

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07814

研究課題名(和文) 亜臨界含水ポリオール処理による希少糖製造技術の開発

研究課題名(英文) Production of rare sugars by the subcritical treatment in aqueous polyols

研究代表者

小林 敬 (Kobayashi, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：70416311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：亜臨界水は高い反応性を有しながら無害な溶媒である。亜臨界水を用いて普通糖から希少糖を合成する試みを行ったところ、希少糖はほとんど生成しなかった。しかし、水にエタノールを加えると希少糖収率が改善した。しかしエタノールの添加は低い等濃度でしか実施できない。そこで、ポリオール類を水に添加して同様に検討した。しかし、希少糖収率の有意な改善は認められなかったことから、亜臨界水中にリン酸緩衝液を添加した反応系で希少糖合成を試みた。その結果、従来法と比較して10倍以上の希少糖収率の改善が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少糖は自然界に存在量の少ない糖類の総称である。希少糖の中には有用な生理活性を持つものがあると考えられているが、現在のところ機能性を評価するための希少糖生産プロセスは確立されていない。そこで、我々は亜臨界流体中で希少糖の合成を試みた。リン酸緩衝液を反応溶媒にすることで、低温で迅速に、かつ効率的に希少糖を合成できた。これは、健康増進社会の推進に寄与するとともに、省エネルギーで環境負荷の小さい希少糖生産プロセスでもある。種々の希少糖の製造が実現することにより、持続可能な社会の実現に寄与することが出来、SDGsにも見合う。

研究成果の概要(英文)：Subcritical water is a highly reactive yet harmless solvent. When an attempt was made to synthesize rare sugars from common sugars by subcritical water treatment, almost no rare sugars were produced. However, the addition of ethanol to water improved the yield of rare sugars, although the addition of ethanol decreases the solubility of sugars in a medium. Therefore, aqueous polyols were adopted for the production. However, since no significant improvement in the rare sugar yield was observed, we attempted to synthesize rare sugars in a subcritical water containing phosphate buffer. As a result, significant improvement in the yield of rare sugars of 10 times or more was observed as compared with the conventional methods.

研究分野：食品工学

キーワード：亜臨界水 希少糖 緩衝液

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然界に存在量の少ない糖を希少糖と呼ぶ。希少糖には血糖値上昇抑制などの生理活性が確認されているものをはじめとして、数多くの種類が存在する。しかし、その他の希少糖の多くは、生産法さえ確立されておらず、生理活性の評価を行うための量の確保も困難である。そこで、希少糖を効率よく生産する技術の確立が希求の課題となっている。

常圧における沸点より高い温度で、加圧することにより液体状態を保った水は亜臨界水と呼ばれる。我々は亜臨界水を用いたバイオマス成分の抽出や反応などに関する一連の研究を行ってきた。そして、水にエタノールを加えて亜臨界状態に保った亜臨界含水エタノール中では、グルコースからフルクトースへの異性化が促進され、フルクトースの分解が抑制された。

反応機構を推察したところ、この反応はグルコース型の還元糖に対して一般的に起こると考えられた。そこで、同型の糖であるガラクトースを亜臨界含水エタノール処理したところ、希少糖であるタガトースが高い選択率で得られた。

このように、含水エタノール中では希少糖が効率よく生成することが判明した。しかし、含水エタノールには糖が溶けにくく、結果的に生成物である希少糖の濃度も非常に低い。実際に、ガラクトースは 80%エタノールに高々 1%程度しか溶解せず、生成した希少糖の濃度は 0.4%程度にとどまった。

### 2. 研究の目的

我々は、糖を高濃度で溶解することができるグリセロールなどのポリオール(多価アルコール)と水の混合物(含水ポリオール)に着目し、含水ポリオール中で高濃度の希少糖生産を行うことを目的とした。

また、ポリオールを用いた検討の結果、ポリオールを用いるよりも緩衝液を用いる方が希少糖収率の改善に資する可能性が示唆された。これらのことから、リン酸緩衝液中での希少糖生成挙動について詳細に検討することも目的の一つとした。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. 材料

ガラクトースは富士フィルム和光純薬(大阪)より購入した。その他の試薬は、富士フィルム和光またはナカライテスク(京都)より購入した。

#### 3.2. 亜臨界含水ポリオールによる希少糖の合成

図 1 に示す装置を用いて亜臨界水処理を実施した。ガラクトースを終濃度が 5% (g/g-solution) になるように、蒸留水または含水エチレングリコール(50 wt%含有)に溶解した。原料糖溶液に窒素ガスを吹き込んで脱気し、溶液中の酸素を除去した。さらに、糖溶液の容器には窒素ガス入りのガスバッグを接続し、大気中の酸素の再溶解を防いだ。

オイルバスにシリコンオイルを入れ、攪拌しつつ、一定の温度(100~160 )に保った。反応器として、0.8 mm I.D の HPLC チューブを用いた。反応器をコイル状にしてオイルバスに浸漬し、入口側を HPLC 送液ユニットに接続した。また、出口側を冷却槽水浴に通じ、反応を終結させた。反応器の出口には背圧弁を設置し、反応器内部の圧力を 3~4 MPa に保持した。原料糖溶液の流量を反応温度における水の膨張率から計算して、30~300 s の範囲の滞留時間となるように変化させて反応器に供給し、反応器の出口液を約 1.5 mL 採取した。

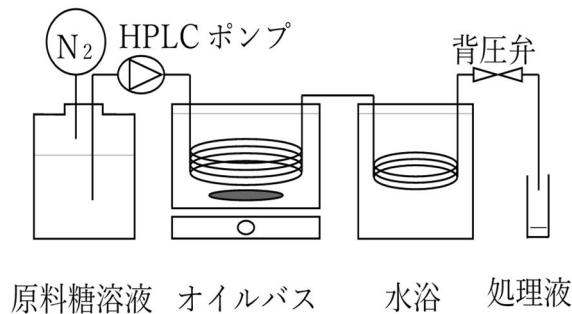


図 1. 亜臨界水反応装置

### 3. 3. 緩衝液添加がガラクトースの異性化挙動に及ぼす影響

含水エチレングリコール中での検討結果では、亜臨界水中と比べて顕著な希少糖収率の改善が認められなかったことから、水中で緩衝液を用いて希少糖収率の改善が見込めないか検討した。方法は、含水エチレングリコール中での処理と同様とし、原料糖溶液としてガラクトースを pH 7.0 に調整した 10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、終濃度を 5% (g/g-solution) としたものを用いた。反応温度は 100~160 の範囲で変化させ、各温度について原料糖溶液流量を反応器の温度における水の膨張率から計算して、30~300 s の滞留時間となる範囲で変化させた。

### 3. 4. 緩衝液の pH がガラクトースの異性化に及ぼす影響

ガラクトースを pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0 に調整したリン酸緩衝液 (10 mmol/L) に、それぞれ終濃度 5% (g/g-solution) になるように溶解した。溶解した後の pH はそれぞれ 5.95、6.88、7.75、8.33 であった。オイルバスの温度は 140 とし、反応操作は 3.2 と同様に行った。

### 3. 5. 処理液の分析

処理液中の糖の分析は HPLC で行った。送液ユニットに COSMOIL Sugar-D カラム (3.0 mm I.D×250 mm、ナカライテスク、京都) 及び示差屈折率検出器を接続した。移動相には 80% アセトニトリル (富士フイルム和光純薬、大阪) を用い、流速を 0.4 mL/min とした。

## 4. 研究成果

### 4. 1. 亜臨界含水エチレングリコール中での希少糖生成挙動

50 wt% 含水エタノールの代わりに 50 wt% 含水エチレングリコールを用い、ガラクトースの亜臨界水処理を実施した。300 s の反応において、亜臨界含水エタノール中ではタガトースの収率は 5.5% であり、タロースの収率は約 0.2% であった。一方、亜臨界含水エチレングリコール中でも、タガトースの収率は 4.5% と改善しなかった。また、タロースの収率も約 0.1% であった。このように、含水ポリオールは必ずしも希少糖収率を改善することはないことが示唆された。

### 4. 2. 緩衝液添加がガラクトースの異性化挙動に及ぼす影響

これまでの知見より、反応中の pH の低下がタガトースへの異性化を阻害する可能性が示唆されていた。そこで、反応中の pH 変化を抑制するために緩衝液を用いると、希少糖収率が改善するのではないか、との仮説を立てた。この仮説を立証するために、10 mmol/L リン酸緩衝液中でガラクトースの亜臨界水処理を実施した。その結果、純粋な亜臨界水と比較して、ガラクトースは大幅に速く反応し (図 2)、高収率でタガトースとタロースが生成した (図 3)。タガトースの収率は 90 s 前後で最高に達し、その値は約 13% であり、純水中での結果 (約 0.52%) と比較

して飛躍的に上昇した。また、タロースの収率も 300 s で 1.9% に達し、純水中よりも大幅に高かった。また、4.1 で示した亜臨界含水エタノール処理の結果（収率 5.5%）と比較しても大幅なタガトース収率の改善が認められた。

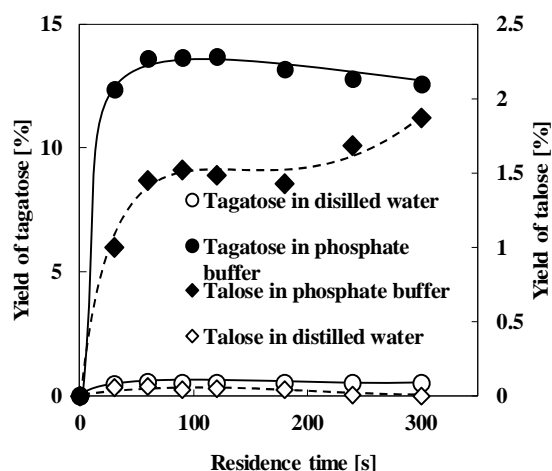
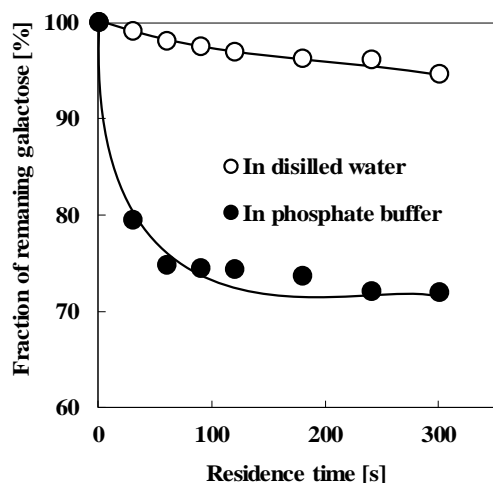


図 2. 滞留時間とリン酸緩衝液の添加がガラクトース残存率に及ぼす影響  
 図 3. 滞留時間とリン酸緩衝液の添加がタガトース及びタロース収率に及ぼす影響

#### 4. 3. 緩衝液の初期 pH がガラクトースの異性化に及ぼす影響

pH の調整が希少糖の収率に影響することを確認するために、原料糖溶液の初期 pH を変化させ、希少糖収率に及ぼす影響を評価した。その結果、pH 7~9 では、ガラクトースの反応が促進され（図 4）、タガトースの最高収率は 12% 以上であり、大幅に改善されることが判明した（図 5）。一方、pH 6 においては最高でも 4.5% の収率であり、酸性側 pH になるとタガトースへの異性化は大幅に抑制されることが判明した。これは、既往の結果である反応中に有機酸が生成し、pH が低下していくことと対応しており、矛盾点はない。

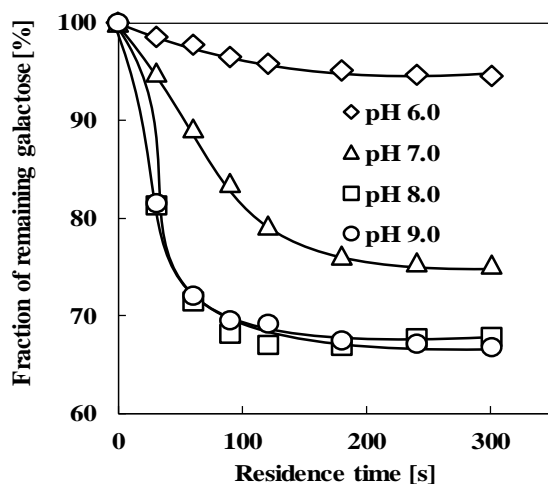


図 4. 滞留時間及び緩衝液の初期 pH がガラクトース残存率に及ぼす影響

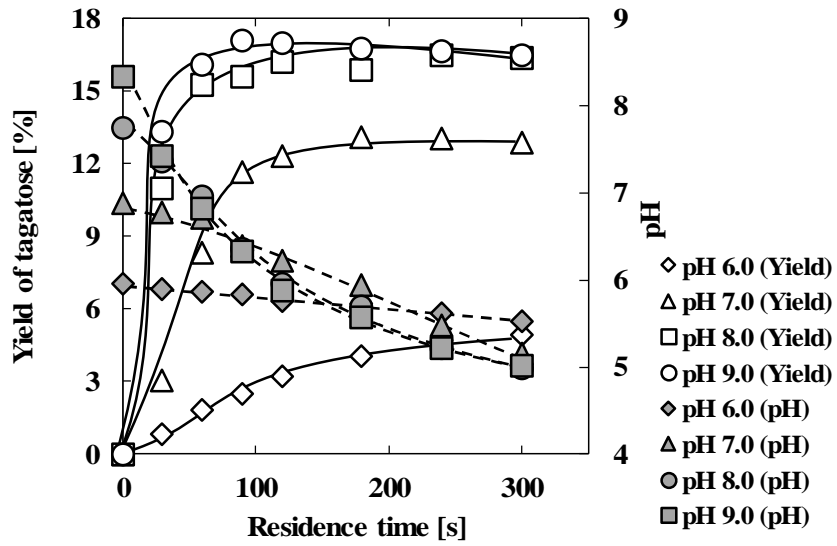


図5. 種々の緩衝液の初期 pH におけるタガトース収率と処理液の pH の経時変化 実線: タガトース収率 点線: 処理液 pH (凡例の pH は緩衝液の初期 pH)

#### 4. 4. 結論

以上をまとめると、含水ポリオールは希少糖の製造には不向きであるが、希薄なリン酸緩衝液を用いることで希少糖の収率が大幅に改善する知見が得られた。今後、糖濃度の上昇による反応挙動への影響などを評価することが必要である。そして、これらの影響を評価し、最適な反応条件を確立できれば、希少糖生産の実用化にも繋がることになる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furushiro Yuya, Kobayashi Takashi	4. 巻 67
2. 論文標題 Reaction Behavior of Glucose and Fructose in Subcritical Water in the Presence of Various Salts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 11~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2019_0014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama Yusuke, Kobayashi Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Kinetics for the Subcritical Treatment of Glucose Solution at Various Concentrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 383~389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.25.383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Hirayama, T. Kobayashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Kinetics for the subcritical treatment of glucose solution at various concentrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 383-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山祐輔, 小林敬, 谷史人
2. 発表標題 亜臨界水中でのグルコース濃度が異性化反応に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度（平成30年度）大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾西 佑一朗、古城 侑也、安達 修二、谷 史人、小林 敬
2. 発表標題 亜臨界水中での希少糖の合成に及ぼす緩衝液とアルコールの影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 希少単糖および希少二糖の製造方法	発明者 小林敬、平山祐輔、 古城侑也、尾西佑一朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-194984	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関