

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業  
「製麩副産物からの機能性環状オリゴ糖製造技術の開発」

成果報告書

平成25年1月

委託元 内閣府沖縄総合事務局

委託先 株式会社トロピカルテクノセンター

## 目次

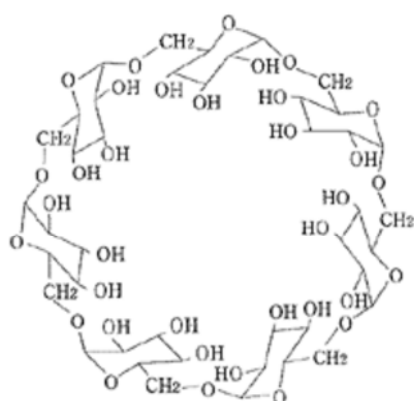
|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 第1章 研究開発概要-----                     | 1  |
| 1-1. 研究開発の背景、研究目的および目標-----         | 1  |
| 1-2. 研究体制-----                      | 3  |
| 1-3. 成果概要-----                      | 4  |
| (1) C I 生産および精製技術の最適条件の確立-----      | 4  |
| (2) C I 転換酵素力価増強技術の確立-----          | 4  |
| (3) 高純度C I の包接機能の解明-----            | 5  |
| (4) 安全性の確認-----                     | 5  |
| 1-4. 当該プロジェクト連絡窓口-----              | 5  |
| 第2章 本論-----                         | 6  |
| 2-1. C I 生産および精製技術の最適条件確立-----      | 6  |
| 2-1-1 : C I の効率的生産技術の確立-----        | 6  |
| 2-1-2 : C I 精製の最適化技術開発-----         | 13 |
| 2-2. C I 転換酵素力価増強技術の確立-----         | 16 |
| 2-3. 高純度C I の包接機能の解明-----           | 24 |
| 2-3-1 : 味覚センサーによる包接機能の検証-----       | 24 |
| 2-3-2 : 高純度C I の包接機能検証-----         | 29 |
| 2-4. 安全性の確認-----                    | 32 |
| 2-4-1 : ラットにおける急性経口毒性試験-----        | 32 |
| 2-4-2 : ラットを用いた 28 日間経口亜急性毒性試験----- | 33 |

## 第1章 研究開発の概要

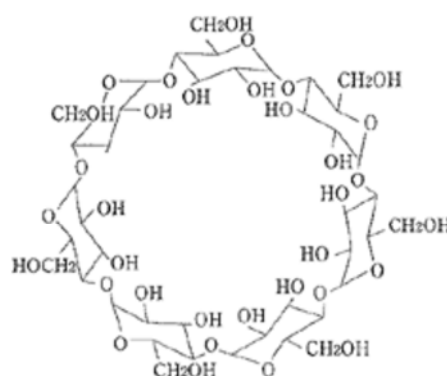
### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

サイクロデキストラン(CI)は、グルコース分子が環状に結合したオリゴ糖である。CIの化学構造は、サイクロデキストリン(CD)とよく似ているが、CDの結合様式が $\alpha$ -1,4結合なのに対し、CIは $\alpha$ -1,6結合となっている。

CIは、7～17個のグルコース分子が環状に連結した構造を持ち、純粋なものは無色、無味、無臭で水溶性が高く、化学的に安定で、加熱や酸・アルカリにも強いという特徴がある。



サイクロデキストラン CI-7



サイクロデキストリン  $\beta$ -CD

CIは、CDと比較して口径が大きく厚みが薄く、分子のフレキシビリティが非常に高いと予想され、極めて水溶性が高く、常温で等量以下の水に溶解する。これはCDでは可溶化できない難水溶性の物質をCIが可溶化できる可能性を期待させるものである。また、CIの大きな特徴の一つとして、歯垢の原因となる不溶性グルカンの合成を強力に阻害することが確認されており、虫歯の形成を抑制することが期待される。

抗う蝕性CIを有効成分として含有することを特徴とする抗う蝕剤に関する特許は、1993年に(財)野田産業科学研究所とキッコーマン株式会社並びに農林省食品総合研究所の3者により出願され、その関連特許も多いが、その多くはサイクロデキストラン合成酵素生産菌の遺伝子組換え菌を使用するものが多く、現在のCI生産に関わる特許は、最初の特許となった冒頭記述の特許のみである。

平成13年に原特許に関するサイクロデキストランの生産菌を譲り受けて、食品産業再生新技術創出技術開発事業の受託をはじめとして、独立行政法人食品総合研究所(現:(独)農研機構・食品総合研究所)と共同で、平成14～16年度の沖縄産学官共同研究推進事業および平成17年度の地域新生コンソーシアム研究開発事業を実施し、その間に多くの知見が得られ、現在、CIを配合した甘味料(製品名:「黒糖はちゅら」、「CI SMGAR はちゅら」)が(株)シー・アイ・バイオから製品化されている。

しかし、原料に精製グラニュー糖を用いていることから原料コストが高いという課題がある。また、現在の発酵・精製工程では、CI以外の様々な副生成物が多く生成することからCIの純度が低いという課題も有している。そのため、副生成物により包接作用などの機能性が阻害されることから、新たな製品開発のネックになっている。包接機能は、特に、物質の安定化、有効成分の除放・バイオアベイラビリティの向上、物質の可溶化など、医薬分野への応用に用途が拡大しており、CIの用途展開としては有望な状況にある。従って、精製グラニュー糖に替わる安価な原料による製造技術の開発や、CIの純度を向上させるための高品質化技術が求められている。現在の精製グラニュー糖を原料とした発酵・精製工程では、原料コストが高く、副生成物も多く生成されるためCIの精製コストもかかるという課題がある。

精製グラニュー糖の代わりに、麴を製造する際に副産物として排出されるデンプンを用いることにより、原料コストの低減がはかれる可能性があるが、デンプンを原料としたCIの発酵・精製技術は確立されていない状況である。デンプンを原料とした場合、精製グラニュー糖と比較して副生成物（主にグルコース）が少ないため、このデンプンを原料とした発酵・精製技術が確立出来ればCIの生産効率化と高品質化だけでなく、生産コスト低減も可能となる。

そこで、製麴副産物であるデンプンを原料にした高純度CIの発酵・精製工程に係る技術を開発することを目的とし、CI生産効率化を検討し高純度CI（純度 $\geq 50\%$ ）の製造を目標とする。

## 1-2 研究体制

本プロジェクトでは、図1の通り、管理法人と2機関で組織し、研究開発を実施した。また、表1には管理員、研究員、およびアドバイザーの一覧を示す。

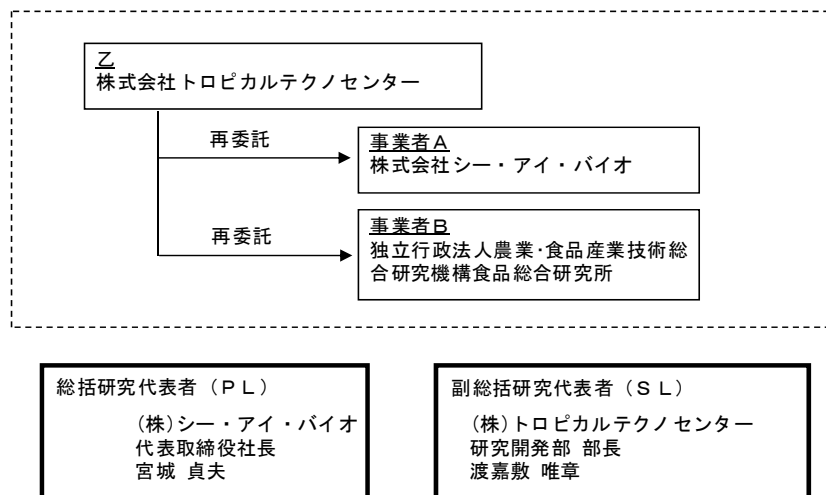


図1. 研究実施体制

表1. 研究実施担当者一覧表

| 氏名      | 所属                        | 役職                     | 担当     |
|---------|---------------------------|------------------------|--------|
| 名嘉 博幸   | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 部長               | 管理員    |
| 安慶名 千賀子 | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 スタッフ             | 管理員    |
| 伊保 満月   | (株)トロピカルテクノセンター           | 業務支援部                  | 管理員    |
| 渡嘉敷 唯章  | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 マネージャー           | SL     |
| 高良 亮    | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 スタッフ             | 研究員    |
| 池端 真美   | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 スタッフ             | 研究員    |
| 吉野 敦    | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 スタッフ             | 研究員    |
| 金城 健作   | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 臨時職員             | 研究補助   |
| 儀間 健司   | (株)トロピカルテクノセンター           | 事業推進部 臨時職員             | 研究補助   |
| 宮城 貞夫   | (株)シー・アイ・バイオ              | 代表取締役社長                | PL     |
| 儀部 茂八   | (株)シー・アイ・バイオ              | 開発製造部長                 | 研究員    |
| 伊是名 信一郎 | (株)シー・アイ・バイオ              | 開発製造部係長                | 研究員    |
| 舟根 和美   | (独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 | 微生物利用研究領域<br>醗酵細菌ユニット長 | 研究員    |
| 川端 康之   | 大阪樟蔭女子大学                  | 学芸学部<br>健康栄養科 准教授      | アドバイザー |
| 照屋 隆司   | (有)開発屋でいきたん               | 代表取締役                  | アドバイザー |
| 稻福 桂一郎  | 金秀バイオ(株)                  | 研究開発部 次長               | アドバイザー |
| 平良 昭    | オリオンビール(株)                | 商品開発部 部長               | アドバイザー |

### 1-3 成果概要

本研究では、(1)CI生産および精製技術の最適条件確立、(2)CI転換酵素力価増強技術の確立、(3)高純度CIの包接機能検証、(4)安全性の確認、を実施した。

#### (1)CI生産および精製技術の最適条件確立

製麩デンプンからCIを生産するためには、2種類の酵素を必要とする。そのため、それぞれの酵素を産生する2種類の微生物を培養して、CIを生産する技術を検討してきた。しかし、本事業で選抜した菌株を詳細に調べた結果、この菌株だけで製麩デンプンからCIを生産できることが分かった。そこで、本年度はこの選抜菌株由来の酵素を用いて、CI生産最適化条件を確立し、200L プラントスケールにおいても、これまでのショ糖を原料とした製法と比較して、同等以上のCI転換率でCIを生産することができた。

CI精製工程において、澱粉残渣がMF膜の根詰まりの要因となり、凍結処理や連続遠心分離によりCI反応液を処理することで、澱粉残渣を除去することができた。また、改良NF膜によりCI精製の最適化を検討し、改良前と比較して、CI純度が上昇した。このときのCI純度は54.4%を示しており、目標としていた純度 50%以上を達成できた。純度 50%以上のCIを生産する場合、これまでのショ糖を原料とした方法では、夾雑物を多く含むため、NF膜処理後にさらに合成樹脂に吸着させ、エタノールによりCI含有画分を溶出し精製するため高コストかつ労力を要する。従って、澱粉でのCI生産では樹脂による精製を必要とせずに純度 50%以上のCIが得られることから、高純度CI生産の低コスト化が可能となった。

#### (2)CI転換酵素力価増強技術の確立

有用菌株を得るため、トロピカルテクノセンターで保管されている沖縄微生物ライブラリーや育種株などから選抜を試みた結果、従来の微生物と比較して酵素力価の高い菌株を選抜することができた。さらに、本菌株の保存方法や培養最適化を検討することで、酵素生産安定化に繋げることができた。具体的には、60L プラントスケールでの実証試験を実施し、目標とする0.6U/ml以上を達成できた。また、生産した酵素の安定性も評価し、保存方法や品質安定化へのノウハウも構築することができた。

### (3)高純度CIの包接機能検証

高純度CI素材の包接機能を明らかにすることは、CIの利用可能性を大幅に広げるためにも極めて重要な課題である。そこで、包接機能の一つ、食品の味のマスキング、風味改善効果などを検証すべく、味覚センサーを用いて沖縄特産食品の食味改善効果試験方法を確立した。試料として、純度 50%以上の高純度CIと既知包接剤を用いて比較し、高純度CIの優位性を検証した。その結果、既知包接剤とは異なる包接性を示すデータがいくつか得られ、優位性を示すことができた。また、CI包接の理化学特性として退色遅延効果も見出すこともできた。このように、既知包接剤とは異なる、CIの包接特性が明らかになりつつあり、今後の利活用に大きな期待が持てた。

### (4)安全性の確認

これまで、ショ糖を原料として生産されてきたCIと異なり、本事業では小麦由来のデンプンを原料にしたCI生産技術の開発を行っている。CI自体は、グルコース分子が環状に連結したオリゴ糖であることから比較的安全性が高いと考えられるが、原材料由来の不純物等も含むことから動物試験により基本的な安全性を早期に確認する必要がある。そこで、製麩澱粉を原料に試作した高純度CIについて、単回投与による急性毒性試験や28日間反復投与による試験を実施した。その結果、どちらの試験でも特に大きな問題はなく、澱粉を原料として生産されたCIについても安全性が示された。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

(株)シー・アイ・バイオ

代表取締役社長 宮城 貞夫

〒901-0205 豊見城村字根差部 671-4

TEL:(098)850-0330 FAX:(098)850-0330

E-mail:sd.miya@ci-bio.co.jp

(株)トロピカルテクノセンター

事業推進部 マネージャー 渡嘉敷 唯章

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎5-1

TEL:(098)982-1100 FAX:(098)982-1103

E-mail:toka@ttc.co.jp

## 第2章 本論

### 2-1. Cl生産および精製技術の最適条件確立

#### 2-1-1: Clの効率的生産技術の確立

(担当: TTC、シーアイバイオ)

##### (1) 目的

製麩副産物から得られる安価な澱粉(製麩澱粉)を原料に用いたCl生産では、澱粉をデキストランに変えるデキストラナーゼ(DGase)とデキストランを環化してサイクロデキストランにするサイクロデキストラン合成酵素(CITase)の複数の酵素が必要である。そのため、これらの酵素を得るには2種類の菌株をそれぞれ培養する必要がある。一方、本事業より得られた選抜菌株由来の酵素では、単独で澱粉からCl生産が可能であることが明らかとなった。そのため、製造工程の簡略化が可能となり生産効率化が見込める。そこで、選抜菌株由来酵素を用いて、Cl生産条件の検討、スケールアップ試験によるCl生産性評価を実施し、Cl生産効率化を試みた。

##### (2) 結果と考察

###### ① Cl生産の最適化検討

選抜菌株由来酵素を用いて、Cl生産効率化を検討するため、酵素力価、基質濃度等の諸条件によるCl生産性への影響を調べた。各種諸条件の結果は下記の通りに示した。

酵素力価、基質濃度、および反応時間の影響: 図2-1および2より、基質濃度(製麩澱粉量)は1%と比較して2%でCl濃度が高くなることが分かった。なお、データには示していないが、基質濃度が1%より低い場合や2%を超えると今回の反応条件ではCl生産性が低下することが確認されている。酵素力価においては、反応時間が3-6hrでは100 mU/ml、16-24hrでは25-50 mU/mlでCl濃度が高値を示した。このことから、反応時間が3-6hrでは、酵素を多く必要とすることや実製造工程での区切りが設定しにくいことを考慮して、酵素力価 25-50 mU/ml、基質濃度 2%、および反応時間 16-24hr をCl生産における最適条件とした。

反応温度による影響: 反応 16-24hr において、20-30℃でCl濃度が高値を示した。一方、従来条件である40℃では反応 16hr以降のCl濃度が低下し、高温ほど反応後期のCl生産性が低減することが明らかとなった(図3-1)。さらに、夏場の工場内の気温は30℃を超えることがあることから、高温域での詳細な反応も試みた。その結果、35℃以内の反応では30℃と比較してCl濃度の顕著な違いはなく(図3-2)、Cl生産性に特に問題ないことが示唆された。このことから、反応温度は16-24hrでの反応において20-30℃が最適条件で、35℃を超えない設定が必要であることがわかった。

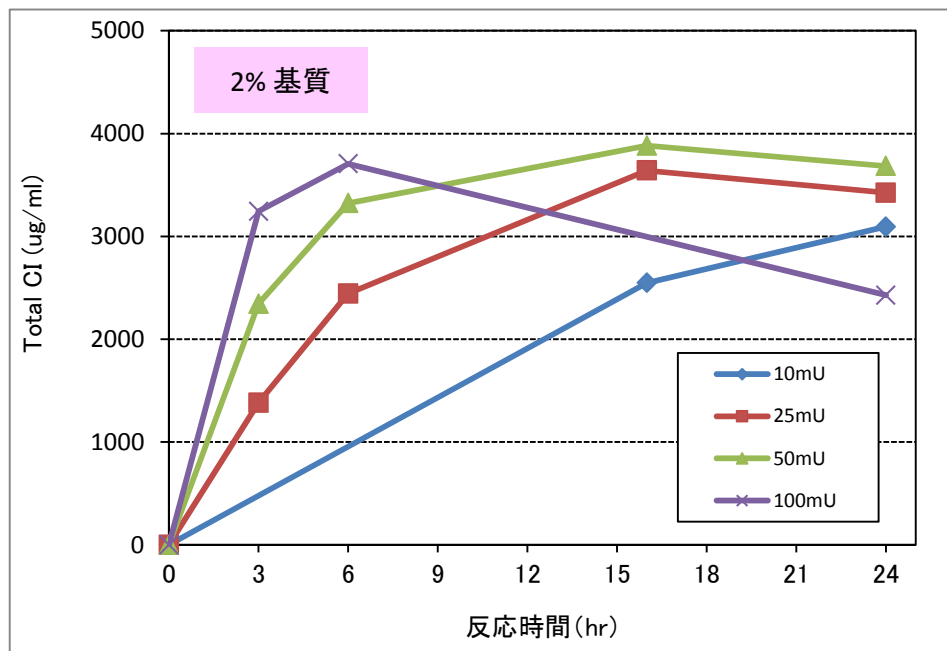


図2-1. 2%基質での酵素力価によるCl濃度の変化

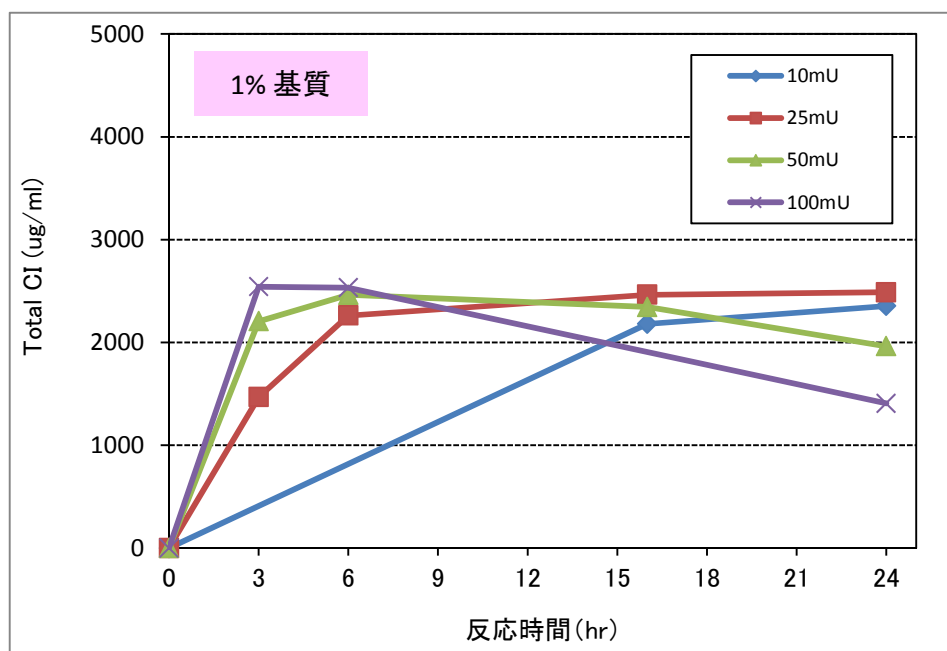


図2-2. 1%基質での酵素力価によるCl濃度の変化

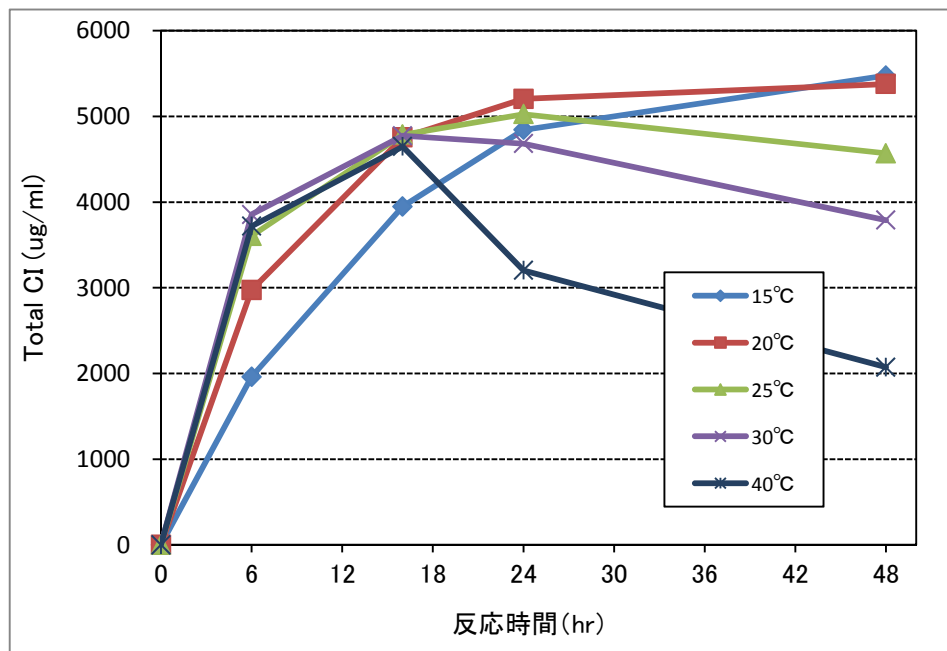


図3-1. 反応温度によるCl濃度の変化

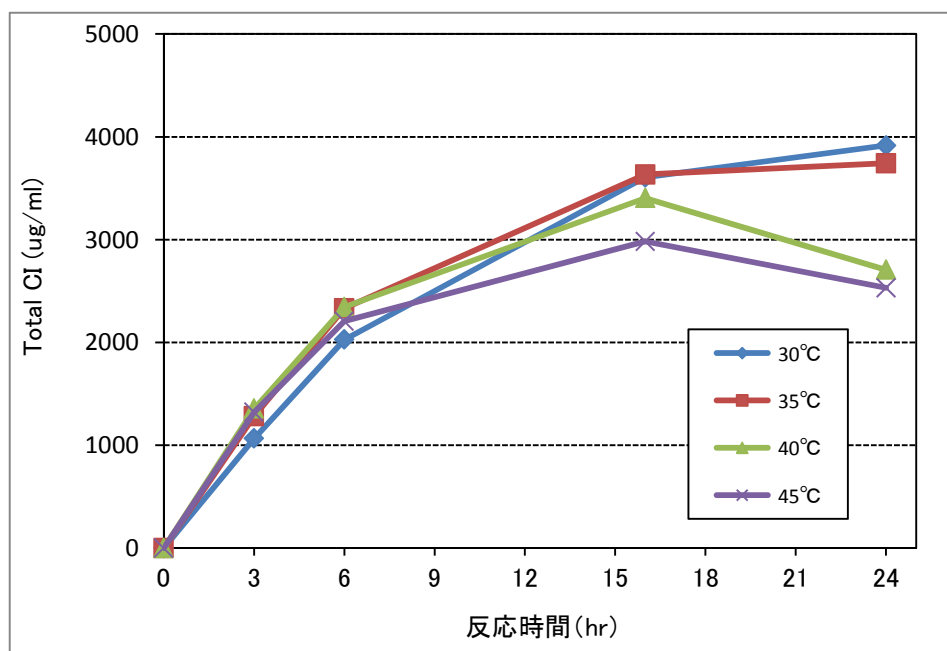


図3-2. 高温域反応におけるCl濃度の変化

pHの影響：図4より、pH5.0を下回るとCl濃度が低減し、pH4.5を下回ると激減することがわかった。このことから、初発の反応液のpHを5.0より低くならないように設定することがCl生産最適化に重要であることがわかった。

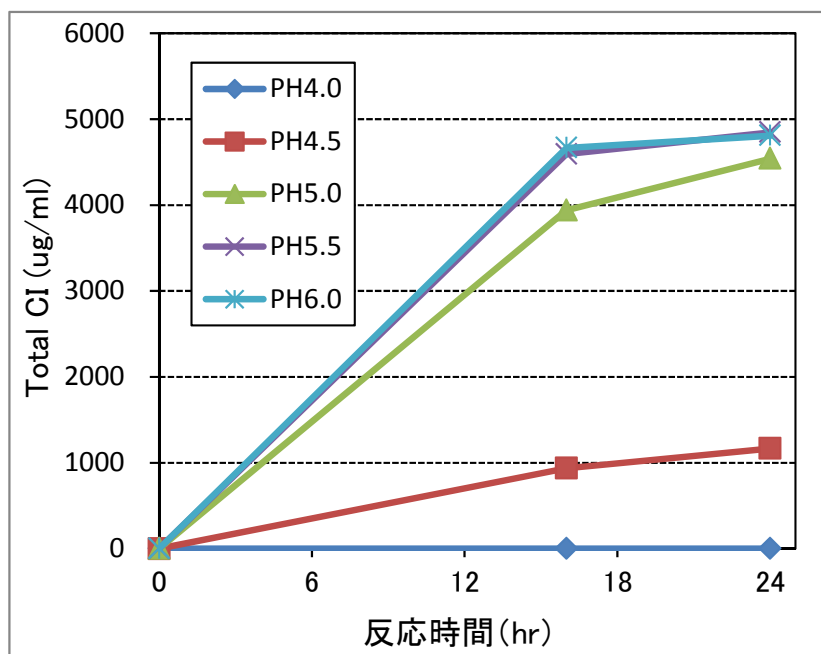


図4. pHによるCl濃度の変化

酢酸 Na Buffer/CaCl<sub>2</sub>の有無の影響：酢酸 Na Buffer や CaCl<sub>2</sub>は、Clの生産安定化に関連する重要な組成物の一つである。しかしながら、Buffer 由来の酸臭や CaCl<sub>2</sub>がそのままCl製品に移行しClの品質に影響する可能性が出てきた。そこで、本試験ではこれら酢酸 Na Buffer や CaCl<sub>2</sub>のCl生産性への影響を調べ、これら組成物を必要とするかどうか検討した。その結果、澱粉を水道水でα化した溶液のみに酵素を添加してのCl生産条件(Water)でも、酢酸 Na Buffer や CaCl<sub>2</sub>の添加同様の結果が得られた(図5)。Buffer や CaCl<sub>2</sub>の添加は必要としないことから、Clの生産工程簡略化や精製の負担軽減によるコスト削減が期待できる。

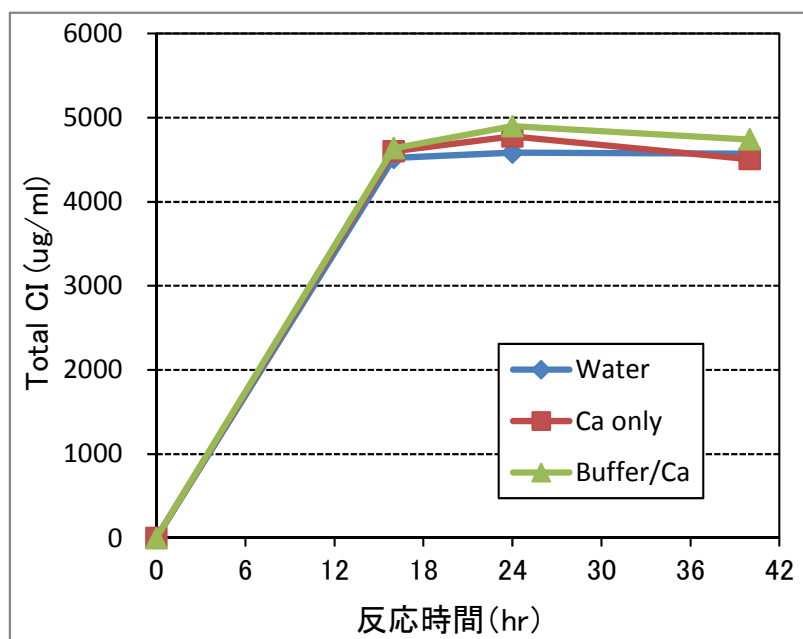


図5. 酢酸 Na Buffer/CaCl<sub>2</sub>の有無によるCl濃度の変化

## ②プラントスケールでのCl生産実証試験(150-200L スケール)

ここでは、①のCl生産の最適化検討の結果を基に、実製造規模であるプラントスケールでのCl生産を実施し、事業化への応用可能性を検証した。その結果、図6より、200LのスケールにおけるCl生産について、反応17hrでCl濃度がプラトーに達しており、ラボでの10Lスケール試験での推移と類似することがわかった。一方、10Lスケールと比較してCl生産性が低く、その要因については今後の課題として残された。しかし、従来製法であるショ糖からのCl生産と比較すると、同基質濃度(原料量)当たりのCl転換率は15%を超えており、従来製法の13%程度より高く、製麩澱粉を原料に用いた方が、Cl生産性が高いことがわかった。また表2より、反応時間が長くなるに従って、重合度の大きいClができる傾向が示されたことから、反応時間を制御することで重合度の異なるClを適宜製造できる可能性も見えてきた。

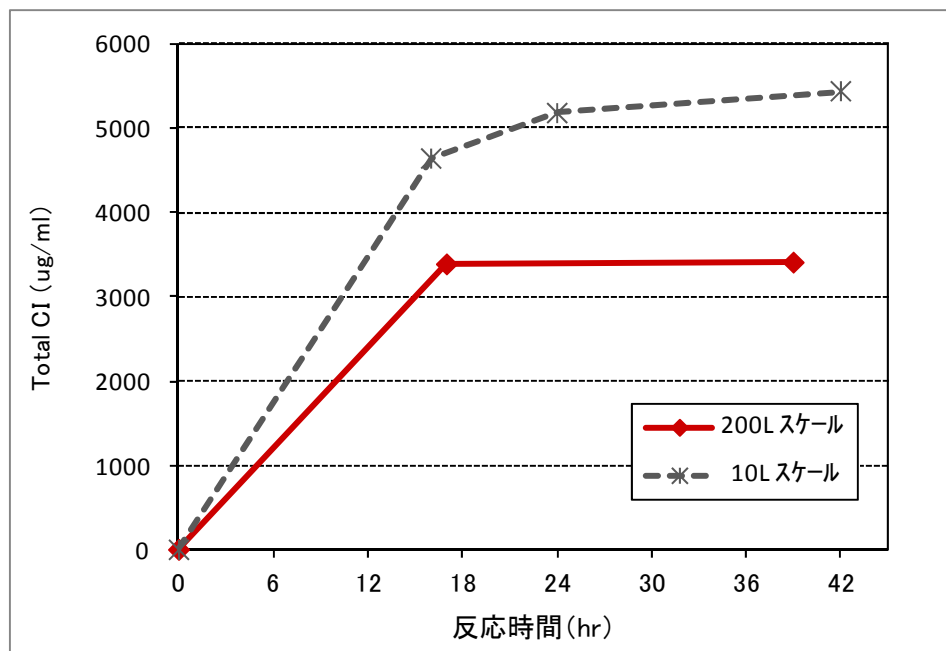


図6. 200L プラントスケールでのCI濃度の変化

表2. 各CI濃度の経時変化

| 反応時間 |      |      |      |       |       |       | (ug/ml) |
|------|------|------|------|-------|-------|-------|---------|
|      | CI-7 | CI-8 | CI-9 | CI-10 | CI-11 | CI-12 | Total   |
| 17hr | 990  | 1488 | 622  | 180   | 101   | 0     | 3381    |
| 39hr | 808  | 1272 | 786  | 200   | 190   | 146   | 3402    |

次に、Cl生産反応において、これまでは酢酸 Na Buffer や  $\text{CaCl}_2$  を添加することで酵素力価の増強や安定化により、Cl生産性を高めることができた。一方、ラボの検討により、選抜菌株由来酵素ではこれら製剤の添加なしでも遜色なくCl生産が可能であることが明らかとなった(図5 参照)。そこで、本試験では、酢酸 Na Buffer や  $\text{CaCl}_2$  の添加なしでの 150L プラントスケール試験によるCl生産試験を実施した。その結果、図7のCl濃度は、酢酸 Na Buffer および  $\text{CaCl}_2$  を添加なし(150L 18hr 反応)でも、前回プラントスケールでのCl生産試験結果(200L 17hr 反応)と同等な結果を示した。これにより、プラントスケールにおいても澱粉と水のための組成液に、選抜菌株由来の酵素を添加することでCl生産が可能であることが示された。従来製法であるショ糖を原料としたCl生産では、ショ糖からデキストラン生産過程で微生物による処理が必要なため培地由来成分まで混入し、さらにCl生産反応では酢酸 Na Buffer や  $\text{CaCl}_2$  の混入により夾雑物を多く含んだ状態になっている。特に、デキストラン生産過程での夾雑物であるリン酸や二価の金属イオンは膜処理によるCl精製において課題の一つとなっている。従って、製麴澱粉を原料としたCl生産は、従来のショ糖を原料とした製法と比較して、夾雑物の少ないCl素材となることから、精製コスト低減に繋げることができる。

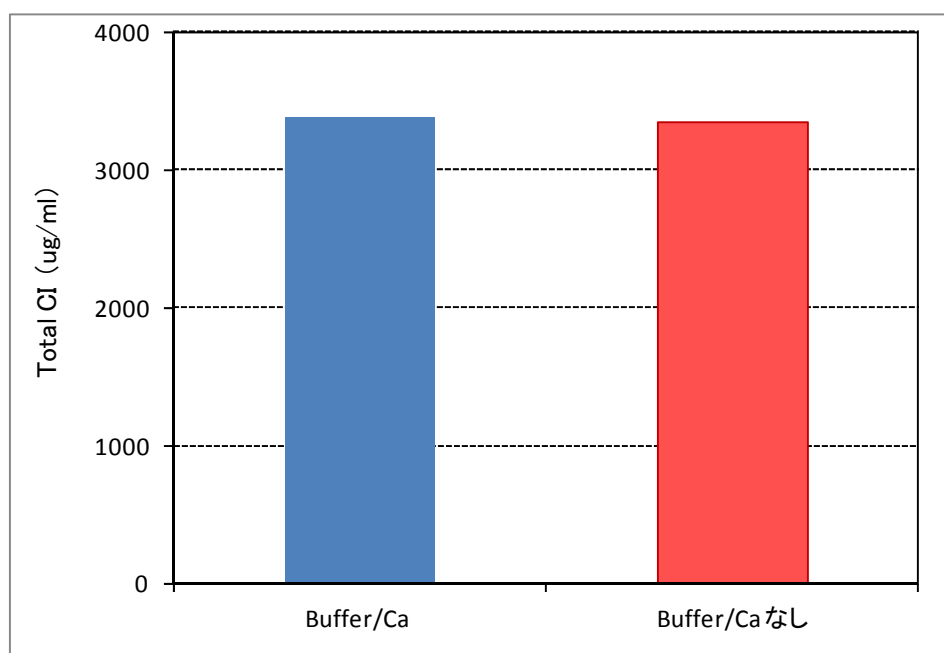


図7. プラントスケールにおける Buffer/Ca 有無によるCl濃度の変化

## 2-1-2: Cl精製の最適化技術開発

(担当: TTC、シーアイバイオ)

### (1) 目的

製麩澱粉を用いたCl生産最適化検討を行ってきた結果、安定的に 200L規模のスケールでのCl生産が可能であることがわかった。しかしながら、Clの精製において新たな課題として、Cl生産反応後の澱粉残渣によるMF膜の根詰まりが出てきた。そこで、本試験では、澱粉残渣の除去方法の検討を実施すること、またCl純度を 50%以上に上げるべく、改良 600Da NF膜によるCl精製最適化検討を試みた。

### (2) 結果と考察

#### ① 澱粉残渣の除去方法の検討

連続遠心分離による除去: プラントスケールでのCl反応液 200Lを用いて連続遠心分離機 (LAPX404 アルファ・ラバル製) にて澱粉残渣を処理し、MF膜装置による透過検証を実施した。その結果、澱粉が除去されているものの、MF膜装置で 100L程度透過後、根詰まりを起こした。このことから、遠心分離装置の回転速度をさらに上げるか、澱粉残渣を沈殿しやすい条件を見出すことが求められた。

凍結処理による除去: 澱粉残渣の沈殿方法として、金属イオン等の薬物添加による沈殿、冷却処理による澱粉の老化による沈殿等が挙げられる。Cl素材は食品に用いられることから、ここでは冷却処理による沈殿処理を検討した。その結果、-30℃で一晩あるいは 2hr 冷凍(凍結直後に解凍)の冷却条件で、室温や冷蔵と比較して、極めて透明度の高い上清液が得られた(図8-1および2)。そこで、150LのCl反応液についても同様に-30℃にて冷凍処理し、解凍後、上清をキムワイプに通して回収した。回収した上清をMF膜処理したところ、問題なく速やかに処理できた。このことから、Cl反応液を予め-30℃凍結処理することが効果的に澱粉残渣を除去できることが確認された。そのため、高純度Clを大量に生産するためには、今後、凍結や連続遠心処理システムを製造工程に組込む必要性が課題として残された。

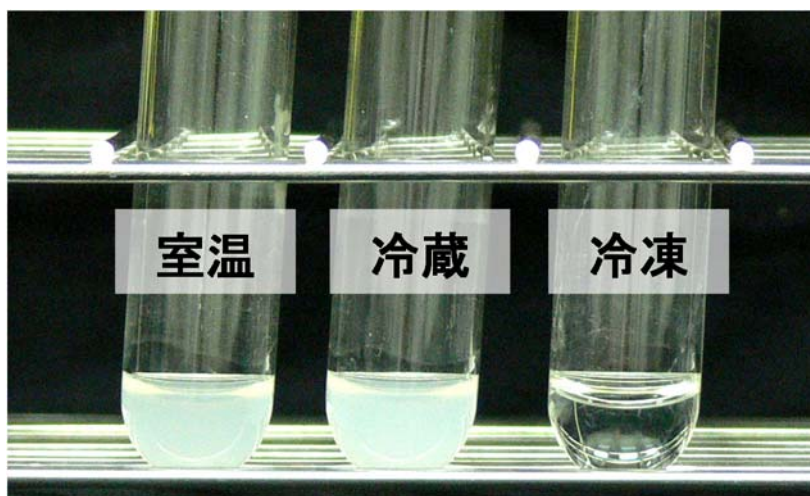


図8－1. 冷却処理前後のCI反応液上清(一晚処理)

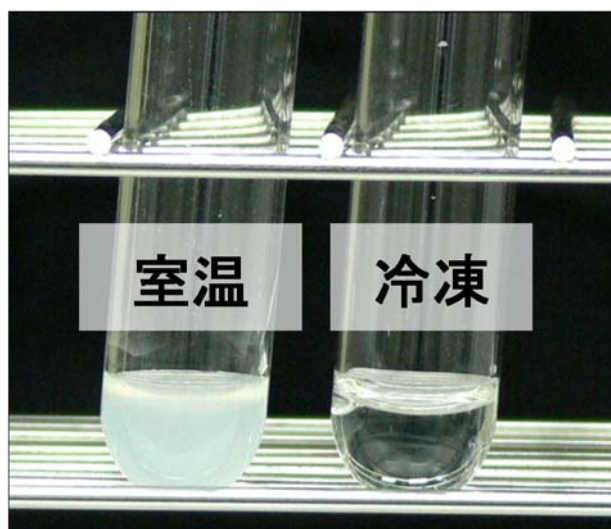


図8－2. 冷却処理前後のCI反応液上清(2hr 処理)

## ②改良 600Da NF膜によるCI精製の検討

本試験では、改良 600Da NF膜(図9)によるCI精製の検討した結果を表3に示した。CI7～12の含有量は改良前では 14.0%に対し、改良後では 35.4%に改善した。一方、灰分が処理後で高くなっているのは、灰分以外の夾雑物が抜けた分、単に相対的に増加したものと考えられる。従って、600Da NF膜では灰分が抜けにくいことを示していると考えられ、今後は灰分をどのように除去するかが課題となる。なお、後述でも示している通り、改良後の 600 Da NF膜より精製したCI純度は、CI-7～15を食総研にて分析して算出したところ、54.4%であったことから、目標の純度 50%

以上を達成できた。純度 50%以上のClを生産する場合、これまでのショ糖を原料とした方法では、夾雑物を多く含むため、NF膜処理後にさらに HP20 等の樹脂に吸着させ、エタノールによりCl含有画分を溶出し精製するため高コストかつ労力を要する。従って、澱粉でのCl生産では樹脂による精製を必要とせず純度 50%以上のClが得られることから、コスト 50%以下で高純度Cl生産が可能であると考えられる。

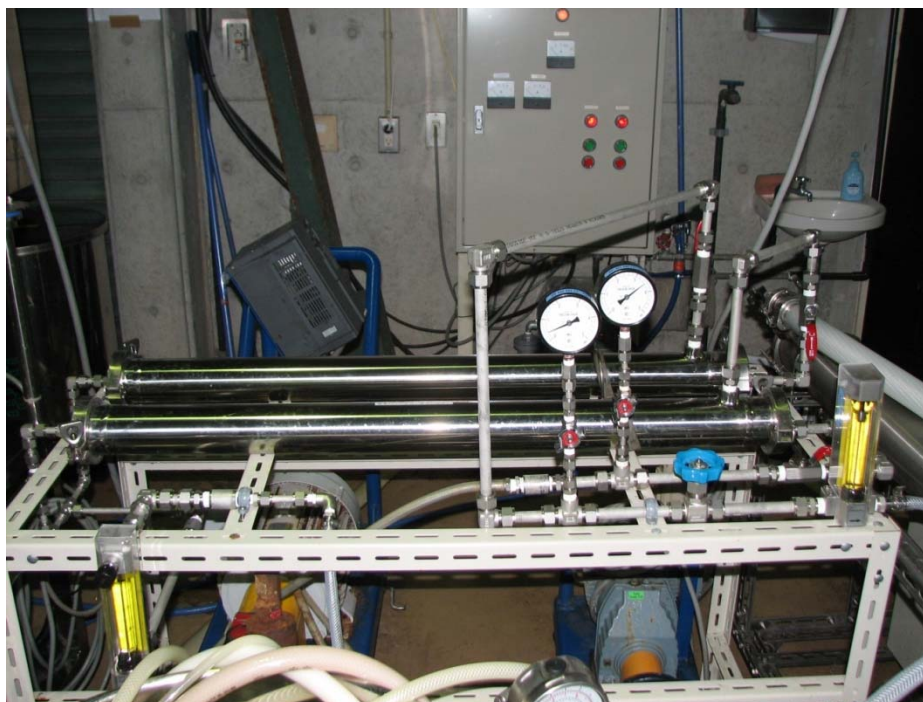


図9. 改良 600Da NF膜装置(写真)

表3. 改良前後の 600 Da NF膜処理によるClの品質比較

|           | 改良前   | 改良後   |
|-----------|-------|-------|
| Cl-7~12   | 14.0% | 35.4% |
| 灰 分       | 3.8%  | 7.5%  |
| 水 分       | 6.0%  | 3.6%  |
| 膜処理時間(hr) | 33L   | 52L   |

## 2-2: Cl転換酵素力価増強技術の確立

(担当:TTC、シーアイバイオ)

### (1)目的

本事業において、これまでにトロピカルテクノセンターで保管されている沖縄微生物ライブラリーや育種株等から、Cl転換酵素産生力の優れた菌株の選抜を試み、従来の菌株と比較して酵素力価の高い菌株を選抜することができた。この選抜した菌株により高い力価の酵素が生産可能であることがわかった。しかしながら、この選抜菌株は、培養方法や酵素生産方法に課題があることから、詳細にこれら条件を検討し最適化する必要がある。そこで、選抜菌株の培養や酵素生産の最適化・安定化を検討し、Clの生産最適化へ繋げることを試みた。

### (2)結果と考察

#### ①選抜菌株保存方法の検討

これまでの菌株の保存方法は、10%グリセリンまたはブルーデキストラン(BD)培地にて保存してきた。しかしながら、10%グリセリンでは復元が不安定なこと、BD 培地では復元に問題ないが特に選抜菌株において他の微生物のコンタミネーションが課題であった。そこで、選抜菌株に適した保存方法を検討した。その結果、図10-1より、菌株の増殖性は「10%グリセリン/-80℃保存」を除いて全て良好であった。また、培養液上清中のClTase 力価についても同様な結果となった(図10-2)。このことから選抜菌株に適した保存方法は、Cl生産の効率化やコスト削減、およびコンタミネーションのリスクも考慮すると、「培養懸濁液/-30℃保存」が望ましいと判断した。なお、従来法の「10%グリセリン/-80℃保存」は選抜菌株には適した保存方法ではないことが示唆されたので、「10%グリセリン/-80℃保存」での保存は望ましくないことがわかった。

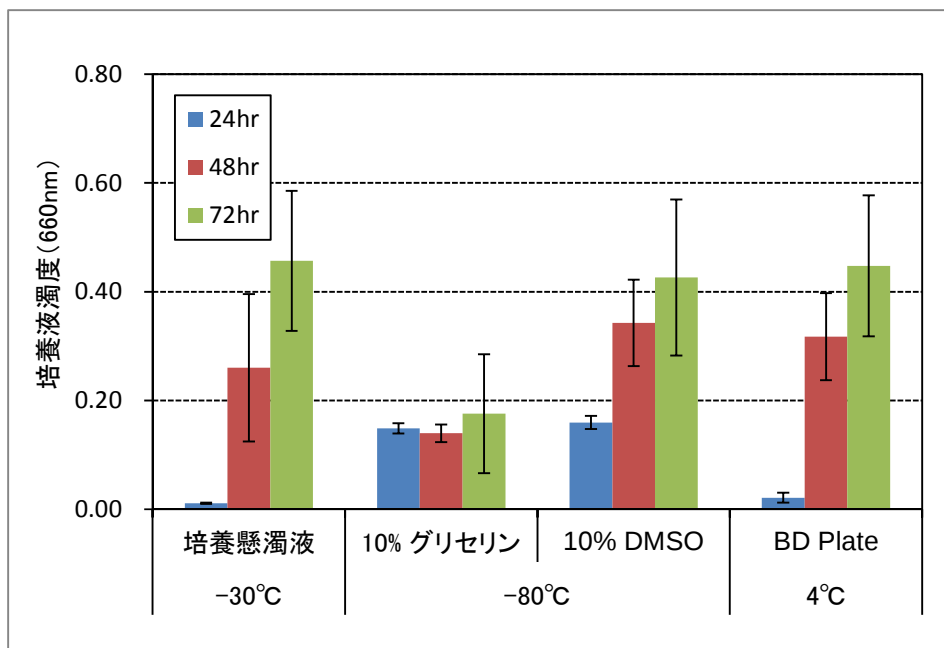


図10-1. 各保存方法における選抜菌株の生育について

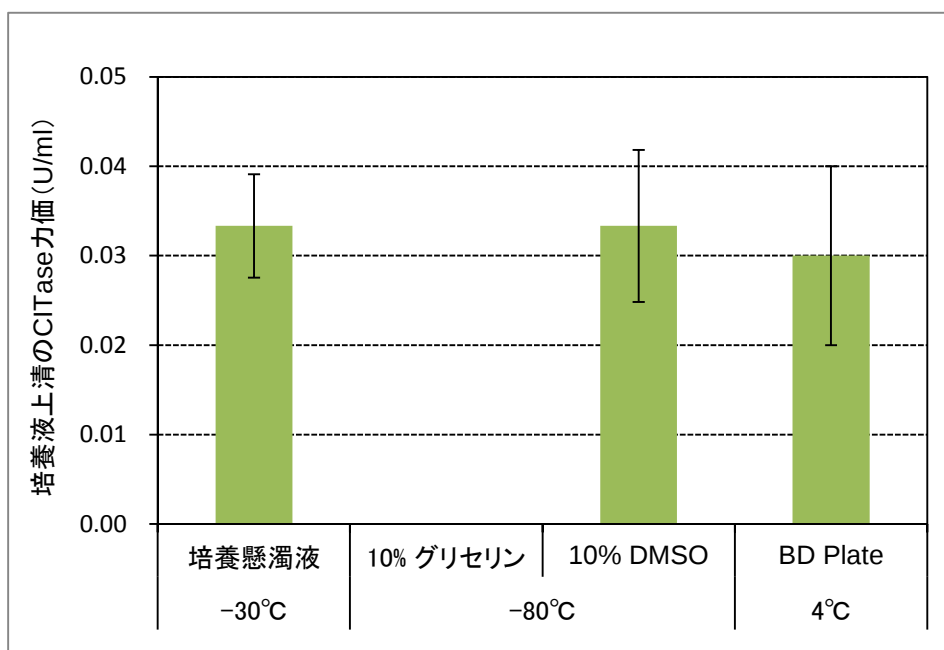


図10-2. 各保存方法における選抜菌株の CITase 力価について

## ②培養最適化および酵素生産安定化の検討

様々な培養条件にて試験を実施し、選抜菌株を用いた酵素生産の安定化検討を行った。その結果、新規法での培養条件が最も ClTase や DGase 力価が高く、従来培養法と比較して、ClTase や DGase 力価が 4 倍以上高いことがわかった(図11-1および2)。さらに、酵素の保存性を確認するため、各条件で培養した上清液を 4℃で保存し、経時的に ClTase や DGase 力価を測定した結果、新規法の条件では、ClTase 力価は少なくとも 35 日間は安定であったものの、DGase 力価(3 週間は安定)は激減する結果となった。新規法の条件での各培養ステージにおける選抜菌株の菌数を BD Plate を用いて評価したところ、前培養ステージから菌数が  $10^9$  cfu/ml を超えており、良好な生育を示していることがわかった(図11-3)。これらの結果から、新規法の条件を最適な培養・酵素生産条件として設定した。

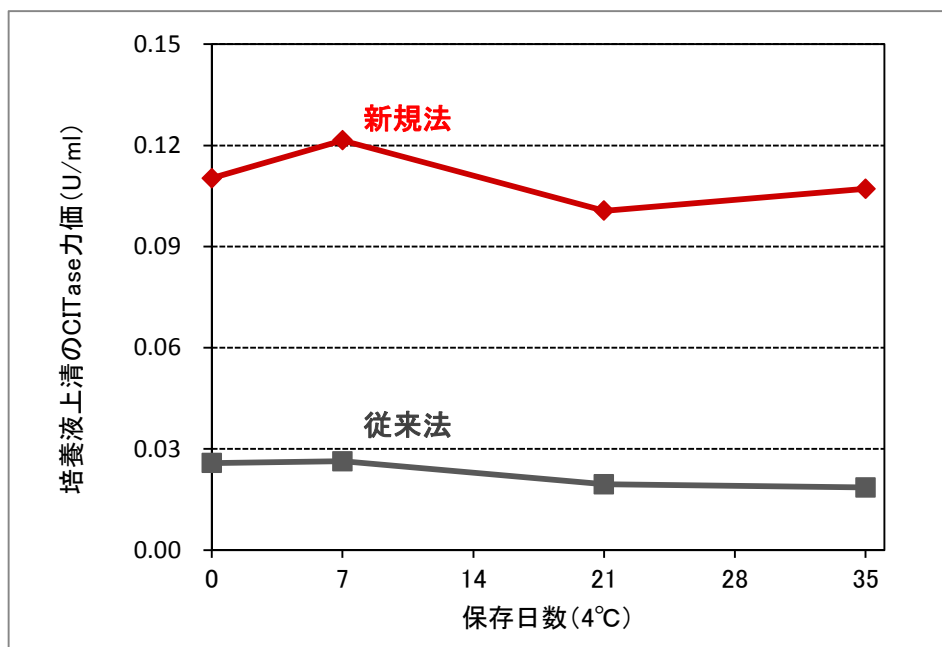


図11-1. 新規培養条件における ClTase の力価および安定性

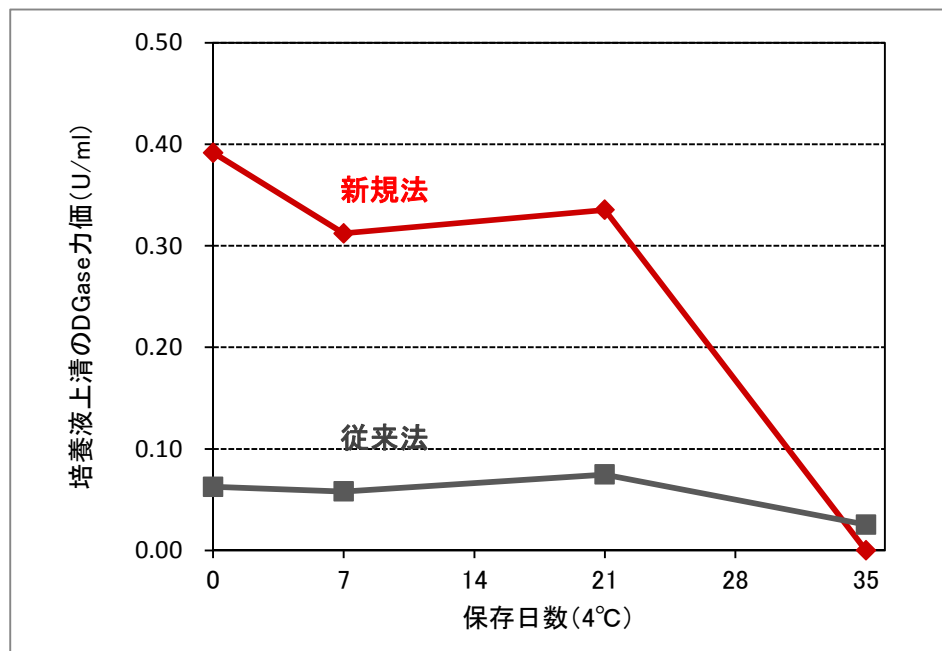


図11－2. 新規培養条件におけるDGase の力価および安定性

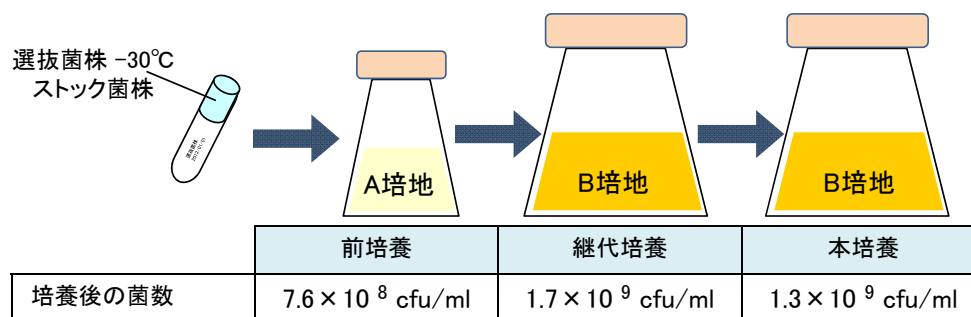


図11－3. 新規培養条件での選抜菌株の生育性について

### ③プラントスケールでの酵素生産実証試験

選抜菌株の最適な培養・酵素生産条件として、前ページで示した通り、新規法の条件に設定した。ここでは、この条件をジャーファーメンター(JFM)による酵素生産に応用を試みた。その結果、培養 40hr 付近より溶存酸素量(DO値)およびpHの低下が見られ、その後若干上昇した後、再び緩やかに低下する推移を示した(図12)。このことから選抜菌株は 40hr 付近より活発に増殖し、安定・死滅期を経た後、再び 60hr 以降より緩やかに増殖しているものと思われる。このDOやpHの推移を示した培養上清液の CiTase 力価を測定したところ、0.10 U/ ml あり、UF 膜にいて通常濃縮処理(6-10 倍)により 0.61 U/ml あることがわかった(表4)。このことから、新規法の条件をJFMに応用することで、60Lプラントスケール酵素生産においても、目標の 0.6 U/ml 以上を達成できた。なお、この条件において、培養上清液の CiTase 力価 0.6~1.0 U/ml が安定的に生産できることがわかった。

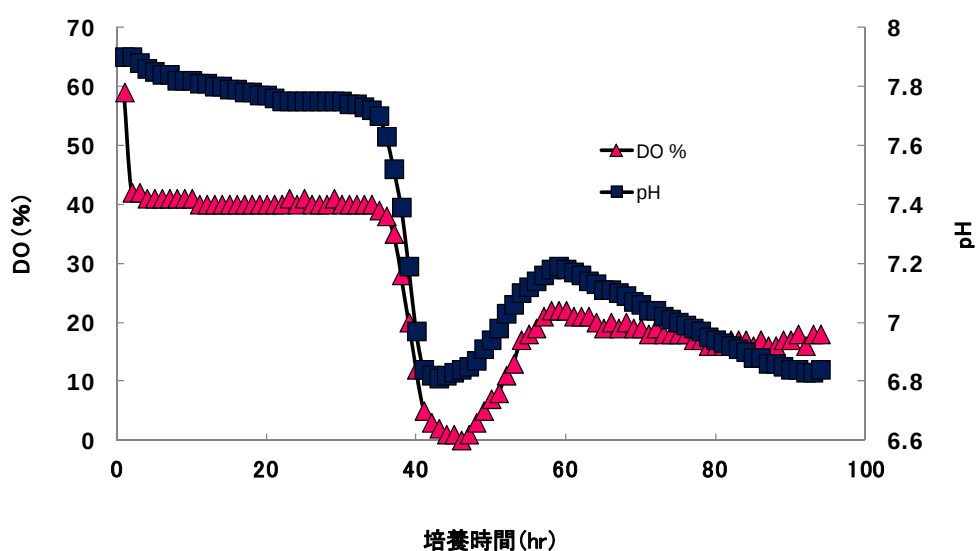


図12. JFMによる選抜菌株培養液のDOおよびpHの変化

表4. JFMで生産した培養液濃縮前後の CiTase 力価

|       | 酵素活性(U/ml) |
|-------|------------|
| 培養上清液 | 0.10       |
| 濃縮酵素液 | 0.61       |

#### ④酵素力価の安定性評価および安定化検討

選抜菌株由来酵素の力価増強および安定生産に向けて培養条件を検討したところ、培地や培養日数等の条件を最適化することで、高い力価の酵素を安定的に生産可能になった。しかしながら、JFMにおいてプラントスケールによる酵素生産において、高い力価の酵素は得られるものの、これまでの4℃保存では1週間以内に何らかの要因でCl生産性が激減することがしばしば見られた。そこで、ここではこれらの要因を明らかにし、新たな保存方法を検討した。考えられる要因として、雑菌、反応残渣、およびプロテアーゼがあるが、保存日数に応じて濁りや臭いが強くなっていたことから、これまで通り4℃保存を未処理として、-30℃凍結保存、フィルター滅菌(0.2 Filter)後に4℃保存し、経時的にサンプリングし、酵素力価や一般生菌数等を測定した。その結果、ClTase力価はどの処理条件においても安定しており問題なかった(図13-1)。一方、Cl生産性を評価したところ、未処理では保存日数に応じてCl濃度が低減していることがわかった(図13-2)。さらに、未処理で、DGase力価では保存10日後には激減し、一般生菌数が保存5日以降急激に上昇し、それに伴いpH低減が見られた(図13-3および4)このことから、雑菌増殖によりCl生産性が低減することが明らかとなった。そのため、MF膜処理による菌体処理後やUF膜処理による濃縮処理後のラインを滅菌処理しこれまで通り4℃保存するか、凍結保存により酵素安定性が保持可能であることが考えられる。

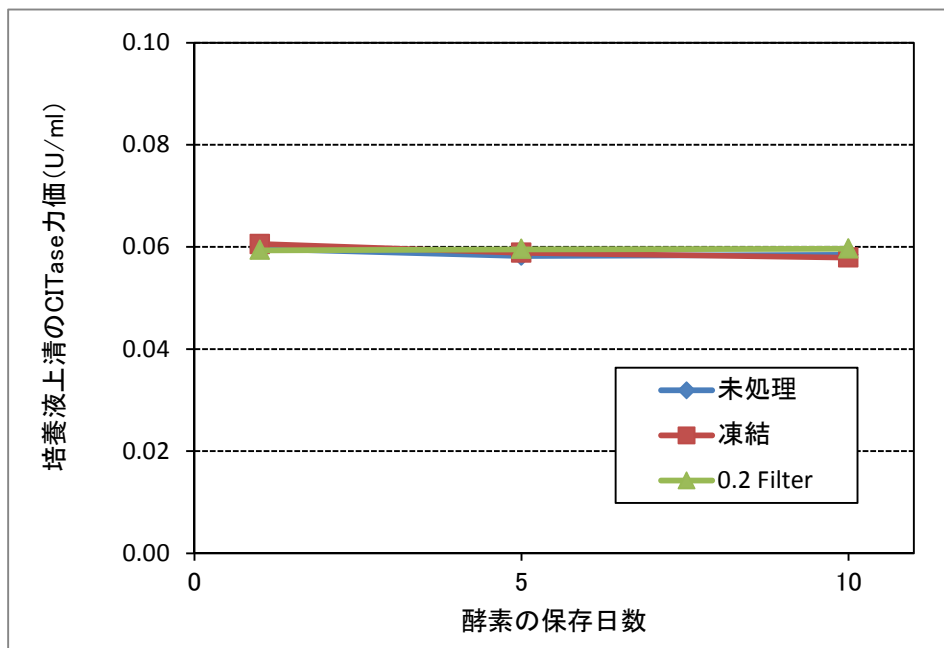


図13ー1. 各保存処理における選抜菌株由来酵素の CITase の力価および安定性

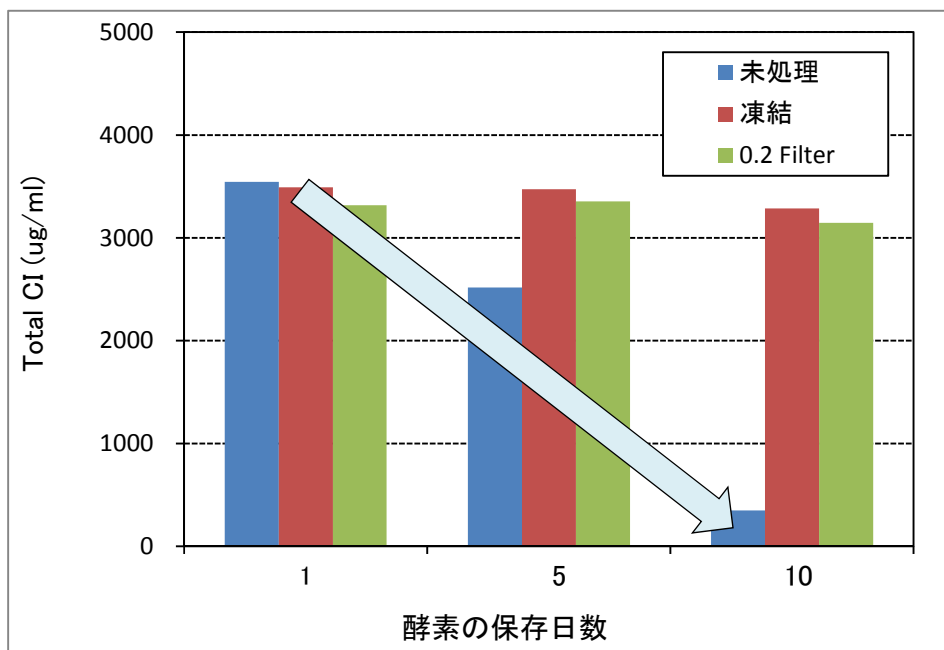


図13ー2. 各保存処理における選抜菌株由来酵素による CI 生産試験結果

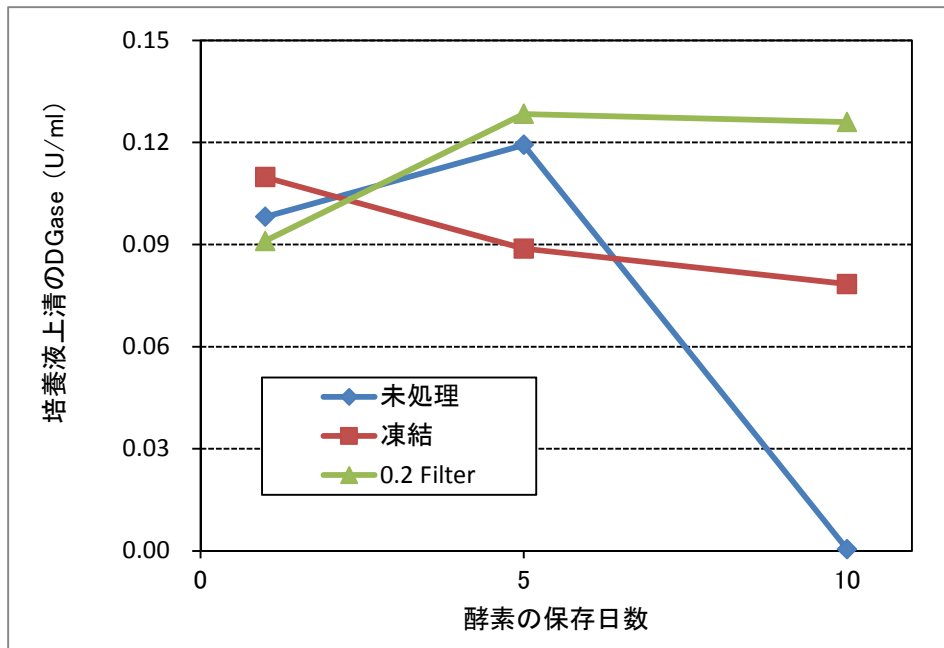


図13-3. 各保存処理における選抜菌株由来酵素の CITase の力価および安定性

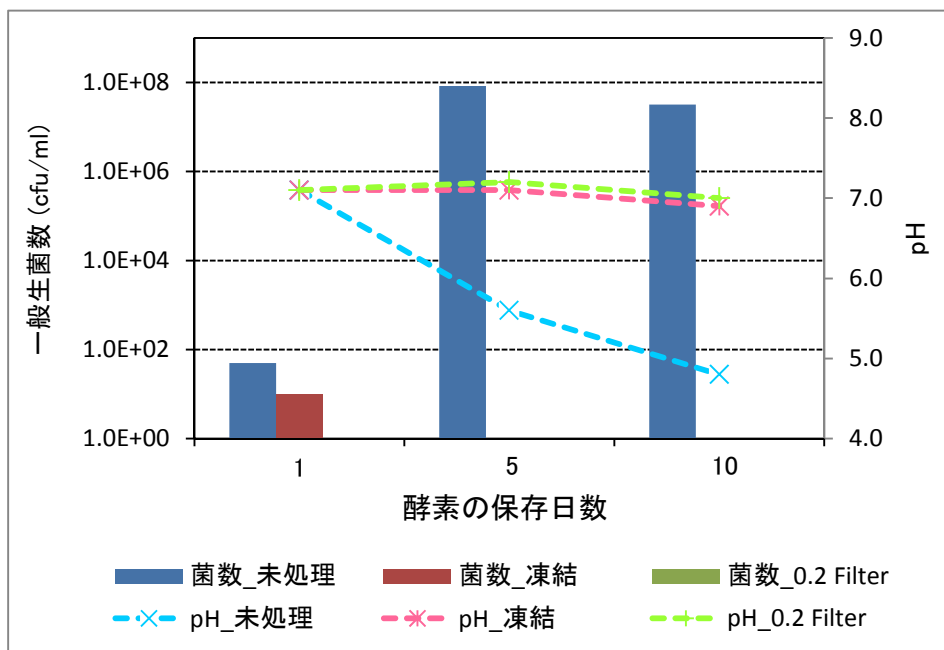


図13-4. 各保存処理における選抜菌株由来酵素の一般生菌数およびpHの変化

## 2-3. 高純度(高品質)Clの包接機能の解明

### 2-3-1: 味覚センサーによる包接機能の検証

(担当: TTC)

#### (1) 目的

製麩副産物(デンプン)から得られた高純度Clの包接機能を検証することを目的としている。ここでは、Cl生産・精製において最適化した条件で試作した純度Cl(純度 50%以上)を用いて、いくつかの食品素材や薬剤に混合して味の変化を味覚センサーにより分析し、既知包接剤(A 剤、B 剤、および C 剤)との違いを明らかにして優位性を見出すことを試みた。

#### (2) 結果と考察

##### ① 各種包接剤の味の比較

食品の味を、包接剤によって変化を見る際、包接剤そのものの味の影響が出てくる可能性が考えられる。そのため、初めに使用する各種包接剤の味を味覚センサーで評価した(味覚センサーの概要と測定の流れ(図14)、および測定した味項目(表5))。その結果、図15の通り、A 剤では他の包接剤と比較して渋味刺激、渋味の数値が高く出ており、官能的にも「イガイガ感」がするコメントがあり刺激性のある包接剤であることが示唆された。B 剤では他の包接剤と比較して大きな特徴は示していないが、官能的に濃度に応じて甘味が強くなる特徴を有した。C 剤は他の包接剤と比較して味には大きな特徴は見られなかった。一方、高純度Clは他の包接剤と比較して、酸味、塩味、および旨味の数値がやや高い値を示した。このことから、高純度Clの夾雑物として灰分がやや多かったことから、この灰分が塩味に影響した可能性がある。また酸味については、Buffer や微生物由来の酸が考えられ、今後も精製を改善することで無味に近い品質に近づける取り組みが必要と思われる。他の包接剤でも何らかの味は呈していることが味覚センサーや官能試験により明らかになっており、このような知見を踏まえた上で、沖縄特産食品や薬剤(漢方薬)を用いて包接機能の検証を試みた。

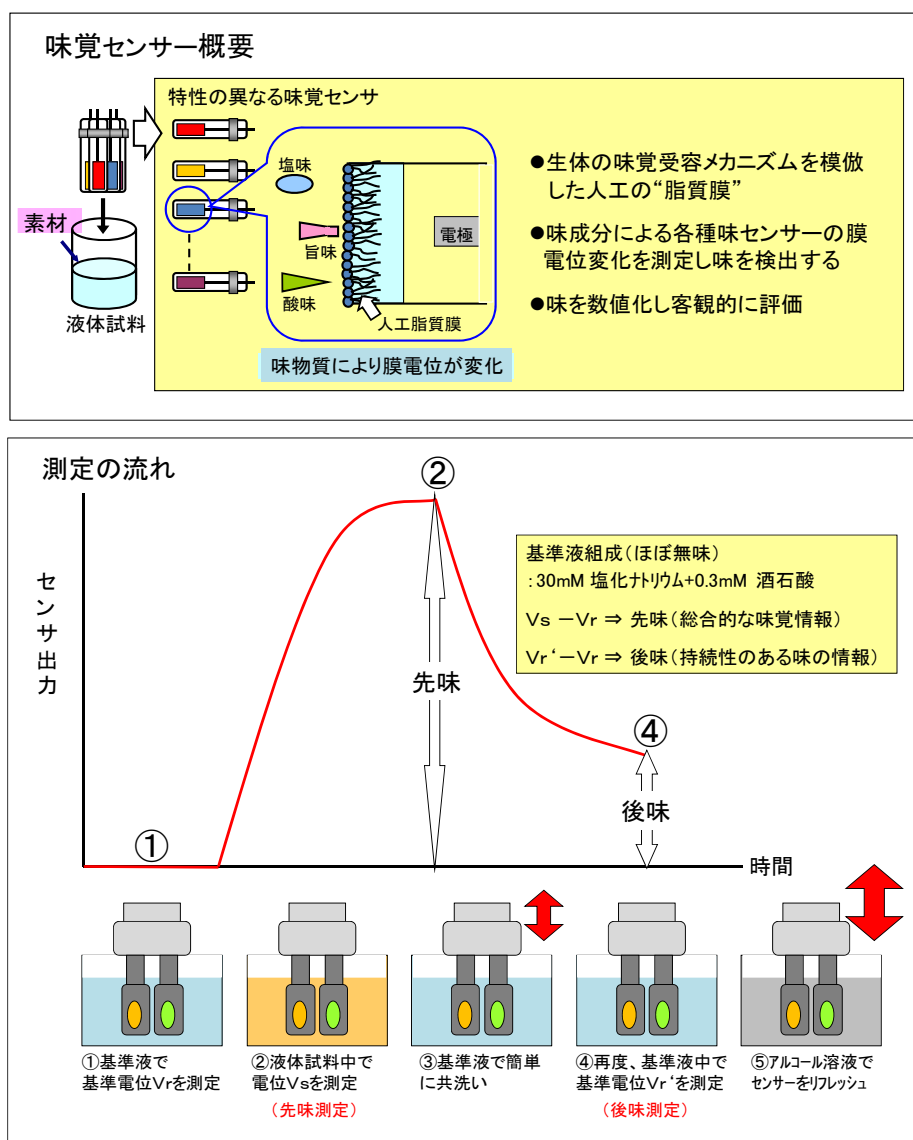


図14. 味覚センサーの概要と測定の流れ

表5. 各種味センサーについて

| センサー名  | 評価できる味                          |                       |
|--------|---------------------------------|-----------------------|
|        | 先味(相対値)                         | 後味(CPA値)              |
| 旨味センサー | 旨味(アミノ酸、核酸由来の旨味)                | 旨味コク(持続性のある旨味)        |
| 塩味センサー | 塩味(塩化ナトリウムなど無機塩の塩味)             | 無し                    |
| 酸味センサー | 酸味(酢酸、クエン酸、酒石酸などの酸味)            | 無し                    |
| 苦味センサー | 苦味雑味(苦味物質由来の苦味、雑味で、低濃度ではコク、隠し味) | 苦味(ビール、コーヒー等の一般食品の苦味) |
| 渋味センサー | 渋味刺激(渋味物質由来の刺激、雑味で、低濃度では隠し味)    | 渋味(お茶、ワイン等の渋味)        |

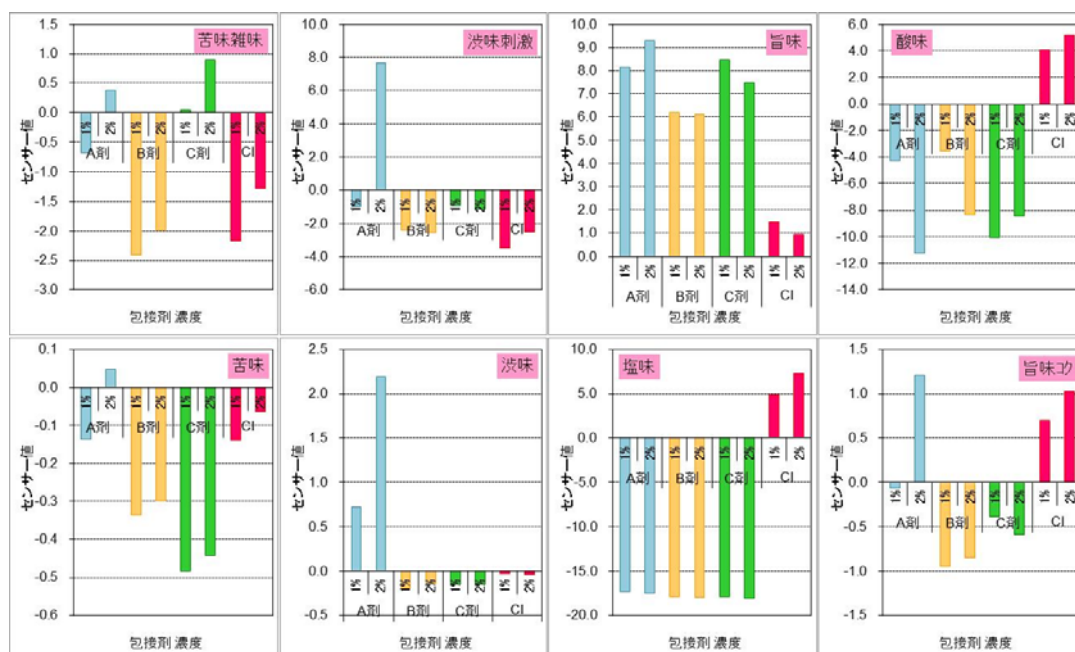


図15. 味覚センサーによる各種包接剤の味の測定結果

## ②高純度CIの包接特性について

本試験では、数種類の沖縄特産食品や漢方薬を素材として用い、高純度CI添加による味への影響を既知包接剤と比較して評価した。

酸味への影響：図16の結果は、ノニジュース、もろみ酢、およびシークワーサーを素材として用い、各種包接剤の添加により、味覚センサーにより酸味への応答性を評価した。その結果、既知包接剤では、添加量の応じて酸味が上昇するか、もしくは大きな変化が見られない結果であった。一方、高純度CIではノニジュースでは酸味が上昇、もろみ酢やシークワーサーでは酸味が低減した。このことから、包接剤とは異なる包接作用があることが示唆された。各素材で酸味主成分について、ノニジュースは乳酸、もろみ酢やシークワーサーはクエン酸となっており、高純度CIは有機酸の種類によって包接が異なる可能性も考えられ、興味深い結果となった。

渋味刺激への影響：上記と同様な素材を用いて図17では、渋味刺激への影響を調べた。渋味刺激は先味として認識される渋味であり、微量では隠し味として位置づけられている。渋味刺激では、各包接剤添加に応じて低減するか変化しないかのどちらかの結果であった。高純度CI添加では、他の包接剤と異なり、シークワーサーの渋味を低減することが明らかとなった。シークワーサーの渋味は皮や種に由来しており、これらは機能性や香りに起因する成分を含み重要な成分である。そのため、高純度CIの添加により渋味を軽減させた新たな機能性素材等の製品開発への応用にも期待できる。

漢方薬への苦味・渋味低減作用：ここでは、苦味や渋味の強い漢方薬に各包接剤を添加し、その影響について味覚センサーを用いて評価した。その結果、先味に関連する苦味や渋味つい

て、高純度CIで最も低減した(図18)。一方、後味に関連する苦味や渋味ではB剤およびC剤で最も低減することがわかった。製薬関連においては、苦味や渋味の低減した薬剤の需要が高まっている。高純度CIは既知包接剤とは異なる作用を示すことが示唆されたことから、製薬関連での応用も期待できる。また、既知包接剤との混合により、相乗効果も期待できる。

その他素材への苦味雑味低減作用：高純度CIは素材の苦味や渋味の低減効果が期待されたことから、他の素材でも評価した。図19より、素材として大麦若葉、フーチバー(ニシヨモギ)、ビール、ゴーヤー(ニガウリ)を用いた。その結果、高純度CIの添加により、ほとんどの素材の苦味雑味が低減することがわかった。一方、ゴーヤーについて、若干、苦味雑味が上昇する結果となった。

このように、高純度CIの包接特性について、既知包接剤とは異なる特性があることが明らかとなり、既知包接剤との優位性が示せた。CIの包接作用は、既知包接剤と比較して明らかにされていない点が多くあり、今後も様々な素材を用いて評価することで波及効果の期待できる極めて有用な素材であると思われる。

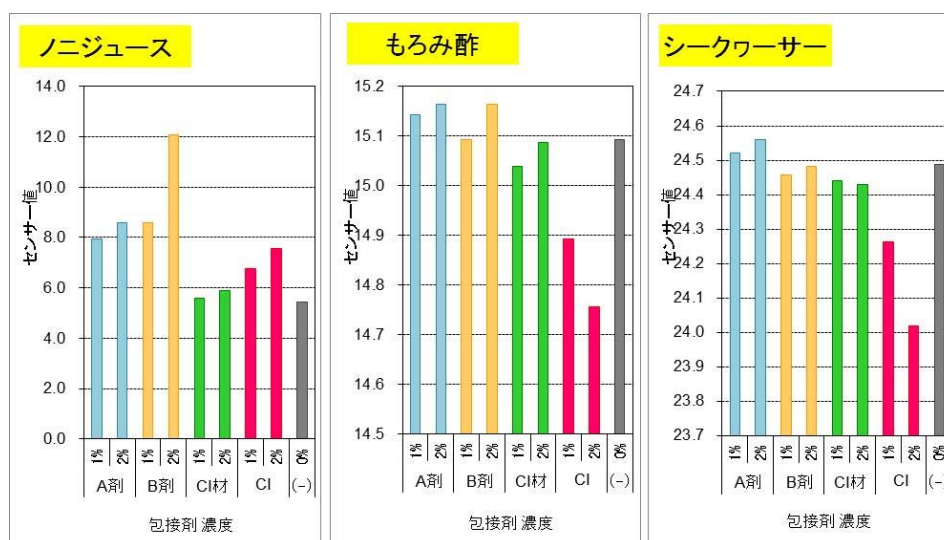


図16. 各包接剤による素材の酸味への影響

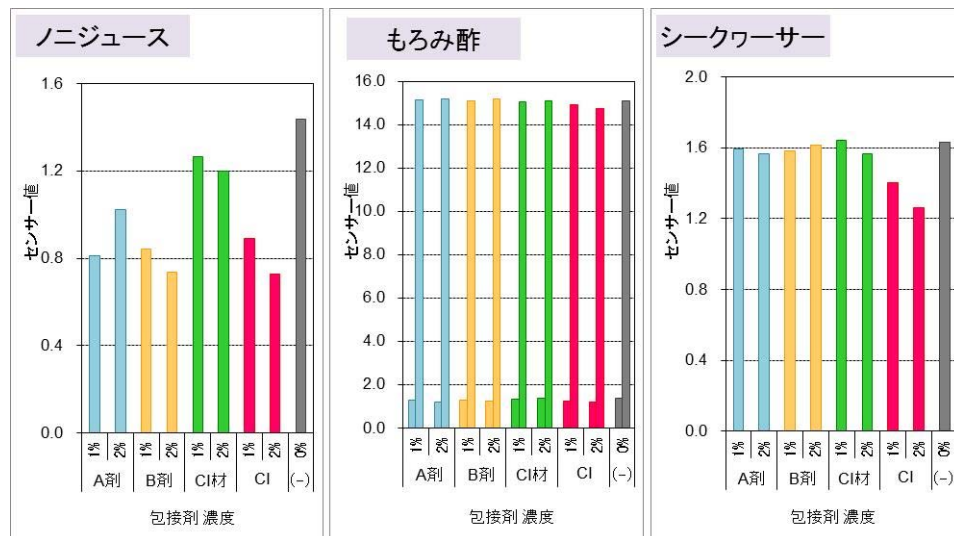


図17. 各包接剤による素材の渋味刺激への影響

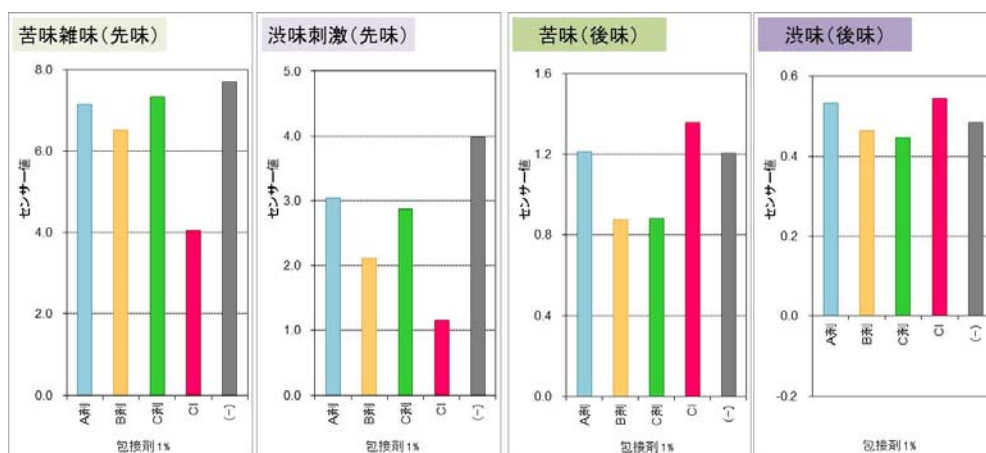


図18. 各包接剤の漢方薬の苦味・渋味軽減特性について

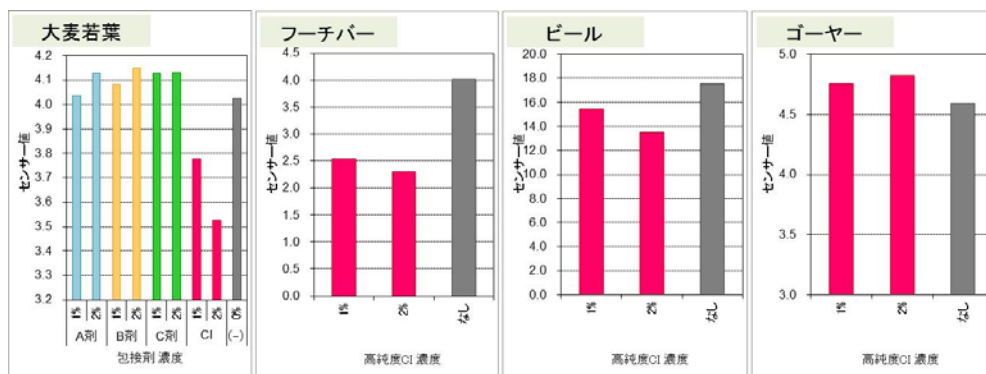


図19. 高純度CIの素材の苦味低減特性について

## 2-3-2: 高純度CIの包接機能の解明

(担当: 食総研)

### (1) 目的

サイクロデキストラン(環状イソマルトオリゴ糖、CI と省略)は、歯垢の形成を阻害する作用と、物質を取り込んで可溶化、安定化させる包接作用を有する。現時点で歯垢の形成阻害作用を生かした製品は実用化しているが、包接作用を生かした製品はまだ実用化していない。デキストランから製造された CI は低分子化したデキストランが製品に含まれるため、高濃度で使用すると粘性が出てくるという問題がある。また、包接能が高いと報告されている CI-10 および高分子の CI(L-CI)の量が少ない。そこで、高濃度にしても粘度があがらず、L-CI の含有量の高い包接剤に適した CI の調製法を検討する必要がある。22、23 年度の研究では環状イソマルトオリゴ糖グルカトランスフェラーゼ(CITase)と CI 生産菌から新規に分離したデキストラングルカナーゼ(DGase)を澱粉に作用させて CI を合成し、重合度 10 以上の L-CI を多く含む粗 L-CI と、カラム分離で調製した高純度の L-CI と重合度 7、8、9 の低分子 CI(S-CI)を調製し、シー・アイ・バイオ社製の CI-plus もあわせてこれら CI サンプルのピクトリアブルーBおよびイソフラボン的一种、ダイゼインの包接能を比較した。本研究で調製した CI 標品の純度も調べた。

### (2) 結果と考察

#### ① サイクロデキストラン標品の純度検定

サイクロデキストラン(環状イソマルトオリゴ糖、CI)は、図20に示すように、グルコースが環状に連なった構造で、グルコースの数により CI-n と表される。現在シー・アイ・バイオ株式会社より CI-7,8,9,10,11,12 が市販されている。CI-7~CI-12 は Amide-80(Tosoh)カラムを用いた HPLC 分析で図21のように分離される。2010 年度製 CI-Plus は CI-7~CI-16 が含まれていたが、CI の含有率は 17.3%と 2 倍程度に高まり、還元糖が 9.3%と 1/3 以下に減少していた(図22)。図23、図24に示すように今年度 TTC が調製した TTC-1 および、これをイオン交換樹脂処理した TTC-2 については、CI-7~CI-14 が含まれ、CI 含有率は順に 56.4%、54.4%と、いずれも目標の 50%以上を達成していることがわかった。

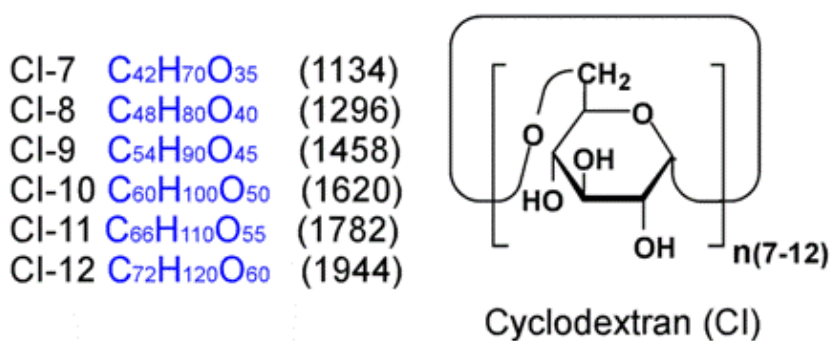


図20. サイクロデキストラン(CI-7,8,9,10,11,12) の分子式と構造

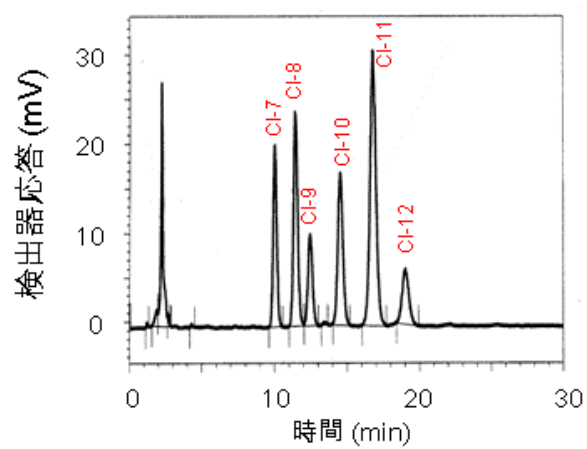
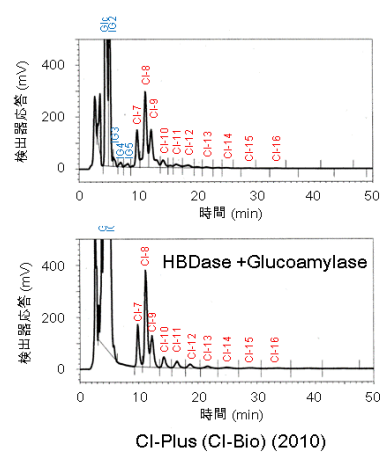
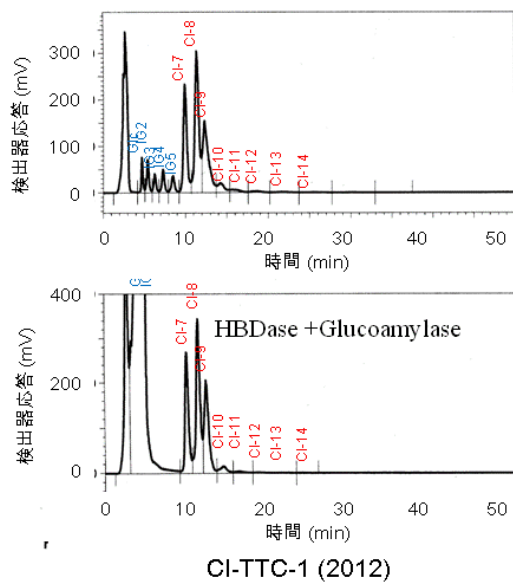


図21. CI-7,8,9,10,11,12 (高純度品) のHPLC(Amide-80 (Tosoh)カラム)分析



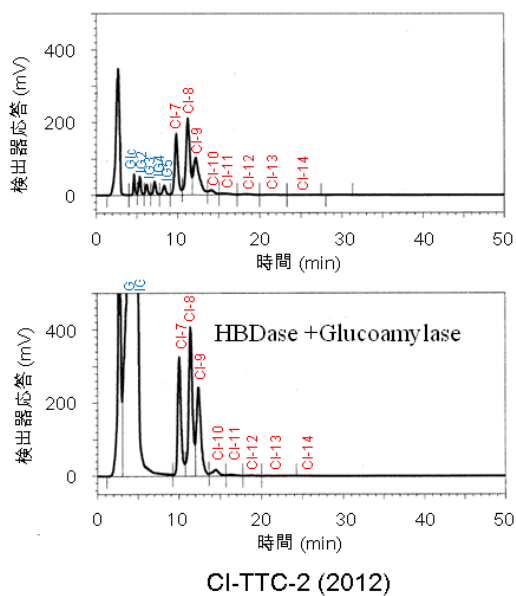
| C I          | 還元糖                          |
|--------------|------------------------------|
| CI-7 ~ CI-16 | グルコース<br>イソマルトオリゴ糖<br>デキストラン |
| 17.3%        | 9.3%                         |

図22. CI-Plus (シー・アイ・バイオ 2010 年度製)のHPLC(Amide-80 (Tosoh)カラム)分析



| CI         | 還元糖                          |
|------------|------------------------------|
| CI-7～CI-14 | グルコース<br>イソマルトオリゴ糖<br>デキストラン |
| 56.4%      | 38.3%                        |

図23. CI-TTC-1 (TTC 2012 年度製)のHPLC(Amide-80 (Tosoh)カラム)分析



| CI         | 還元糖                          |
|------------|------------------------------|
| CI-7～CI-14 | グルコース<br>イソマルトオリゴ糖<br>デキストラン |
| 54.4%      | 39.7%                        |

図24. CI-TTC-2 (カラム分離処理標品。TTC 2012 年度製)のHPLC(Amide-80 (Tosoh)カラム)分析

## 2-4. 安全性の確認

### 2-4-1:小麦デンプン由来サイクロデキストランのラットにおける急性経口毒性試験

(担当:TTC)

#### (1)目的

安全性評価の一環として、小麦澱粉由来サイクロデキストランをラットに単回経口投与したときの影響を確認した。

#### (2)結果

##### 2)-1 一般状態観察

小麦デンプン由来サイクロデキストラン 2000、1000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄いずれも投与後 14 日までに死亡は認められず、一般状態に異常は認められなかった。

##### 2)-2 体重

小麦デンプン由来サイクロデキストラン 2000 ならびに 1000 mg/kg 投与群と対照群の雌雄いずれも順調に推移した。

投与後 14 日までの観察期間を通じ、小麦デンプン由来サイクロデキストラン 2000 ならびに 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

##### 2)-3 剖検

小麦デンプン由来サイクロデキストラン 2000、1000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄いずれも異常は認められなかった。

#### (3)結 論

小麦デンプン由来サイクロデキストランをラット雌雄に 2000 および 1000mg/kg で単回経口投与した結果、死亡は認められず、一般状態および剖検所見に異常は認められなかった。また、投与後の体重推移について、溶媒を投与した対照群との間に有意差は認められなかった。

以上より、本試験条件下では小麦デンプン由来サイクロデキストラン投与による毒性兆候は認められず、最小致死量は雌雄いずれも 2000 mg/kg 以上と判断された。

## 2-4-2:

小麦デンプン由来サイクロデキストランのラットを用いた 28 日間経口亜急性毒性試験

(担当:TTC)

### (1)目的

安全性評価の一環として、小麦デンプン由来サイクロデキストランをラットに 28 日間反復経口投与したときの亜急性毒性の有無を確認する。

### (2)試験結果

#### 2)-1 一般状態観察

雄雌にいずれの例においても投与開始日から剖検日までに死亡は認められず、一般状態にも異常は認められなかった。

#### 2)-2 体 重

雄雌の投与群に投与による影響は認められず、対照群とほぼ同様の体重推移を示した。

#### 2)-3 摂餌量

雄雌ともに投与期間を通じ、有意な差は認められなかった。

#### 2)-4 血液学および血液生化学的検査

各個体において、剖検時に採取した血液および血清を用い、検査を実施した結果、雌のグループにおいて、高値を示して有意差が見られたが、その他の個体において有意な差は見られなかった。

#### 2)-5 臓器重量および相対重量

各個体において、剖検時に心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定した結果、雄で心臓の臓器重量ならびに相対重量で低値を示し、さらには肺および精巣の相対重量で高値な有意差がみられたが、その他の臓器において有意な差はみられなかった。

#### 4)-6 剖 検

雄について、1 群(溶媒)の 1 例(A.No.116)で精巣委縮(右)の所見を認めたが、その他の雄雌各個体に異常はみられなかった。

### (3) 考察および結論

6週間の雄雌SD系ラットに、小麦デンプン由来サイクロデキストランの500および1000mg/kgについて28日間連日反復経口投与し、亜急性毒性を検討した。

剖検を実施し血液ならびに各種臓器を摘出し毒性発現の有無を確認した。

その結果、一般状態、体重推移、摂餌量、血液学的検査および剖検所見では、被験物質の投与による異常は見られなかった。

臓器重量では雄の心臓、相体重量では心臓、肺および精巣で有意な差がみられたが、心臓については、1群(溶媒)に対し、2群(低用量)で低値を示す有意な差が認められたものの3群では有意な差が認められず、用量相関性が無いことから、被験物質投与による影響ではないと考えられた。

肺については、1群(溶媒)に対し、3群(高用量)で高値を示す有意な差が認められたが、臓器重量(湿重量)に有意差が認められなかったことから被験物質投与による影響ではないと考えられた。

精巣については、1群(溶媒)に対し、3群(高用量)で高値を示す有意な差が認められたが、1群(溶媒)の1例(A.No.116)で精巣委縮(右)の所見を認めたために、平均値が低下したことで有意な差が認められたと考えられ、被験物質による影響ではないと考えられた。

血液生化学的検査については、雌2群(低用量)でグルコースの高値を示したが、用量相関性が無いことから、被験物質の投与による毒性変化ではないと考えられた。

以上のように、小麦デンプン由来サイクロデキストランを500および1000mg/kgの用量で反復投与を行っても、生体の機能および形態の毒性変化は認められなかった。

従って、本試験条件下における、小麦デンプン由来サイクロデキストランの無影響量は、雄雌ともに1000mg/kg以上と推定された。