2. キシロオリゴ糖の性質

1) キシロビオースの甘味度

図 8 にキシロビオースの甘味度をシュクロースを 100 として比較した結果を示した。キシロビオースの甘味度はシュクロースの 30% と低く、同じ 2 糖のマルトースよりも低いことがわかった。また、キシロビオースはさわやかで上品な甘みを呈していた⁶⁾。

2) キシロビオース溶液の水分活性と不凍水量

図 9 に水分活性の結果を示した。各糖とも添加量を多くすると水分活性値が低下する。キシロビオースはキシロースには劣るものの、グルコースとほぼ同様の効果を示している。さらに同じ 2 糖のシュクロース、マルトースよりも優れていることがわかった。

図 10 に不凍水量の結果を示した。不凍水量は、熱量計を用いて測定し、含有水量のなかの -10℃ 以下の不凍水量の割合を表した。糖の添加量が増加すると不凍水量も増加する。キシロビオースはキシロースとはほぼ同じ不凍水量を示すが、高濃度ではグルコースよりも不凍水量が多くなっている、さらに同じ 2 糖のシュクロース、マルトースと比較すると非常に多くの不凍水量が得られることが明らかになった。

3) キシロビオースの安定性

図 11 にキシロビオース溶液を、pH 2~8, 20℃ で 20

表 1. 腸内細菌によるキシロオリゴ糖の資化性 (*in vitro*)

Bacteria	n	X0	X1	X2	X3	Gl
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	9	≡	++	≡	≡	≡
<i>bifidum</i>	5	±	±	—	—	≡
<i>infantis</i>	1	≡	nt	nt	nt	≡
<i>longum</i>	5	++	≡	++	±	≡
<i>breve</i>	2	±	±	—	—	≡
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	±	±	—	—	≡
<i>casei</i>	2	±	±	—	—	≡
<i>fermentum</i>	2	—	—	—	—	++
<i>gasseri</i>	1	+	±	±	±	≡
<i>salivarius</i>	2	±	±	±	±	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	±	±	±	±	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	2	—	—	—	—	≡
<i>lentum</i>	1	—	—	—	—	—
<i>limosum</i>	2	—	±	—	—	++
<i>nitritogenes</i>	1	—	—	—	—	++
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1	—	—	—	—	—
<i>acnes</i>	1	—	—	—	—	++
<i>Bacteroides fragilis</i>	3	±	+	±	—	++
<i>vulgatus</i>	5	+	+	±	±	++
<i>bivius</i>	1	±	±	±	±	++
<i>intermedius</i>	1	±	±	±	—	++
<i>ovatus</i>	2	+	+	+	+	++
<i>otrs</i>	7	+	+	±	±	++
<i>Clostridium perfringens</i>	5	—	—	—	—	±
<i>paraputrificum</i>	3	—	—	—	—	++
<i>difficile</i>	4	—	—	—	—	±
<i>butyricum</i>	4	±	+	±	—	++
<i>others</i>	15	—	—	—	—	++
<i>Fusobacterium</i>	5	—	—	—	—	±
<i>Escherichia coli</i>	5	—	±	—	—	+
<i>Staphylococcus</i>	3	—	—	—	—	++
<i>Peptostreptococcus productus</i>	1	++	++	++	++	++
<i>others</i>	4	—	—	—	—	—
<i>Veillonella parvula</i>	2	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	±	±	±	±	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	—	±	—	—	≡
<i>Mitsuokella multiacidus</i>	2	+	++	+	±	≡
<i>Enterobacter</i>	2	±	±	±	±	±
<i>Megamonas hypermegas</i>	1	+	++	±	—	++
<i>Morganella morganii</i>	1	—	—	—	—	+

Judgement of bacterial growth : pH 6.0 ≤ — X0 : Xylo-oligo mix

5.5-5.9 ± X1 : Xylose

5.0-5.4 + X2 : Xylobiose

4.5-4.9 ++ X3 : Xylotriose

4.4 ≥ ≡ Gl : Glucose

nt : not tested.

図 10. 各種糖溶液の不凍水量

図 11. キシロビオースの安定性

日間、37℃ で 24 時間、100℃ で 60 分それぞれ処理した後のキシロビオースの残存を見た結果を示した。20℃ で 20 日間、37℃ で 24 時間の条件下ではキシロビオースの分解はまったく認められず、100℃ で 60 分の条件下においても、pH 8 で若干の減少は認められるものの、pH 7 以下では非常に安定であることが明らかになった。

4) 腸内細菌の増殖活性 (*in vitro*)

キシロオリゴ糖およびこの構成糖であるキシロース、キシロビオース、キシロトリオースそして比較としてのグルコースをそれぞれ 0.5% 添加した YPF 培地に、各種腸内細菌を接種し、嫌気条件下で 37℃、96 時間培養し、培養後の pH を測定し、資化性の判定を行った。

表 1 に示すように腸内細菌は、キシロース、キシロビオース、キシロトリオースと高分子化するに従い、資化しにくくなる傾向が認められた。しかしビフィズス菌のなかでも、*B. adolescentis* は 2 糖、3 糖のキシロビオース、キシロトリオースを積極的に資化することが認められた。またキシロビオースを主成分とするキシロオリゴ糖は、*B. bifidum*、*B. breve* 以外のビフィズス菌によく利用された。また、キシロオリゴ糖は腸内の最優勢菌であるバクテロイデス菌にもある程度資化されるが、その程度はビフィズス菌のそれよりも弱いことがわかった。また *E. coli* や有害菌であるクロストリディウム菌はグ

ルコースを資化するが、キシロオリゴ糖を資化しなかった。

以上の結果から、キシロオリゴ糖は、ビフィズス菌選択利用性の高い糖であることが明らかになった⁹⁾。

5) 腸内細菌の増殖活性 (*in vivo*)

次に、ヒトがキシロオリゴ糖を食べた場合、ヒトの腸内フローラに及ぼす影響について調べた。年齢 50~60 歳の健康な男子 9 名を被験者として、キシロオリゴ糖を 1 日 5g (キシロビオース以上の重合度の糖 3.5g) を 3 週間にわたって摂取した。試験中全期間にわたって、生菌製剤、納豆の非摂取以外についての食事制限は行わなかった。そして摂取 2 週間前と摂取直前の 2 回、摂取開始 1 週間目、2 週間目、3 週間目の 3 回、摂取中止 6 週間後に 1 回の計 6 回排便を行い、光岡らの方法に準拠して便のフローラ、pH、水分、揮発性脂肪酸の測定を行った。

表 2 に、9 名の腸内フローラの各種菌数の平均値を示した。キシロオリゴ糖摂取前、ビフィズス菌の数は健康な成人を対象としたため平均 $10^{9.7}$ であった。それがキシロオリゴ糖の摂取によって摂取中は $10^{10.1}$ へと危険率 1% で有意に増加した。一方、腐敗発酵菌とみなされる、バクテロイデス、クロストリディウム菌は摂取による増加は認められなかった。

表 2. キシロオリゴ糖摂取と腸内細菌数の変化

Organisms	摂取前 (n=18)	摂取中 (n=27)	摂取後 (n=9)
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.42±1.32(100)	7.14±1.39(100)	6.98±1.34(100)
<i>Streptococcus</i>	7.68±1.13(100)	7.09±1.12(100)	8.11±1.29(100)
<i>Staphylococcus</i>	2.98±0.57(56)	2.76±0.27(26)	2.70±0.57(22)
<i>Yeasts</i>	4.05±1.03(72)	4.14±1.30(74)	4.19±1.48(78)
<i>Pseudomonas</i>	2.72±0.57(33)	2.65±0.49(7)	4.34 (10)
<i>Corynebacterium</i>	3.20±0.90(17)	2.88±0.52(19)	2.75±0.92(22)
<i>Bacillus</i>	7.08 (6)	6.57±1.97(17)	4.05±1.34(22)
<i>Lactobacillus</i>	7.04±1.17(100)	6.91±1.21(100)	7.25±1.60(89)
<i>Bifidobacterium</i>	9.71±0.44(100)	10.11±0.39(100)**	10.12±0.48(100)
<i>Eubacterium</i>	10.02±0.42(100)	10.02±0.45(100)	9.98±0.55(100)
<i>Bacteroidaceae</i>	10.27±0.51(100)	10.14±0.61(100)	10.58±0.29(100)
<i>B. fragilis</i> group	9.82±0.54(100)	9.56±0.83(100)	10.06±0.45(100)
<i>Megamonas hypermegas</i>	8.73±0.45(56)	8.81±0.50(56)	9.05±0.71(67)
<i>Peptostreptococcus</i>	9.21±0.87(94)	9.20±0.82(93)	9.60±1.17(100)
<i>Clostridium perfringens</i>	4.52±1.77(33)	4.58±0.92(44)	3.87±0.96(67)
<i>Clostridium</i> -other	9.38±0.50(100)	9.44±0.64(100)	9.81±0.43(100)
<i>Veillonella</i>	6.87±1.70(89)	6.19±1.74(89)	6.96±1.65(89)
<i>Megasphaera</i>	5.35±3.18(11)	8.55±0.26(22)**	7.25±2.33(22)
Total	10.69±0.36(100)	10.71±0.43(100)	10.96±0.33(100)

細菌数の平均値±標準偏差/便 1 g (保菌者の割合).

図 12. キシロオリゴ糖摂取と腸内細菌の割合の変化

図 12 にキシロオリゴ糖摂取による腸内細菌の割合の変化を 9 名の平均値で示した。ビフィズス菌はキシロオリゴ糖摂取前が 12~17%であったのに対し、摂取により 24~32%へと有意に増加した。また摂取中止後、ビフィズス菌の占有率は 5%の危険率で有意に減少し、摂取前

とは有意差がなくなった。ビフィズス菌の割合の変化を個人別に見た結果、被験者全員がキシロオリゴ糖を摂取することにより、ビフィズス菌の占有率を増加させた。バクテロイデス菌の割合は 9 名中 7 名が低下した。

このように、キシロオリゴ糖摂取により、平均的に見

図 13. キシロオリゴ糖摂取と便の水分の変化

でも、個人的に見てもビフィズス菌の占有率は増加し、バクテロイデスの占有率が下がり、ビフィズス菌が優勢の菌叢になることがわかった⁹⁾。

また、キシロオリゴ糖の摂取によるこれらの効果は、1日わずか1gの摂取でも認められている¹⁰⁾。

6) キシロオリゴ糖摂取による便の水分、pH の変化

図 13 に被験者 9 名の便の水分の平均値と標準偏差を示した。摂取前には 66~90% のバラツキのある水分が、キシロオリゴ糖を摂取することによって良好な水分含量であるといわれる 80% 程度に収斂する傾向が認められた。平均値は全期間にわたって 79% 前後を維持したが、標準偏差は摂取前が約 10% であったのが、摂取すると 7.5, 4% と経時的に減少した。そして、摂取を止めることにより摂取前の状態にもどる傾向を示した。このようにキシロオリゴ糖の摂取により便の水分が 80% に収斂する傾向は、便の固い人、軟らかい人ともに丁度よい固さになっていくことを示している⁹⁾。

被験者 9 名の便の pH 平均値は、キシロオリゴ糖摂取前 6.15~6.30 であったのに対し、摂取期間中は 5.95~6.08 となり、摂取により pH の低下が認められた⁹⁾。

7) キシロビオースの消化酵素による分解

人工唾液、人工胃液、人工すい液、ブタ小腸刷子縁ホモジネート液に各種糖を 1% 濃度に加え、37°C で 4 時間反応させたときの残存率を図 14 に示した。マルトースは唾液、すい液、小腸刷子縁ホモジネート液によって分解されるのに対し、キシロオリゴ糖は各消化酵素にはまったく分解されなかった。それに対し、フラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖は胃液で分解され、イソマルトースは小腸刷子縁ホモジネート液で分解されている。キシロオリゴ糖は摂取した後、消化酵素で分解されず、低 pH の

図 14. 消化酵素によるキシロビオースの分解

胃酸にも分解されることがなく、吸収されないまま大腸に達し、ビフィズス菌の増殖促進物質として有効に利用されることが示唆された。このことが、少量の摂取でも十分なビフィズス増殖物質として働く理由と考えた。

なお、本研究の一部は農水バイオリアクター研究組合のもとで新日本化学工業(株)、日立造船(株)と共同で行った。

文 献

- 1) I. KUSAKABE, T. YASUI and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1355-1362 (1975).
- 2) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **51**, 439-448 (1977).
- 3) 小西哲哉, 岩崎紀佳, 入江利夫, 古賀邦正, 仲田俊之: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 297, 名古屋 (1988).
- 4) 田子山保典, 小西哲哉, 岩崎紀佳, 入江利夫, 古賀邦正, 仲田俊之: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 643, 東京 (1987).
- 5) 小西哲哉, 田子山保典, 小木曾昇, 入江利夫, 古賀邦正, 仲田俊之: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 644, 東京 (1987).
- 6) 岡崎昌子, 藤川茂昭, 宮島啓爾, 古賀邦正, 入江利夫, 仲田俊之: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 765, 東京 (1987).
- 7) 山口高俊, 志摩宣行, 種村公平, 仲田俊之, 古賀邦正, 入江利夫: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 193, 名古屋 (1988).
- 8) 岡崎昌子, 藤川茂昭, 田中隆治, 吉栖 肇, 入江利夫, 仲田俊之: 発酵工学会大会要旨集, p. 27, 大阪 (1988).
- 9) M. OKAZAKI, S. FUJIKAWA and N. MATSUMOTO: *Bifidobacteria Microflora*, 投稿中.
- 10) 岡崎昌子: 栄食誌, 投稿中.

【質問】

福山大工 山本

リアクターからでてくるキシロビオースの濃度はどれ

くらいでしょうか？ 高い濃度でキシロビオースを得るリアクターによる反応条件について検討されておられると思いますが、差し支えなければお教えてください。

【答】

キシロビオース濃度は2～3％程度です。高濃度化は製造のコストダウンのために必要な検討課題だと考えます。リアクターでの生成物の高濃度化と同時に、生成物の膜濃縮を用いた高濃度化の検討を行っています。

【質問】

東洋紡 古川

1) 糖はイオンのなチャージをもたないのにイオン交換クロマトに吸着させるのはなぜか？ またどのようなリガンドを用いているのか。

2) キシロビオースの不凍性や水分活性低下性を利用して機能性高分子の凍結保存の分散媒としての可能性はあるか。

【答】

1) 理由の詳しいことはわかりませんが、糖の分離には古くからイオン交換樹脂が用いられています。腸イオン交換樹脂のスルホン基がアフィニティクロマトのリガンドに相当すると考えます。

2) 可能性はあると考えます。今後検討したいと思います。

(平成2年2月2日受付)