

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780093

研究課題名（和文） エルシノ多糖の生産法と物理化学特性に関する研究

研究課題名（英文） Production and Solution Properties of Elsino-Polysaccharides

研究代表者

高橋 亮 (TAKAHASHI RHEO)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30375563

研究成果の概要：*Elsinoe* 属菌体をPotato Extract培地またはCZAPEK' S SOLUTION培地で培養するとエルシノ多糖が大量に生産された。その収量は、炭素源をスクロースとしたときが最も多く、液体培地1リットルあたり6.0gのエルシナンが得られた。培地条件を適宜変更することにより、得られるエルシノ多糖のモル質量は $10^3 \sim 10^7$ g/molまで任意に設定可変であった。さらにモル質量の分布もある程度制御可能なことがわかった。生産されたエルシナンの物理化学特性を検討するため、専用の計測機器の製作を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	360,000	2,960,000

研究分野：農学。

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学。

キーワード：増粘多糖類， α -グルカン，エルシナン，溶液物性，示差屈折率，培養，モル質量（分子量），フィールドフローフラクシオネーション。

1. 研究開始当初の背景

近代食品工業の有史以来、食品多糖は増粘安定剤として広く用いられてきた。さらに、ごく最近の研究によって多糖の乳化性や分散性、あるいは生理機能に注目が集まると、食品多糖市場のニーズは飛躍的に増加し巨大なマーケットに成長した。現在さまざまな多糖が食品添加物として利用されているが、この用途での利用が公的に認可されているものは世界的に見ても100種類に満たない。個々の食品多糖が持つ機能特性の違いは、お

もに多糖の1次構造の違いを反映しているもので、認可未検討あるいは今後自然界から新たに単離される膨大な種類の多糖を利用すれば広範な機能の発掘が期待できる。

エルシノ多糖生産菌の培養法は、1980年後に*Elsinoe leucospila*について行なわれ、同時に生成多糖の基礎特性も調べられた。しかし、希薄溶液物性、応用物性、多糖生産菌の大規模生産法など、この多糖の実用化に必要な多くのデータが不足している。

2. 研究の目的

新規多糖の単離と特性解析には多くの時間と労力を要するため、実用化を志向した多糖の研究開発はほとんど成功していない。この問題を解決するためには、効率的な多糖の生産法の開発、および多糖の1次構造と分子形態・物性・機能に関係づけるための知識の蓄積が必要である。本研究は *Elsinoe* 属の菌体が生産するエルシノ多糖に注目し、この未利用多糖を可食性資源として実用化するための基盤を構築するとともに、多糖の1次構造が諸物性に与える影響を検討するためのガイドラインを作製することを目的とする。

Elsinoe leucospila が生産するエルシノ多糖「エルシナン」の1次構造は、黒酵母が生産する・グルカンで、その溶液・固体物性が詳細に検討されたプルランと酷似し、唯一の構造の違いは・(1→6)結合の・(1→3)結合への置換のみに見られる。しかし、結晶状態における両者の分子形態は、プルランが典型的な屈曲性鎖であるのに対し、エルシナンは規則的ならせん構造をとることが知られている。結晶状態の分子形態は溶液中における分子形状と密接な関係があり、したがってマルト(エルシノ)トリオースの結合様式の違いは両者の諸物性の違いを生み出す。さらに、シトラスやブドウの葉に着床する *Elsinoe* 属の菌体は・(1→3)結合間の・(1→4)グルコース数が3-6までのエルシノ多糖を生産する可能性が指摘されており、エルシノオリゴ鎖長と分子形態の関係も興味深い。

3. 研究の方法

食品多糖を効果的に利用するためには、その多糖溶液の性質と、これを特徴づける多糖の分子間相互作用と分子形態、すなわち剛直性、らせん性、分子サイズなどを評価する必要がある。広いモル質量(分子量)範囲にわたって作製された極めてモル質量分布が単分散な複数の多糖画分についての精緻特性解析、MDシミュレーション、およびナノ〜マクロレオロジー解析を行えば、溶液中におけるエルシノ多糖の分子形態を可視化し、1次構造との関係を調べることができる。その後、実際の利用に予想される条件の下で材料試験を行えば、エルシノ多糖を有効に利用するためのデータを蓄積され、得られる成果は例えば咀嚼・嚥下困難食のレオロジー制御を容易になる。これらの中で最も困難な過程は単分散多糖の作成とナノ物性の評価であり、ほとんどの多糖で十分なデータが取得されていない。

本研究では、連続式培養・分別・精製モジュールを作成し、未利用多糖の短期的な実用化を図った。このモジュールは卓上サイズでありながら kL クラスの発酵槽と同等以上の多糖生産能を有し、同時に多糖の精製を行な

うものである。

多糖の精密特性解析に関しては、多角度光散乱検出器(MALS)つきサイズ排除クロマトグラフ(SEC)による分析法をほぼ確立している。また、SECモードでの分画が困難なモル質量が 10^6 g/mol以上の成分については流動場クロマトグラフ(FFF)チャンネルを開発すればSECの代替法として利用可能である。さらに、高エネルギー加速器研究機構内のシンクロトン放射光を光源とする小角X線散乱(SAXS)を利用すればMALS分析が困難な比較的分子量成分の分子形態解析も問題なく行なうことができる。

4. 研究成果

*Elsinoe*属菌は、2001年に山口県萩市でナツダイダイの表皮から採取されたもののほか4種を用いた。本研究では、植菌されたポテトショ糖寒天(PSA)培地を直径1cmの円形状に培地ごと打ち抜いたディスクをクライオチューブに入れ、 -80°C で保存してあったものを復元して用いた。復元液の組成は、ペプトン 5g、酵母エキス 3g、硫酸マグネシウム 7水和物($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1g、限外ろ過水 1Lとした。pHの調整は行なわなかった。解凍したディスクをシャーレとともに滅菌した復元液中に移し、 25°C で1週間培養した。これを市販のポテトグルコース寒天(PDA)シャーレ培地に植菌し、再び 25°C で1週間培養した。生育したコロニーをPSAスラントに植菌し、 4°C で保存した。この菌を種菌として継代培養を行なった。なお本研究での植菌に係わる無菌操作は粒子カットサイズ $0.15 \cdot \mu\text{m}$ のUltra Low Penetration Air Filter (ULPA) フィルターによる濾過通気型の無菌箱中で行なった。無菌箱の中は、植菌操作の10分以上前に70vol%エタノールを噴霧した。滅菌用の70vol%エタノールには、必要に応じて塩化ベンザルコニウムを0.5w/v%溶かして用いた。本培養の際には、 28°C のPDA培地上で培養して生育したコロニーの2白金耳を100mLのCZAPEK'S SOLUTION (CDL)培地で1週間培養し、この第1シード5mLを95mLのPOTATO EXTRACT (PE)培地、CDL、または改良型CZAPEK DOX (MCDL)培地に接種して1週間培養した第2シードを用いた。エルシノ多糖を生産させるための培養では培養には硫酸または水酸化ナトリウムでpHを1.5-7.0の間で任意に調整したPE培地、CDL培地、あるいはMCDL培地を用いた。

本培養を7日間行なった培養液を $10,000 \times \text{g}$ で20分間、 4°C で遠心し、不溶性成分と水溶性成分を含む液体培地を分離した。不溶性成分を水→10mMリン酸緩衝液で洗浄して菌体を回収した後、 -30°C で凍結保存またはPDA培地上に植菌して 4°C で冷蔵保存した。

水溶性成分を含む培地は、ポアサイズ

0.8・m ポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過して残存する不溶性成分を除去した後、沈殿法またはサイズ排除クロマトグラフィーでプルランを含むモル質量が大きな画分と塩類およびオリゴ糖を含むモル質量が小さな画分に分画した。

沈殿法では、分離効率を高めるためにまず等量のイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H⁺) と Amberlite IR-400 (OH⁻) をベッド体積 250mL の Bio-Rad エコノカラムに充填したカラムに連続通液して脱イオンした後、液量が元の培地の約 50% となるまでロータリーエバポレーターを用いて 40°C で濃縮した後、沈殿操作を行なった。濃縮液の沈殿剤として 4 倍量のメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、またはアセトンを用いて容器の壁面を伝わせながらゆっくり添加した。このとき、溶液はスターラーで激しく攪拌した。液温が室温と同じになったことを確認した後、最低 12 時間攪拌を続けた。その後攪拌を停止し、5°C で 12 時間以上静置した。この溶液を 5°C にて 10,000×g で 30 分間遠心し、上澄みと沈殿を分離した。上澄みは再びロータリーエバポレーターをもちいて 40°C で沈殿剤の除去および濃縮し、オリゴ糖画分として凍結乾燥した。沈殿は限外ろ過水に溶解後、メタノールまたはアセトンを用いて再沈殿した。これを 5°C にて 10,000×g で 30 分間遠心し、残留するオリゴ糖その他の低分子物質を除去する操作を 3 回繰り返した。得られた沈殿を再び限外ろ過水に溶解し、スターラーで攪拌しながら 60°C に加温すると同時にアスピレーターで減圧し、沈殿剤を除去した。元の培養液の体積と同じになるように限外ろ過水を加え、活性炭処理後に限外ろ過水に対して透析した。透析は、透析外液に糖質およびイオン性成分が検出されなくなるまでおこなった。透析後の溶液をポアサイズ 0.8・m の PES 膜で濾過後、4Pa で凍結乾燥しエルシノ多糖を回収した。

サイズ排除クロマトグラフィーでは、ベッド体積 250mL の Bio-Rad エコノカラムに脱塩用ゲルとしてポリアクリルアミド担体 Bio-Rad P6DG を充填し、このカラムに GE バイオサイエンスのスーパーループを用いて多糖含有画分 50mL を注入後、流速 2.5mL/min で分離精製を行なった。カラムからの溶出液はフラクションコレクターを用いて 5mL ずつ分取し、各画分の導電率と示差屈折率を測定し、多糖画分と低分量画分に分画した。多糖画分はポアサイズ 0.8・m の PES 膜で濾過後、4Pa で凍結乾燥し、プルランを回収した。コントロールとして、培養操作を開始する前の培養液についても同様に調べたところ、多糖画分には何も残らなかった。

エルシノ多糖は *Elsinoe* 属菌を PE 培地または CSL 培地で培養すると大量に生産された。

その収量は、炭素源をスクロースとしたときが最も多く、液体培地 1 リットルあたり 6.0g のエルシノ多糖が得られた。なお Potato Extract 培地のほうが CSL 培地よりもエルシノの収率が高くなる傾向が見られた。

りん酸源及び窒素源を極端に制限し、pH=3 の条件で培養すると、モル質量が 10⁷ g/mol 以上の巨大エルシノが得られた。ただしモル質量の測定は Wyatt Technology の DAWN EOS を無改造でそのまま利用して行った結果である。

培地条件を適宜変更することにより、得られるエルシノのモル質量は 10⁴~10⁷ g/mol まで任意に設定可変であった。さらに、モル質量の分布もある程度制御可能なことがわかった。今後は、分別精製が不要な程度にモル質量分布の狭いエルシノ多糖を生産させるための培養条件の改良と培養方法の確立を目指す。

生産されたエルシノの物理化学特性を検討するため、専用の計測機器の製作を行った。まず、示差屈折率の濃度増分 (dn/dc) の絶対測定が可能な干渉波光学系を構築した。一般に市販の示差屈折率計は白色光源を利用していることに加え装置の較正限界が 10⁻⁵ 程度なので精密測定を行うためには精度が不十分である。本研究では単一縦モードレーザーを光源としたスキヤニングマイケルソン干渉計を構築し示差屈折率を測定した。この装置によって 10⁻⁷ の精度で dn/dc を計測できた。つぎに、フィールドフローフラクション装置を開発した。この装置の分離能は市販装置の 2 倍程度であった。さらに、連続フロー式光散乱装置を開発した。これらの装置を用いてエルシノ水溶液の溶液物性研究を続けている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 高橋亮, フィールドフローフラクション装置, ぶんせき, 6, 296-301, 2009, 査読有.
- ② Funami, Takahiro; Noda, Sakie; Nakauma, Mkakoto; Ishihara, Sayaka; Takahashi, Rheo; Al-assaf, Saphwan; Ikeda, Shinya; Nishinari, Katsuyoshi; Phillips, Glyn O "Molecular Structures of Gellan Gum Imaged with Atomic Force Microscopy in Relation to the rheological behavior in aqueous systems in the presence or Absence of Various Cations" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8609 - 8618, 2008, 査読有.
- ③ Noda, Sakie; Funami, Takahiro; Nakauma,

- Makoto; Asai, Iwao; Takahashi, Rheo;
Al-assaf, Saphwan; Ikeda, Shinya;
Nishinari, Katsuyoshi; Phillips, Glyn O.
“Molecular Structures of Gellan Gum
Imaged with Atomic Force Microscopy in
Relation to Its Rheological Behaviors in
an Aqueous System. 1. Investigations of
Gellan Gum with Different Acyl Contents
in the Presence or Absence of
Potassium” *Food Hydrocolloids*, 22(6),
1148 - 1159, 2008, 査読有.
- ④Funami, Takahiro; Kataoka, Yohei; Noda,
Sakie; Hiroe, Mika; Ishihara, Sayaka;
Asai, Iwao; Takahashi, Rheo; Inouchi,
Naoya; Nishinari, Katsuyoshi
“Functions of fenugreek gum with
various molecular weights on the
gelatinization and retrogradation
behaviors of corn starch-2:
Characterizations of starch and
investigations of corn starch/fenugreek
gum composite system at a relatively low
starch concentration; 5 w/v%” *Food
Hydrocolloids*, 22(5), 777 - 787, 2008,
査読有.
- ⑤Funami, Takahiro; Kataoka, Yohei; Noda,
Sakie; Hiroe, Mika; Ishihara, Sayaka;
Asai, Iwao; Takahashi, Rheo; Nishinari,
Katsuyoshi “Functions of fenugreek gum
with various molecular weights on the
gelatinization and retrogradation
behaviors of corn starch-1:
Characterizations of fenugreek gum and
investigations of corn starch/fenugreek
gum composite system at a relatively
high starch concentration; 15 w/v%”
Food Hydrocolloids, 22(5), 763 - 776,
2008, 査読有.
- ⑥Makabe, Takeshi; Prawitwong, Panida;
Takahashi, Rheo; Takigami, Machiko;
Nagasawa, N.; Takigami, Syoji
“Solution Properties of low molar mass
Konjac mannan” *Transactions of the
Materials Research Society of Japan*,
33(2), 471 - 474, 2008, 査読有.
- ⑦平島円, 高橋亮, 西成勝好, 澱粉の離水に
及ぼす呈味物質の影響, *日本調理科学会誌*,
40(4), 249 - 256, 2007, 査読有.
- ⑧Funami, Takahiro; Kataoka, Yohei; Hiroe,
Mika; Asai, Iwao; Takahashi, Rheo;
Nishinari, Katsuyoshi “Thermal
Aggregation of Methylcellulose with
Different Molecular Weights” *Food
Hydrocolloids*, 21(4), 46 - 58, 2007, 査
読有.
- ⑨窪田健二, 高橋亮, ハイドロコロイドの光
散乱 *Food and Food Ingredients Journal of*

Japan, 212(1), 17 - 29, 2007, 査読無.

[学会発表] (計2件)

- ①Funami, Takahiro; Noda, Sakie; Nakauma,
Makoto; Takahashi, Rheo; Al-assaf,
Saphwan; Nishinari, Katsuyoshi;
Phillips, Glyn O. “Influence of
Molecular Structure Imaged with Atomic
Force Microscopy on the Rheological
Properties of Gellan Gum in an Aqueous
System” *GeISympo2007 Polymer Gels:
Fundamentals and Functional Control*,
The University of Tokyo, Japan, Aug 6 -
8, 2007.
- ②Funami, Takahiro; Noda, Sakie; Nakauma,
Makoto; Takahashi, Rheo; Al-assaf,
Saphwan; Nishinari, Katsuyoshi;
Phillips, Glyn O. “Influence of
molecular structure imaged with atomic
force microscopy on the rheological
behavior of gellan gum in an aqueous
system” *The Food Hydrocolloids Trust:
14th Gums and Stabilisers for the Food
Industry Conference*, North East Wales
Institute, Wrexham, UK, Jun 18 - 22,
2007.

[図書] (計3件)

- ①Nishinari, Katsuyoshi; Zhang, Hongbin;
Takahashi, Rheo “Plant
polysaccharides: Storage plant
polysaccharides: Galactomannans,
glucomannans, xyloglucans” In
Comprehensive Glycoscience; J.
Kamerling, G.-J. Boons, Y. Lee, A.
Suzuki, N. Taniguchi, A.G.J. Voragen,,
Eds., Elsevier Science Ltd, 613 - 652,
2007, 査読無.
- ②高橋亮, 多糖類の分子量と分子形態, 食品
ハイドロコロイドの開発と応用; 西成勝
好監修, シーエムシー出版, 68 - 88, 2007,
査読無.
- ③高橋亮, 余川丈夫, ガラクトマンナン, 食
品ハイドロコロイドの開発と応用, 西成勝
好監修, シーエムシー出版, 177 - 195,
2007, 査読無.

[その他]

ホームページ

<http://www.chem-bio.gunma-u.ac.jp/>

研究室のページは改訂中.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 亮 (TAKAHASHI RHEO)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 30375563

(2)研究協力者

西成 勝好 (NISHINARI
KATSUYOSHI)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授

研究者番号：10254426

川瀬 徳三 (KAWASE TOKUZO)

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科
・教授

研究者番号：60152956

平島 円 (HIRASHIMA MADOKA)

三重大学・教育学部・准教授

研究者番号：80390003