

9 糖脂質を生産する酵母の探索

玉井正弘, 三好省三*, 田村幸吉*, 太田雅也**, 松浦史登**

Selection of glycolipid production yeast

TAMAI Masahiro, MIYOSHI Shouzou, TAMURA Yukiyoishi, OHTA Masaya and MATUURA Fumito

Yeast that produced a large amount of glycolipids or new structural glycolipids was selected from yeast that was able to assimilate the soybean oil. 440 strains of the separation yeast 782 strains used for the examination produced glycolipids of 0.1g/L or more. Culture that used a jar-fermentor about 105 strains was done, and 14 strains produced glycolipids of 30g/L or more with the soybean oil of 80g. The TM238 strain with the highest production produced glycolipids of 59g (Yield: 74%) by the culture of seven days. Moreover, the mannose and the erythritol were detected from 407 strains (92%) of 440 strains and the ratio of the mannose and the erythritol was greatly different however. Yeast that produced glycolipids thought to be a new structure was found from the mobility different on the thin layer chromatography or content of Mannitol as the composition sugar of the glycolipid..

キーワード：酵母, バイオサーファクタント, 糖脂質, マンノシルエリスリトールリピッド

1 緒 言

バイオサーファクタント^{1)~3)}と呼ばれる微生物などが生産するさまざまな界面活性物質が単離・同定されている。これらのバイオサーファクタントは、合成では作りにくい多様な構造, 生分解性, 生理活性を有することから注目されている。なかでも, 酵母が生産する糖脂質型バイオサーファクタントは, 現在までに *Torulopsis bombicola* が生産するソホロリピッド⁴⁾, *Candida antarctica*, *Candida sp. SY16*, *Schizonella melanogramma* らが生産するマンノシルエリスリトールリピッド^{5)~8)}などが報告されている。これらは菌体外に大量に分泌されることから, 食品・医薬品・化粧品・環境分野などでの実用化が期待されている。

本研究では, 全国より採取した試料(植物の葉, 花, 果実, 樹液, 水など)から分離した酵母のうち, 糖脂質を多量に生産する酵母あるいは新規な構造の糖脂質を生産している可能性の高い酵母を探索したので以下に報告する。

2 実験方法

2.1 供試菌株

広島県産業科学技術研究所において自然界から分離された782株の油脂資化性酵母を用いた。

2.2 培地組成

酵母エキス 1 g/L, NH₄NO₃ 0.5g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, MgSO₄ · 7 H₂O 0.5g/L にグルコースあるいは大豆油を加えて121℃で15または30分間殺菌した。

2.3 培養

2.3.1 試験管培養

グルコース濃度を6%とした培地4 mL にスラントに保存した菌株を1白金耳接種し, 30℃, 120rpm で2日間培養した。

2.3.2 坂口フラスコ培養

大豆油濃度を4%とした培地100mL に試験管培養を行った培養液を接種し, 30℃, 120rpm で7日間培養した。ジャーファメンター培養の前培養に使用する場合は, グルコース濃度を6%とした培地100mL に試験管培養を行った培養液を接種し, 30℃, 120rpm で2日間培養した。

2.3.3 ジャーファメンター培養

大豆油濃度を8%とした1.4L の培地を入れた2.5L 容(培養実容量1.5L)ジャーファメンターに坂口フラスコで培養した培養液を接種し, 30℃, 800rpm, 通気量1.5L/min で7日間培養した。

2.4 糖脂質の抽出

培養液50mL (坂口フラスコ) 及び1L (ジャーファメンター) をとり, 等量の酢酸エチルで2回抽出を行い, 酢酸エチル層を合わせて溶媒を留去した。炭素源である大豆油が多く残留している場合は, 抽出物をメタノール25mL (坂口フラスコ) 及び500mL (ジャーファメンター) に溶解し, 倍量のヘキサンで2回洗浄

*丸善製薬株式会社, **福山大学 生命工学部

して大豆油の大部分を取り除いた後、メタノール層を溶媒留去して、糖脂質を含む抽出物を得た。

2.5 分画

ジャーファメンター培養から得られた抽出物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。粗抽出物1gを少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲル(ワコーゲル C-200, 和光純薬株)のカラム上にチャージした。クロロホルム500mL, クロロホルム:酢酸エチル=4:1 500mL, アセトン500mL, メタノール500mLを順次流し、アセトン画分に溶出する複合脂質を得た。

2.6 分析試料の調整

糖脂質を含む抽出物をスクリーキャップ付き試験管に取り、2N HCl10mLを加えて100℃, 2時間反応させた。放冷後、等量のヘキサンで脂肪酸を除去した。水層を Amberlite IRA-400で脱塩し、HPLC 試料とした。

糖脂質を含む抽出物及びアセトン画分500 μ gをスクリーキャップ付き試験管に取り、4N TFA500 μ g加えて100℃, 4時間反応させた。窒素気流下で乾固させた後、アルジトール・アセテート法で単糖をアセチル化し、ガスクロマトグラフィー用試料とした。

2.7 分析

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Silica Gel 60 F254 Plates (No.5715 Merck 社製)を用いた。展開溶媒は、クロロホルム:メタノール:水=65:15:2とした。検出は、展開後のプレートにアンスロン試薬を吹きつけ、110℃で10分間加熱した。

糖脂質の分析は、イアトロスキャン TH-10 (株ヤトロン製)を用いた。クロマトロッドに酢酸エチル抽出液を1~5 μ gチャージし、ベンゼン:クロロホルム:酢酸=50:20:0.7の溶媒で30分間展開した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、糖分析システム(日本分光株製)を用いた。カラムは、Shodex SUGER KS-801 (昭和電工株製)を用い、カラム温度80℃で蒸留水を1mL/minの流速で流した。

ガスクロマトグラフィー (GC) は、ガスクロマトグラフ263-30 (日立製作所株製)を用いた。Gaschrom Q (3%ECNSS-M)をガラスカラムに充填し、カラム温度180℃, インジェクション温度220℃で行った。

3 実験結果と考察

3.1 糖脂質生産酵母の分類

スラントに保存した分離菌の782株を試験管培養した。その結果、7株が増殖しなかった。増殖した775株は、培養終了後、酢酸エチルで抽出し、イアトロスキャンを用いて糖脂質濃度を測定した。糖脂質濃度が

0.1g/L以下であった335株を糖脂質非生産株とした。糖脂質濃度が0.1g/L以上の440株を糖脂質生産株とし、高速液体クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いて糖を分析した。分析結果より、分離菌440株を表1のように分類した。

表1 糖脂質生産菌株の分類

	菌株数	大量培養数
I. マンノースとエリスリトールを共に検出	407	97
Mannose/Erythritol		
1. ~0.75		
1) 他の糖を検出しない	1	1
2) Mannitol/Mannose=0.5以上	1	1
3) 他の糖を検出	8	7
2. 0.75~1.5		
1) 他の糖を検出しない	269	20
2) Mannitol/Mannose=0.5以上	29	14
3) 他の糖を検出	16	14
3. 1.5~2.5		
1) 他の糖を検出しない	51	8
2) Mannitol/Mannose=0.5以上	19	11
3) 他の糖を検出	5	5
4. 2.5~		
1) 他の糖を検出しない	0	
2) Mannitol/Mannose=0.5以上	8	8
3) 他の糖を検出	0	
II. ManoseとErythritolを共に検出しない	33	8
Mannitolを検出		
1) Mannitolのみ	25	8
2) 他の糖を検出	8	0
計	440	105

440株のうち、407株(92%)からマンノース及びエリスリトールが検出された。マンノースとエリスリトールのモル比(Mannose/Erythritol)は、0.2から3まで大きく異なっていたが、4段階に分類した。さらに、その他の糖の有無により3種類に分類した。このうち最も数が多かったのは、Mannose/Erythritolが0.75~1.5かつ他の糖が検出されないものであった。また、マンニトールが検出されたものが34株あった。

マンノースとエリスリトールが共に検出されないものが33株あり、マンニトールのみが検出されたものが25株と多かった。

3.2 各分類毎の大量培養

糖脂質を生産している可能性のある菌株のうち糖脂質生産量の多いもの、新規糖脂質の可能性のある105株について、ジャーファメンターによる大量培養を行った。以下に表1の分類毎の結果を示した。

I. マンノースとエリスリトールを共に検出

1. Mannose/Erythritol=0.75以下

表2 他の糖を検出しない

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	727	葉	4.0	0.79	0.78	0.57	

表3 Mannitol/Mannose=0.5以上

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	677	葉	1.7	0.98	0.73		

表4 他の糖を検出

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Ma/Ery	TLCでのRf			
1	371	葉	0.8	0.80	0.73	0.52	
2	697	葉	5.2	0.68	0.69	0.49	
3	548	葉	6.2	0.91	0.70	0.51	
4	679	葉	6.6	1.07	0.70	0.54	0.49
5	767	葉	9.7	0.96	0.80	0.60	
6	773	実	0.7	1.44	0.75	0.52	
7	680	葉	3.2	1.31	0.72	0.44	

2. Mannose/Erythritol=0.75 - 1.5

表5 他の糖を検出しない

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	510	葉	32.7	0.99	0.68		
2	10	葉	52.8	1.00	0.68		
3	110	キノコ	36.4	0.96	0.68		
4	240	泥	51.0	1.01	0.67		
5	544	葉	48.0	0.96	0.67		
6	239	泥	37.7	0.83	0.68		
7	136	木の实	36.1	0.93	0.68		
8	238	泥	58.5	0.97	0.68		
9	117	葉	38.4	0.96	0.68		
10	181	葉	47.7	0.92	0.65		
11	560	葉	39.2	0.89	0.68		
12	1	花	0.9	0.97	0.68		
13	9	葉	0.2	0.86	0.66		
14	11	葉	1.3	0.91	0.66		
15	15	松ヤニ	1.7	1.00	0.65		
16	108	キノコ	31.2	0.97	0.65		
17	109	キノコ	27.6	1.04	0.59		
18	121	草	38.4	0.92	0.65		
19	123	葉	11.6	0.95	0.65		
20	135	木の实	6.3	1.12	0.65		

表6 Mannitol/Mannose=0.5以上

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	153	葉	2.1	1.17	0.70	0.51	0.47
2	287	樹液	1.3	1.01	0.58	0.55	
3	701	葉	1.8	1.27	0.52	0.49	
4	734	葉	2.7	1.67	0.58	0.55	0.51
5	765	葉	2.6	1.31	0.44	0.27	
6	772	葉	8.0	1.00	0.48	0.45	
7	7	野草	2.5	0.87	0.81	0.63	
8	8	野草	3.2	0.77	0.66	0.45	
9	12	松の枝	7.7	1.19	0.48		
10	26	茎, 葉	4.7	1.26	0.79	0.61	
11	28	枯れ木	4.7	0.98	0.67	0.50	0.47
12	127	葉	12.4	0.82	0.72	0.53	
13	132	花	5.0	0.75	0.72	0.53	0.49
14	137	木の实	3.6	0.90	0.75	0.56	0.50

表7 他の糖を検出

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	246	草花	0.5				
2	247	草花	1.9	0.52	0.61	0.56	0.52
3	248	草花	0.4	0.73	0.56	0.53	
4	249	葉	2.0	0.60	0.56	0.53	
5	506	葉	5.0	0.92	0.79	0.62	
6	694	葉	2.4	0.97	0.79	0.61	
7	797	葉	1.8	0.86	0.81	0.62	
8	4	花	3.6	1.04	0.63	0.55	0.48
9	5	野草	5.9	0.84	0.83	0.65	
10	22	葉	3.6	0.84	0.81	0.63	
11	24	茎, 葉	1.4	1.03	0.80	0.57	
12	75	土	5.7	0.84	0.72	0.55	
13	107	樹液	2.5	不検出	0.68		
14	125	木の实	8.2	0.85	0.79	0.61	

3. Mannose/Erythritol=1.5 - 2.5

表8 他の糖を検出しない

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	90	木の实	14.9	0.63	0.68		
2	217	木の实	5.9	1.36	0.79	0.60	0.55
3	357	葉	51.0	0.89	0.58	0.55	0.37
4	427	草	1.8	0.78	0.94	0.72	0.54
5	557	葉	3.7	0.92	0.76	0.58	0.52
6	619	葉	3.3	1.10	0.95	0.67	0.55

表9 Mannitol/Mannose=0.5以上

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	155	実花	0.6	不検出			
2	255	葉	5.5	0.88	0.61	0.57	
3	267	葉	1.9	1.13	0.73	0.58	0.55
4	288	葉	3.5	1.25	0.75	0.56	0.51
5	289	葉	2.7	1.16	0.72	0.52	0.46
6	521	葉	0.4	1.29	0.79	0.57	
7	539	葉	0.3	1.09	0.79	0.57	
8	647	葉	13.2	0.79	0.55		
9	731	葉	4.7	0.81	0.69	0.51	
10	764	葉	1.4	0.94	0.74	0.58	0.55
11	2	花	2.5	2.23	0.56	0.51	

表10 他の糖を検出

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	241	花	0.5	0.67			
2	266	葉	1.5	1.62	0.74	0.58	0.56
3	605	葉	0.3	2.19	0.76	0.54	
4	689	葉	4.1	1.28	0.69	0.46	
5	30	葉	1.7	1.21	0.67	0.50	0.47

4. Mannose/Erythritol=2.5以上

表11 Mannitol/Mannose=0.5以上

菌株番号	分離源	GL (g/L)	Mannose/Erythritol	TLCでのRf			
1	453	葉	3.1	1.47	0.62	0.60	0.58
2	517	葉	5.9	0.95	0.71	0.52	0.47
3	580	葉	2.8	0.99	0.71	0.53	0.49
4	585	葉	2.9	0.87	0.69	0.50	0.47
5	606	葉	2.3	2.24	0.59	0.55	
6	652	葉	2.0	0.95	0.71	0.53	0.48
7	663	葉	13.8	0.80	0.71	0.53	
8	810	葉	7.5	0.84	0.69	0.51	

II Mannose と Erythritol を共に検出しない

表12 Mannitol のみ

菌株番号	分離源	GL (g/L)	糖の種類	TLC での Rf			
1	45	樹液	2.8	Mannitol			
2	204	花	0.2	Mannitol			
3	210	葉	0.7	Mannitol			
4	340	葉	0.8	Mannitol	0.83	0.76	0.71 0.49
5	444	葉	1.2	Mannitol			
6	586	葉	0.8	Mannitol	0.71	0.43	
7	101	樹液		Mannitol			
8	104	椿花		Mannitol			

表13 他の糖を検出

菌株番号	分離源	GL (g/L)	糖の種類	TLC での Rf			
1	118	キノコ	1.9	?	0.75 ~0.2		
2	821	樹液	0.4	?			
3	47	汚泥	0.1	不検出			
4	837	樹液	1.6	?			
5	419	葉	0.2	?			
6	603	葉	0.9	?	0.97	0.90	0.67 0.50
7	675	葉	10.1	?	0.79	0.61	
8	844	葉	0.3	不検出			

糖脂質の生産量の高い菌株は、Mannose/Erythritol が0.75~1.5で他の糖が検出されない表5のグループに多かった。14株(表5:13株, 表8:1株)が80gの大豆油から30g/L以上の糖脂質を生産した。最も生産量の高い菌株番号238は、7日間で80gの大豆油から59g(原料収率:74%)の糖脂質を生産した。表5の菌株ではTLC上でRf値が0.68付近のスポットが1つのみ得られ、アセトン画分でのMannose/Erythritolもほぼ1であることより同じ糖脂質と考えられる。菌株番号10の生産する糖脂質の構造解析を行った結果、既存の糖脂質であるマンノースの1位にエリスリトール、2と3位に脂肪酸、6位にアセチル基を持つマンノシルエリスリトールリピッド⁹⁾(MEL B:アセチル基の結合数及び位置により、この他A, C, Dが報告されている)であった。菌株番号357は、生産量も高く、3つのスポットを持っていることより、新規構造の糖脂質を効率よく生産できる可能性がある。これらの糖脂質の高生産株は、培地組成、培養条件の最適化により生産量、生産速度をさらに向上できると考えている。

MEL BのTLC上でのRf値は、0.68付近であり、この値より高いRf値を有するものから、低い値を有するものまで幅広く存在していた。また、MELではMannose/Erythritolが1となるが、1以上の菌株が相当数見出された。表3, 6, 9のように構成糖として

マンニトールを含んだ糖脂質、表4, 7, 10のように各種の糖を構成糖とする糖脂質を生産している可能性がある。この他、表11と12のように、マンニトールを主たる構成糖とする糖脂質と思われるものも見出された。

これらの菌株は、新規の糖脂質の可能性があり、現在、構造を解析している。

4 結 言

糖脂質を多量に生産する酵母あるいは新規な構造の糖脂質を生産している可能性の高い酵母を探索した。

- (1) 分離菌の782株のうち440株が0.1g/L以上の糖脂質を生産した。
- (2) 440株のうち407株(92%)からマンノース及びエリスリトールが検出されたが、マンノースとエリスリトールの比(Mannose/Erythritol)は、大きく異なった。
- (3) 80gの大豆油から59gの糖脂質を生産する高生産株を見出した。
- (4) 新規な構造と考えられる糖脂質を生産する酵母を見出した。

文 献

- 1) 井上恵雄: BIO INDUSTRY, Vol. 2, No. 8, (1985), 605
- 2) 石上 裕: FREGRANCE JOURNAL, (1995), 73
- 3) 北本 大: オレオサイエンス, 第1巻, 第1号 (2001), 17
- 4) P. A. J. Golin, J. F. T. Spencer and A. P. Tulloch: Can. J. Chem., **39** (1961), 846
- 5) T. Nakahara, H. Kawasaki, T. Sugisawa, Y. Takamori, and T. Tabuchi: J. Ferment. Technol., **61**, (1983), 19
- 6) D. Kitamoto, K. Akiba, C. Hiroki and T. Tabuchi: Agric. Biol. Chem., **54** (1990), 31
- 7) H.-S. Kim, B.-D. Yoon, D.-H. Choung, H.-M. Oh, T. Katsuragi and Y. Tani: Appl Microbiol Biotechnol, **52** (1999), 713
- 8) G. Deml, T. Anke, F. Oberwinkler, B. M. Ginnetti, W. Stelich: Phytochemistry, **19** (1980) 83
- 9) K. Kakugawa, M. Tamai, K. Imamura, K. Miyamoto, S. Miyoshi, Y. Morignaga, O. Suzuki and T. Miyakawa: Boisci. Biotechnol. Biochem., **66** (2002), 188