

氏 名(本籍) 向 井 孝 夫

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 4 0 2 号

学位授与年月日 平 成 2 年 3 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 畜産学専攻

学位論文題目 乳酸菌 *Lactobacillus kefiranofaciens* により生産される多糖ケフィランの化学構造の解明とその利用性に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 伊藤 敏敏

教授 堀口 雅昭

教授 大久保一良

論文内容要旨

緒論

ケフィールは、山羊乳、羊乳、牛乳からケフィール粒をスターターとして製造されるソ連コーカサス地方原産の伝統的なアルコール発酵乳である。ケフィール粒は、白色の弾力性のあるカリフラワー状の外観をしており、乳酸菌と酵母が、乳酸菌の生産する多糖によりタンパク質とともに接着させられて出来上がった菌塊である。この多糖は、すでにケフィランと命名され、Kooimanによりその主要構造も提出されている。しかしながら、最近、戸羽らは、ケフィール粒から多糖を抽出しメチル化分析を行ったところ、Kooimanの提出した構造には見られない C-6位置換Galの存在を認めた。この結果は、ケフィラン中に新規な構造が存在することを示唆するものである。そこで本研究ではまず第一に疑問視されたケフィランの構造を明らかにするために、ケフィール粒から多糖を分離しその完全構造を解明することを目的とした。

一方、ケフィール粒からは数種の多糖生産菌が分離されているが、戸羽らによって分離された新種の莢膜性多糖生産乳酸菌 *L. kefiranofaciens* が、ケフィラン生産菌であると考えられている。そこで第二に、*L. kefiranofaciens* の生産する多糖の化学構造を明らかにし、ケフィール粒多糖の化学構造と比較することにより、ケフィール粒中における *L. kefiranofaciens* の存在意義を明らかにすることを目的とした。

さらに、本研究においてケフィランがアルコール存在下でゲル化するという興味ある現象を見出だした。ケフィランが、抗腫瘍活性を有しているという報告もあり、新しい食品安定剤として期待できるものである。そこで第三に、ケフィランの利用性を開拓するために、ケフィランの物性を明らかにするとともに、その誘導体を合成し、それらの機能特性を検討した。

第1章 ケフィール粒から分離した多糖の性質とその化学構造

第1節 ケフィール粒の生産条件の改良

ケフィール粒から大量の多糖を得るために、ケフィール粒を大量かつ迅速に得る方法を検討した。すなわち、10%還元脱脂乳に炭酸カルシウムの添加ならびに振盪

培養の増殖に対する影響を検討した (Table 1)。振盪培養は、ケフィール粒の重量増加に好影響をもたらしたが、培地の著しいホエー分離を引き起こし、ケフィール粒の回収を困難にするものであった。一方、培地への炭酸カルシウムの添加は、ケフィール粒の顕著な重量増加を引き起こしたが、化学組成および菌叢には、著しい影響は示さなかった。以上のことより、ケフィール粒による多糖の生産条件の改良法として、10%還元脱脂乳に0.5%炭酸カルシウムを添加することが最も有効であると結論した。

第2節 ケフィール粒から分離した多糖の化学構造

ケフィール粒から多糖を熱水により抽出し、エタノール沈澱を繰り返すことによって精製した。本多糖の糖組成は、Glc:Gal=1.0:0.9であり、 $[\alpha]_D^{20}=+50.5^\circ$ (c, 0.1)であった。本多糖中の構成糖間の結合位置は、メチル化分析によって決定した (Fig. 1)。その結果、C-6位置換Galの糖残基が他の糖残基の約20%存在することが示され、ケフィール粒多糖中に Kooimanが提出したケフィランの構造とは異なった構造が存在することが強く示唆された。

本多糖の結合配列は、*Trichoderma reesei*由来のセルラーゼを作用させて、得られた少糖の構造を解明することにより決定した。すなわち、本多糖に上記セルラーゼを作用させるとGlcおよび少糖 (OS)が遊離した (Fig. 2)。OSの構造は、メチル化分析および ^{13}C -NMR分析 (Fig. 3)によって決定した。

以上のOSの構造およびセルラーゼの作用機序から、ケフィール粒から分離した多糖の主要構造をFig. 4のように決定した。本多糖のメチル化分析の結果その存在が示されたC-6位置換Galは、Fig. 4 に示した構造には存在せず、ケフィール粒多糖の化学構造の微視的不均一性が示唆された。

第3節 ケフィール粒から分離した多糖中のC-6位置換Galの常在性

ケフィール粒多糖中に存在するC-6位置換Galを多く含む多糖画分を得るために、数種の方法でケフィール粒多糖を分画することを試みた。

本多糖をゲル濾過モードのHPLC分析に供すると、F-1~F-4の4本のピークが検出され、それぞれの画分を分取し、メチル化分析に供した (Table 2)。その結果、C-6位置換Galは、全ての画分に約30%存在し、F-1~F-4画分に差異は見られなかった。

一方、ケフィール粒多糖のエタノールによる溶媒分画を試みた。得られた画分 E-1~E-3をメチル化分析に供した結果がTable 3であり、C-6位置換Galは、全ての画分に約25%存在することが示された。

以上の結果は、第2節で明らかとなったC-6位置換Galがケフィール粒多糖の特定部位に局在するのではなく、繰り返し構造として組み込まれていることを強く示唆するものであった。

第2章 *L. kefiranofaciens* により生産される莢膜性多糖の性質とその化学構造

第1節 *L. kefiranofaciens*により生産される莢膜性多糖の主要構造

ケフィール粒には、多くの微生物が共棲しているため複数の多糖が混在していることが考えられる。そこで本節では、ケフィール粒から新たに分離された多糖生産菌である *L. kefiranofaciens* の多糖の構造を検討した。

本多糖の糖組成は、Glc:Gal=1.0:1.2であり、 $[\alpha]_D^{20}=+54.5^\circ$ (c, 0.1)であった。分子量はゲル濾過の結果、100万前後と推定され、電気泳動的に均一な多糖であった。本多糖中の構成糖間の結合位置は、メチル化分析により決定した(Fig.5)。その結果、ケフィール粒多糖と同様な結果が得られ、C-6位置換Galも他の糖残基の20%前後存在することが示された。本多糖の構成糖の結合配列を決定するために、*T. reesei* 由来セルラーゼを用いて酵素消化した。Glc、Galおよび少糖(K-5)がそれぞれ1.0:0.3:0.9 (mol/mol/mol)の割合で遊離した(Fig.6)。特にGalが遊離してきたことが注目され、そのモル比から遊離したGalは、C-6位置換Galに相当するものと考えられた。K-5の化学構造は、メチル化分析、 ^{13}C -NMRおよび部分酸加水分解により決定した。以上の結果、*L. kefiranofaciens* 多糖にセルラーゼを作用させ遊離した少糖の化学構造は、ケフィール粒多糖から得られた五糖のそれと完全に一致することが明確になった。すなわち、*L. kefiranofaciens* 多糖の生産する莢膜性多糖の主要構造がケフィランに一致することが示された。

第2節 *L. kefiranofaciens*により生産される莢膜性多糖中のC-6位置換Galの存在部位の決定

前節において本多糖を市販セルラーゼにより分解した結果、Galが遊離したことは、本酵素に β -ガラクトシダーゼが混在していることを示唆するものであった。そこで本節では、本章で用いた市販セルラーゼの酵素特性を検討した。本酵素の各糖質分解酵素活性を測定した結果、endo- β -1,4-グルカナーゼ活性のほかに各exo型の糖質分解酵素活性を有していた (Table 4)。そこで、本酵素をイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した結果、endo- β -1,4-グルカナーゼ活性を有するピークが2本得られ (I, II)、それぞれの画分のexo型の糖質分解酵素活性は極端に低下した (Table 4)。これらの精製酵素を本多糖に作用させた結果、I画分において、Galが遊離する代わりに新たに六糖が遊離した。この結果は、前節において構造を解明した五糖にC-6位置換Galが隣接することを強く示唆するものであった。

以上の結果から、*L. kefiranofaciens*が生産する莢膜性多糖中のC-6位置換Galの存在部位の化学構造をFig. 7のように決定した。

第3章 ケフィランの利用性に関する研究

第1節 ケフィランの溶液物性

ケフィラン溶液は広範囲なpHで安定な粘度を示したが、溶媒にホウ酸を含む場合は、pH8.7付近で急激な粘度の上昇が示された。また、ケフィランは溶液中でランダムコイル構造をとっていることが示された。

第2節 ケフィランゲルの物性

本研究において、ケフィランはアルコール存在下で Fig. 8に示したようなゲル (以降ケフィランゲルと呼ぶ) を形成することが認められたので、本節では、ケフィランゲルの2,3のレオロジー特性を検討した。

ケフィランゲルは、エタノールの代わりにエチレングリコールを添加してもゲルが形成されること (Fig. 9) および ケフィランゲルは尿素を添加することによりゲルを形成しなくなることから、ケフィランゲルの形成に水素結合が関与しているこ

とが推定された。また、ケフィランゲルは既存のκ-カラゲナンゲルやゼラチンゲルより柔らかく脆いゲルであることが示された。一方、ケフィランゲルにカゼインを添加するとそのゲル強度は、1.6~3.8倍となった。また、カゼインの添加によってエタノールを添加しなくともゲルが形成したので、エタノールを添加しなくとも適切な添加物の選択により実用的な硬さを持つケフィランゲルを調製できる可能性が示された。さらに、これらの結果とケフィール粒の形成機構との関連性が示唆された。

第3節 ケフィランの化学修飾

ケフィランの用途を拡大するために、ケフィランの構造変換を行うことを目的とし、カルボキシメチル(CM)化および硫酸化を行った。

ケフィランおよび各誘導体の濃度に対する動粘度をFig. 10に示した。0.2%の濃度においてCM-ケフィランは他の試料の8倍以上の粘度の増加が認められ、化学修飾の有効性が示された。さらに、ケフィラン誘導体が、マウス皮内に移植したSarcoma 180固形腫瘍に与える影響を調べたところ、CM-ケフィランおよび硫酸ケフィランにおいて最高64.4%の腫瘍抑制率が示された(Table 5)。

総括

ケフィール粒を構成している多糖ケフィランは、既に報告されている主要構造以外にC-6位置換Galを含む構造が存在し、さらにその部位は、繰り返し構造として均一に組み込まれていることが示された。

ケフィール粒から分離された新種の乳酸菌 *L. kefiranofaciens*の生産する多糖の化学構造を¹³C-NMR, GC-MSなどの機器分析を用いて解析したところ、その主要構造はケフィール粒から分離した多糖のそれと一致した。この結果は、*L. kefiranofaciens*が、ケフィール粒を構成する多糖ケフィランの生産菌であることを示すものであり、ケフィランの発酵生産を可能にするものであった。さらに、C-6位置換Galを含む構造を検討した結果、Fig. 7に示した構造が主要構造3単位に1単位の割合で均一に組み込まれていることが明らかとなった。この結果は、以前提出されたケフィランの化学構造を一部訂正すると共に、乳用乳酸菌の生産する多糖の完全構造を初めて明らかにするものであった。

ケフィランの利用性を拡大するために物性を検討したところ、ケフィランは溶液

中でランダムコイル構造をとっていることが示された。さらに、ケフィランは、エタノール存在下でゲル化することが見いだされ、その形成機構には水素結合が関与していることが推定された。一方、ケフィランゲルのレオロジー特性を検討したところ、 κ -カラゲナンゲルやゼラチンゲルよりは柔らかく脆いゲルであった。ケフィランからCM-ケフィランおよび硫酸ケフィランを合成し、物性、生理活性などの機能特性を検索した結果、ケフィランの化学修飾の有効性が示唆された。

Table 1
Effect of calcium carbonate addition and shaking on weight increase of kefir grain.

CaCO ₃ (%)	Shaking	Weight increase of kefir grain* after 10 days* (%)
-	-	310
0.2	-	320
0.5	-	450
1.0	-	350
-	+	370
0.5	+	550

* Serially transferred into skim milk everyday.



1. Standard sugar (β -cyclodextrin hydrolysates)
2. Hydrolysates of kefir grain polysaccharide

Fig. 2
TLC of oligosaccharide released from kefir grain polysaccharide during hydrolysis by *T. reesei* cellulase.

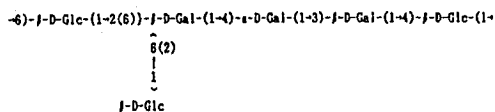


Fig. 4
The chemical structure of polysaccharide from kefir grain.

Table 2
Methylation analysis* of kefiran fractions (F-1~F-4)

Mode of linkage	kefiran	F-1	F-2	F-3	F-4
Glc1-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
-4Gal1-	1.23	1.20	1.25	1.23	1.06
-4Glc1-	1.21	1.64	1.70	1.63	1.39
-3Gal1-	1.31	1.20	1.28	1.46	1.90
-6Glc1-	1.26	1.56	1.57	1.53	1.43
-6Gal1-	0.20	0.37	0.34	0.34	0.33
-2,6Gal1-	1.15	1.26	1.25	1.25	1.16

*Methylation analysis was performed by GC-MS as partially methylated alditol acetates derived from acid hydrolysate of permethylated polysaccharide F1~F4.

Methylated sugar	Molar ratio	mode of linkage
1 1,5-Ac ₂ -2,3,4,6-Ne ₄ -Glcitol	1.00	Glc(1-
2 1,4,5-Ac ₂ -2,3,6-Ne ₃ -Galactitol	1.23	-4)-Gal-(1-
3 1,4,5-Ac ₂ -2,3,6-Ne ₃ -Glcitol	1.21	-4)-Glc-(1-
4 1,3,5-Ac ₂ -2,4,6-Ne ₃ -Glcitol	1.31	-3)-Gal-(1-
5 1,3,5-Ac ₂ -2,3,4-Ne ₃ -Glcitol	1.26	-6)-Glc-(1-
6 1,5,6-Ac ₂ -2,3,4-Ne ₃ -Galactitol	0.20	-6)-Gal-(1-
8 1,2,5,6-Ac ₄ -3,4-Ne ₂ -Galactitol	1.15	-2,6)-Gal-(1-

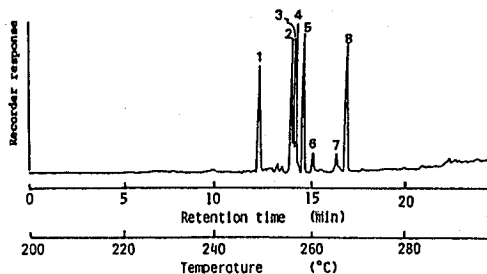


Fig. 1
GC-MS of partially methylated alditol acetates derived from acid hydrolysate of permethylated polysaccharide from kefir grain.

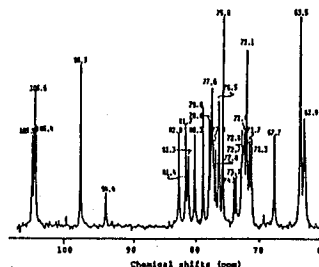
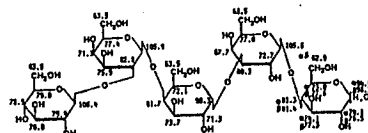


Fig. 3
¹³C-NMR spectrum of oligosaccharide released from kefir grain polysaccharide during hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulase.

Table 3
Methylation analysis* of kefiran fractions (E-1~E-3)

Mode of linkage	kefiran	E-1 ^b	E-2 ^b	E-3 ^b
Glc1-	1.00	1.00	1.00	1.00
-4Gal1-	1.23	1.10	1.25	1.13
-4Glc1-	1.21	1.20	1.10	1.05
-3Gal1-	1.31	1.46	1.20	1.27
-6Glc1-	1.26	1.16	1.27	1.13
-6Gal1-	0.20	0.23	0.27	0.18
-2,6Gal1-	1.15	1.15	1.23	1.25

*Methylation analysis was performed by GC-MS as partially methylated alditol acetates derived from acid hydrolysate of permethylated polysaccharide E-1~E-3.

^bPrecipitate obtained from kefiran solution by addition of 10% ethanol (E-1), or 20% ethanol (E-2), or 30% ethanol (E-3).

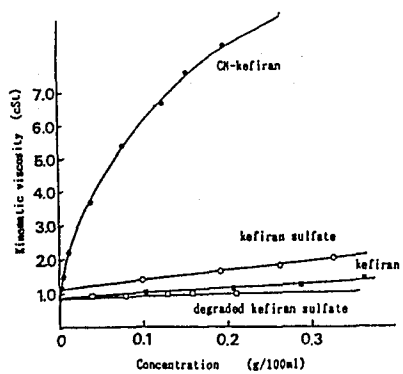


Fig. 10
Kinematic viscosity of kefiran, CM-kefiran
and kefiran sulfate at different concentrations.

Table 5
Effect of kefiran derivatives on solid Sarcoma-180 in mice

Group	No. of mice	Dose (mg/Kg, i.p.)	Tumor weight on day 28 (g. mean \pm S. D.)	Inhibition ratio (%)
Native kefiran	8	1	2.75 \pm 0.93	15.6
	8	10	2.28 \pm 1.08	30.1
CM-kefiran (D.S.=0.77)	8	1	1.01 \pm 1.03	52.4*
	9	10	1.31 \pm 1.35	38.2
	8	50	0.96 \pm 0.69	54.7*
Kefiran sulfate (D.S.=0.70)	7	1	3.38 \pm 2.20	-3.6
	8	10	2.05 \pm 1.16	37.1
Kefiran sulfate (D.S.=0.31)	8	1	2.73 \pm 1.66	16.3
	9	10	1.16 \pm 1.24	64.4*
Control	12	0	3.26 \pm 1.53	0

* P < 0.05 (difference from control, student's t-test)

審査結果の要旨

ケフィールはソ連コーカサス地方原産のアルコールを含む伝統的な発酵乳であり、近年我が国でも市販されるようになってきている。ケフィール中では乳酸菌の生産する多糖によって酵母が接着されてケフィール粒とよばれる菌塊が形成される。本論文はこの多糖ケフィランの化学構造と物性に関して検討を加えたものである。

まず、ケフィール粒の生産性の向上について検討し、培地に炭酸カルシウムを添加することが有効であることを知った。ケフィール粒から熱水抽出した多糖の構造の中には、従来報告されていなかったC-6位置換ガラクトースの存在が示唆されていたことから、化学構造について、機器分析を中心とした詳細な検討を行い、従来の構造の修正を行った。

次に、ケフィールより単離された*L. kefiranofaciens*の作る多糖と、ケフィール粒より抽出される多糖の構造の相同性を、構造解析によって比較し、両者が同一成分であることを明らかにした。即ち、ケフィール中で多糖ケフィランを生成する乳酸菌は、*L. kefiranofaciens*であることを明らかにした。

次に、ケフィランがエタノールの添加によってゲルを形成することを見出し、食品添加物として利用できる可能性が考えられたことから、その溶液物性を調べると共に、ケフィランのカルボキシメチル化誘導体、硫酸化誘導体を作製して、それらの物性について比較検討した。また、これらケフィラン誘導体の腫瘍抑制効果についても検討し、弱いながらも抗腫瘍効果のあることを見出した。

以上の結果は、発酵乳ケフィール中に生成する多糖の構造的特徴を明確なものにすると共に、その物性ならびに生理的効果について知見を加えることにより、利用性の向上に貢献するものと考えられる。よって、農学博士の学位を授与するに値するものと判断した。