

学位論文題名

ダイフラクトースアンハイドライド類の製造と 性質に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文は、和文 67 頁、図 11、表 13、5 章からなり、参考論文 10 編が付されている。

ダイフラクトースアンハイドライドは、2 個のフルクトースの還元末端が互いに他のフルクトースの還元末端以外の水酸基に結合した環状二糖（オリゴ糖）であり、一般に DFA と略称されている。数種類存在する DFA の中で、DFA III および DFA IV はカルシウムやその他のミネラルの吸収を促進することが知られている。DFA III および DFA IV を大量に製造する方法は報告されていないため、酵素を用いた大量生産方法の開発を目指して、原料である多糖類の調製から最終産物である DFA III および DFA IV を分離・精製するまでの一連の工程の効率化・最適化を検討した。また、DFA III および DFA IV の物理化学的性質等についても調査した。

1) 酵素による粗イヌリンからの DFA III の工業的生産

Arthrobacter sp. H65-7 株由来のフルクトシルトランスフェラーゼの一種である inulin fructotransferase (depolymerizing) (以後「IFTase」と略す) を用いて、チコリー根部から抽出した粗イヌリン (β -2,1 結合型のフルクタン) から DFA III を工業的に生産する方法を検討した。イヌリンを貯蔵多糖としてその根部に含むチコリーを北海道十勝地方にある試験農場で栽培して、定期的にチコリー根部の重量、イヌリン含量およびイヌリン平均分子量等を調査した。その結果、イヌリンの収量および平均分子量が最大になる 9 月下旬から 10 月上旬が、最適なチコリー収穫時期であると判断した。チコリー根部 1.8 トンを収穫・裁断して温水抽出し、その抽出液をビート糖工場で用いられるライミング・カーボネーション法により処理して粗イヌリン 153 kg を含む精製液 (carbonation juice、CJ) を得ることに成功した。*Arthrobacter* sp. H65-7 株由来 DFA III 合成酵素である IFTase は、イヌリンによって誘導されるが、本酵素は CJ によっても問題なく誘導されることを確認した。この結果から、CJ は酵素生産培地のイヌリン源として適していると判断した。イヌリン 15 kg を含む CJ に IFTase を添加し反応させると、DFA III 9.8 kg が生成した。反応終了後、酵母発酵およびイオン交換樹脂により反応液中の DFA III 以外の糖および塩類を除去した。その後結晶化を行って、純度 99.7% の高純度 DFA III 結晶 3.1 kg を製造することに成功した。イヌリンの重合度と DFA III 反応収率の相関についても調査した結果、イヌリンの重合度と反応収率の間には明確な正の相関を認めた。重合度が高くなるほど反応収率は高くなり、DFA III 収率決定における重合度の重要性が高いことを明らかにした。

2) DFA III の物理化学的性質および生理作用

チコリー由来のイヌリンより製造した高純度 DFA III の加工食品における有用性を評価するため、その物理化学的性質および生理作用を調査した。DFA III の水への溶解度は、スクロースの 90~95% であり、高い溶解性を示した。また、DFA III の吸湿性はスクロースよりも低く、低 pH における DFA III の分解性およびメイラード反応性は、スクロースおよびラフィノースよりもかなり低いことが明らかとなった。DFA III は *in vitro* において *Streptococcus mutans* 6715 株および MT8148 株に資化されず、低う蝕性であることが示唆された。また DFA III は *in vitro* においてラット消化酵素によって分解されず、ラット小腸を用いた反転腸管サック法においても吸収は認められなかった。これらの結果から、DFA III は他の多くのオリゴ糖と同様に非消化性・非吸収性のオリゴ糖であることが明らかとなった。一方、DFA III を摂取したラットの盲腸では、短鎖脂肪酸の増大と菌叢の変化が認められたが、ビフィズス菌の増加は認められなかった。1 日に DFA III 5 g を 2 週間摂取したヒトでは、糞便菌叢の変化は認められなかった。

3) 微生物培養により調製されたレバンから酵素による DFA IV へのワンポット変換

Serratia levanicum NN 株を用いてスクロースからレバン (β -2,6 結合型のフルクタン) を調製し、そのレバンから *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 株由来 *levan fructotransferase* (以後「LFTase」と略す) を用いて DFA IV に変換するまでを、効率的に、かつワンポットで行う方法を検討した。*S. levanicum* NN 株をスクロース 30 kg を含むレバン生産培地で培養し、培養開始 10 時間後の培養液 (レバン濃度、39 g/L) を、pH 5.5 に調整し、4°C に冷却して 7 日間攪拌すると、レバン濃度を 50 g/L まで上昇させられることを明らかにした。*A. nicotinovorans* GS-9 株由来の LFTase 生産量を向上させるため、新たな形質転換体 *Escherichia coli*/pLFT-SA7 を作製した。本形質転換体の LFTase 活性は 105.1 U/mL (培養液当たり) であり、元株および従来型形質転換体 *E. coli*/pLFT-BB1 の酵素活性のそれぞれ 32 倍、6 倍であった。レバン 7.5 kg を含む培養液に LFTase を添加し、反応させると DFA IV 6.8 kg が生成した。反応終了後、酵母発酵およびイオン交換樹脂により反応液を精製した。酵母発酵は、DFA IV 以外の糖を除去するだけでなく、*S. levanicum* NN 株の細胞を除去することにも効果があることを確認した。また、イオン交換樹脂処理によって、塩類が除去されるだけでなく、クロマト効果による DFA IV 純度の大きな向上が認められた。結晶化によって、純度 99.9% の高純度 DFA IV 結晶 3.5 kg を調製することに成功した。DFA IV の物理化学的性質および生理作用を調査した結果、DFA IV が 2 水和物の結晶構造を有することが示唆されること、酸性条件下での安定性がスクロースやラフィノースと同等であること、ビフィズス菌に資化されないことを明らかにした。

以上、原料である多糖類の調製も含め、酵素を用いて高純度の DFA III および DFA IV を効率的に大量調製することに成功した。また、高純度 DFA III および DFA IV を大量に調製できたことによって、これまでほとんど報告のなかった DFA III および DFA IV の物理化学的性質、生理作用についても明らかにした。なお、DFA III は市販の精製イヌリンを原料として 2004 年から工業生産することに成功しており、カルシウムやその他ミネラルの吸収を促進する健康食品素材として利用されている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 木 村 淳 夫

学 位 論 文 題 名

ダイフラクトースアンハイドライド類の製造と 性質に関する研究

本論文は、和文 67 頁、図 11、表 13、5 章からなり、参考論文 10 編が付されている。

ダイフラクトースアンハイドライドは、2 個のフルクトースの還元末端が互いに他のフルクトースの還元末端以外の水酸基に結合した環状二糖（オリゴ糖）であり、一般に DFA と略称されている。数種類存在する DFA の中で、DFA III および DFA IV はカルシウムやその他のミネラルの吸収を促進することが知られている。DFA III および DFA IV を大量に製造する方法は報告されていないため、酵素を用いた大量生産方法の開発を目指して、原料である多糖類の調製から最終産物である DFA III および DFA IV を分離・精製するまでの一連の工程の効率化・最適化を検討した。また、DFA III および DFA IV の物理化学的性質等についても調査した。

1) 酵素による粗イヌリンからの DFA III の工業的生産

Arthrobacter sp. H65-7 株由来の inulin fructotransferase (depolymerizing) (以後「IFTase」と略す) を用いて、チコリー根部から抽出した粗イヌリンから DFA III を工業的に生産する方法を検討した。チコリー収穫期間におけるチコリー根部の重量、イヌリン含量、イヌリン平均分子量等の変化を調査した結果、イヌリン収量と平均分子量が最大になる 9 月下旬から 10 月上旬が、最適なチコリー収穫時期であることを示した。チコリー根部を収穫・裁断して温水抽出し、その抽出液をライミング・カーボネーション法により処理して粗イヌリンを含む精製液を得た。本精製液に IFTase を添加し反応させた後、酵母発酵とイオン交換樹脂により反応液中の DFA III 以外の糖および塩類を除去し、その後結晶化を行って、高純度 DFA III 結晶 3.1 kg を製造することに成功した。イヌリン重合度と DFA III 変換収率の間に明確な正の相関を認め、DFA III 収率決定において重合度の重要性が高いことも明らかにした。

2) DFA III の物理化学的性質および生理作用

低 pH における DFA III の分解性およびメイラード反応性は、スクロースよりも低く、DFA III が安定なオリゴ糖であることを示した。DFA III は *in vitro* において *Streptococcus mutans*

に資化されず、低う蝕性であることが示唆された。また DFA III は *in vitro* においてラット消化酵素によって分解されず、ラット小腸を用いた反転腸管サック法においても吸収が認められなかったことによって、DFA III は非消化性・非吸収性のオリゴ糖であることを示した。一方、DFA III を摂取したラットの盲腸では、短鎖脂肪酸の増大と菌叢の変化が認められたが、ビフィズス菌の増加は認められなかった。DFA III を摂取したヒトでは、糞便菌叢の変化は認められなかった。

3) 微生物培養により調製されたレバンから酵素による DFA IV へのワンポット変換

Serratia levanicum NN 株を用いてスクロースからレバンを調製し、そのレバンから *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 株由来 *levan fructotransferase* (以後「LFTase」と略す) を用いて DFA IV に変換するまでを、ワンポットで行う方法を検討した。*S. levanicum* NN 株をスクロースを含むレバン生産培地で培養し、培養開始 10 時間後の培養液(レバン濃度、39 g/L) を、pH 5.5 に調整し、4℃に冷却して 7 日間攪拌すると、レバン濃度を 50 g/L まで上昇させられることを明らかにした。*A. nicotinovorans* GS-9 株由来の LFTase 生産量を向上させるために作製した形質転換体 *Escherichia coli*/pLFT-SA7 の LFTase 活性は 105.1 U/mL (培養液当たり) であり、元株および従来型形質転換体の酵素活性より高かった。レバンを含む培養液に LFTase を添加し反応させた後、酵母発酵およびイオン交換樹脂により反応液を精製した。イオン交換樹脂処理によって塩類が除去され、さらにクロマト効果による DFA IV 純度の大きな向上が認められた。結晶化によって、高純度 DFA IV 結晶 3.5 kg を調製することに成功した。DFA IV の酸性条件下での安定性がスクロースと同等であること、ビフィズス菌に資化されないことを明らかにした。

以上、原料である多糖類の調製も含め、酵素を用いて高純度の DFA III および DFA IV を効率的に大量調製することに成功した。また、高純度 DFA III および DFA IV を大量に調製できたことによって、これまでほとんど報告のなかった DFA III および DFA IV の物理化学的性質、生理作用についても明らかにした。なお、DFA III は市販の精製イヌリンを原料として 2004 年から工業生産することに成功しており、カルシウムやその他ミネラルの吸収を促進する健康食品素材として利用されている。以上の成果は、オリゴ糖の生産方法の理解に役立つだけでなく、研究成果が実用化に結びついた事例として価値を有するものである。

よって審査員一同は、菊地裕人氏が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。