

有用糖質の酵素合成の現況

北畑寿美雄・山下亜希子・橋本博之

信州大学農学部 応用生命科学科 糖質科学研究室

要約 1970年代以降、加水分解酵素や糖転移酵素などの各種糖質関連酵素が新たに見だされてきた。これら酵素の糖転移作用ならびに縮合反応を利用して、カップリングシュガー、トレハロース、フラクトオリゴ糖、パラチノース、乳果オリゴ糖およびガラクトオリゴ糖などの新規オリゴ糖が開発され、大量生産されてきた。これら糖質の機能についての研究も活発に行われ、低カロリー、非う蝕性、抗う蝕性、ビフィズス菌選択増殖活性などの機能が明らかにされた。1991年、厚生省の認可による「特定保健用食品」制度が設けられた。本稿では現在、市販されている糖質および現在開発中の有用糖質の合成、性質および利用用途について解説する。

キーワード：有用糖質、酵素合成、糖質の機能、オリゴ糖

1. はじめに

糖質は地球上に最も多量に分布している有機化合物で、炭素分子と水分子から構成されており、炭水化物とも呼ばれる。糖質はタンパク質および脂質と並んで三大栄養素の一つで、重要なエネルギー源として昔から食品素材として使われてきている。糖質はその分子の大きさから、ブドウ糖や果糖のような単糖類、ショ糖や乳糖のように単糖が2-10個程度結合したオリゴ糖、デンプンのような単糖類が数十から数百分子結合した多糖類、さらにメチル-グルコシドのように糖と非糖成分（アグリコン）が結合した配糖体に分類される。

糖質の機能は大きく三つに分けられる。栄養源としての機能（一次機能）、味覚、嗅覚、視覚および触圧覚に訴える、いわゆる趣向品としての機能（二次機能）、さらに健康の維持・増進に関与する機能（三次機能、生体調節機能）である。

近年、高齢化社会の到来とともに生活習慣病が社会的問題としてクローズアップされ、食品に健康の維持・増進、疾病予防に関わる新たな生理学的機能が求められるようになってきた。これに伴い、1991年厚生省の認可による「特定保健用食品」制度が設けられた。

日本では30数年前より、世界に先駆けてサイクロデキストリン、マルトオリゴ糖、カップリングシュガー、分岐サイクロデキストリン、分岐オリゴ糖、

フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、パラチノース、乳果オリゴ糖、トレハロースなどの有用糖質が相次いで開発され、大量生産されてきた。このようにオリゴ糖の大量生産が行われてきた背景として、①新規な微生物起源の酵素、特に糖転移活性の高い酵素の発見とその応用技術の進展、②分析機器および分析技術の発展による新たな反応機構の発見、③カラムクロマトグラフィーおよび膜分離技術など、糖質の分離・精製技術の進展などが挙げられる。また、これら糖質の機能性についての研究も活発に行われ、低カロリー、ノンカロリー、抗う蝕性、ビフィズス菌選択増殖活性、ミネラル吸収促進作用などの機能が明らかにされてきた。

食品加工用糖質素材を合成する場合、原料としては天然に豊富に存在し、安価に利用できるデンプン、ショ糖あるいは乳糖が用いられる。本稿ではこれら糖質からの酵素を用いた有用糖質の製法、特質および用途などについて解説する¹⁾。

2. デンプンから合成される糖質

日本におけるデンプンの需要は約310万トンで、このうち、糖化製品用が約187万トンとデンプン需要の60%強を占めている。このようなデンプン加工に、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、枝切り酵素、 α -グルコシダーゼ、サイクロデキストリン合成酵素（CGTase）などが使用されている。デンプンから各種糖質が酵素合成されているが、それに使用されている酵素および合成方法を図1に示す²⁾。

受理日 10月30日

採択日 11月20日

デンプンを *Bacillus licheniformis* の液化酵素で液化した後、グルコアミラーゼあるいはβ-アミラーゼで分解して、それぞれグルコースおよびマルトースが生産される。ついで、グルコースを異性化酵素で異性化して異性化糖が製造される。高濃度グルコース溶液にβ-グルコシダーゼを作用させ、縮合反応によりグルコースがβ-1,6結合したゲンチオオリゴ糖が生産されている。また、マルトースに *Aspergillus niger* あるいは *Acremonium strictum* 起源のα-グルコシダーゼを作用させると、それぞれα-1,6結合での転移により分岐オリゴ糖が、α-

1,3結合での転移によりニゲロオリゴ糖が製造される。

CGTase はデンプンに作用させると分子内転移作用を触媒して、グルコース6-8分子が環状に結合したサイクロデキストリン (CD) を合成する³⁾。CD は溶解性が低いため、溶解性を高める目的で枝切り酵素の縮合反応を利用して、高濃度の CD とマルトース溶液からマルトシル-CD (分岐 CD) が製造される。一方、CGTase はショ糖のような受容体存在下にデンプンに作用させると、CD を合成せずに分子間転移作用を触媒して受容体への転移生成物

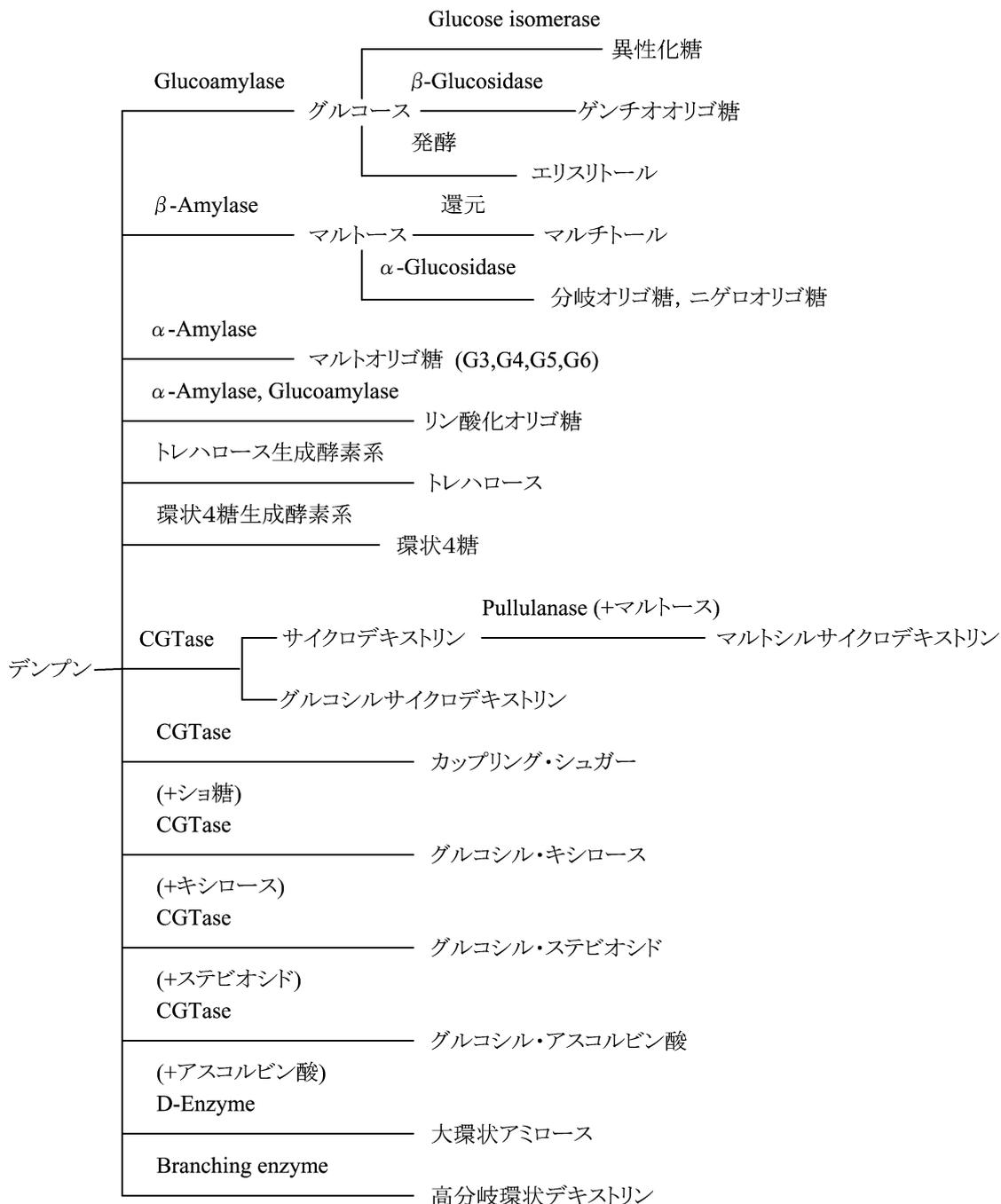


図1. デンプンから合成されている各種糖質および配糖体

を合成する。この作用を利用してショ糖、キシロース、ステビオシド、およびアスコルビン酸を受容体に用いて、それぞれ、カップリングシュガー、グルコシル・キシロース、グルコシル・ステビオシド、およびグルコシル・アスコルビン酸が合成されている。

グルコースおよびマルトースは、主としてお菓子、医薬品、調味料、パンなどに、また、異性化糖は主として清涼飲料水、乳酸飲料、パン、冷菓および菓子類に甘味剤として使われている。分岐オリゴ糖は砂糖の約50%の甘味度を呈し、発酵食品、飲料および菓子類に利用されている。ゲンチオオリゴ糖は苦みを呈する唯一のオリゴ糖で、食品の苦み付け、野菜などのえぐ味除去の目的で使用されている。また、難消化性のオリゴ糖でビフィズス菌選択増殖活性を有している⁴⁾。ニゲロオリゴ糖は砂糖の40—50%の甘味度を呈し、こく味のある甘味質を有している。また、塩味をマイルドな味にしたり、アスパルテームなどの高甘味度甘味剤の味質改善などの効果⁵⁾、さらには生理学的な機能としてはTリンパ球やBリンパ球などの免疫担当細胞を活性化する免疫賦活効果のあることが報告されている⁶⁾。

CD および分岐CDはその包接能を利用して、食品加工、医薬・化粧品分野において、難溶性物質の可溶化、香气成分や香辛成分（抹茶、ワサビ、カラシなど）などの揮発性成分の揮散防止、不安定な物質の安定化および食品中の異味、異臭のマスクングなどの目的に幅広く使われている⁷⁾。グルコシル・キシロースはチョコレートや米菓などのフレーバー強化剤として食品加工に、グルコシル・ステビオシドはステビオシドの欠点である苦味、残味などを改善した高甘味度甘味剤として、ステビオシドに代わって清涼飲料水などに使われている。また、グルコシル・アスコルビン酸は安定型ビタミンCとして化粧品や医薬品分野において利用されている。

さて、ショ糖を食べると虫歯（う蝕）になると言

われている。虫歯の直接の原因は虫歯菌、*Streptococcus mutans* による酸発酵である。ショ糖がこれに関与するのは次の2点である。すなわち、ショ糖は日常摂取するものの中で最も酸発酵されやすい糖質で、しかも、虫歯菌の生産する酵素、グルコシル転移酵素により、ショ糖から不溶性グルカンが合成されることにある。従って、ショ糖の上記2つの性質を抑制することにより虫歯は抑えられる。著者らはカップリングシュガーはショ糖に比べて、酸発酵されにくく、かつショ糖からの不溶性グルカン合成を阻害することを見だした。そこで、全国歯科系研究機関との共同研究により、カップリングシュガーの虫歯予防効果について調べた結果、カップリングシュガーは虫歯になりにくい甘味剤であることが明らかとなった。この開発研究は糖質に生理学的な機能を見だした最初の例であり、現在の特選保健用食品の先駆けとなるものである⁸⁾。

トレハロースはグルコース二分子が α 、 α -1,1結合した非還元性糖質で、デンプンの老化、タンパク質の変性、脂質の酸化を抑制する作用が強く、食品加工用糖質素材として注目されてきていた。しかし、トレハロースは従来、酵母の菌体から抽出、精製するしかなく、製造コストが高く、実用化にまで至っていなかった。最近になり、新たにトレハロース合成酵素系（マルトオリゴシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素とからなる）が見だされ、デンプンから工業的規模で安価に製造できるようになり、各種食品用途に利用されている（表1）⁹⁾。

最近、開発された新規糖質、サイクロアミロース、高度分岐環状デキストリン、リン酸化オリゴ糖、環状4糖およびグリコシル-グリセリンの製法、特質および用途について以下紹介する。

1) サイクロアミロース

アミロースに不均化反応を触媒する酵素、D-酵素、を作用させることにより、大環状アミロース（サイクロアミロース、CA）が合成される。CA

表1. トレハロースの機能と食品用途

機 能	食 品 用 途
低甘味、良質な味質	菓子類全般、調味料、缶詰など
非還元性、熱・酸に対して安定	加工・保存での品質劣化・色調変化を抑制、あん類、果実飲料など
デンプン老化防止	パン、麺、餅などデンプン質食品
タンパク質変性抑制	卵、肉などタンパク質を多く含む食品
脂質酸化抑制	肉、揚げ物など脂質を多く含む加工食品
吸湿抑制	菓子類、粉末調味料、
マスクング効果	苦み、渋み、えぐ味など好ましくない味の低減、好ましくない臭気の低減

は高分子であるにもかかわらず、その溶解度は約50%と高く、また、老化しにくい特質を有している。デンプンは低温に保存すると老化する性質を有しており、デンプン質食品にとってデンプンの老化防止は大きな問題になっている。CAは老化しにくいデンプンとして今後の利用が期待されている¹⁰⁾。

遺伝子組換え技術を利用して酵素タンパク質を生産させる際、ポリペプチドは正しく生産されているにもかかわらず、酵素活性が発現されない現象が観察されることがある。最近、CAがある種の界面活性剤と包接化合物を形成する特質を利用して、タンパク質を正しくリフォールディングさせる目的にCAが使用されている。すなわち、発現タンパク質を変性剤によりアンフォールディングさせた後、界面活性剤を加え、再凝集を防止する。ついで、CAを添加することにより、CAが界面活性剤を徐々に包接除去し、酵素タンパク質に正しい高次構造をとらせ、活性を発現させる¹¹⁾。

2) 高度分岐環状デキストリン

モチトウモロコシデンプンに枝作り酵素を作用させると、デンプン中のクラスターの継ぎ目部分の α -1,4結合を優先的に分解して、 α -1,6結合に繋ぎ変える。その際、デキストリンの一部は環状構造になる。合成された高度分岐環状デキストリン(HBCD)は分子量分布の幅が狭く、平均鎖長14.3、数平均重合度580、重量平均重合度930の構造を有している¹²⁾。

このHBCDは高分子量であるにもかかわらず、70%もの高い溶解度を示す。また、30%濃度のHBCD水溶液を4°Cで3週間、保存しても白濁せず、老化しない。また、マウスを流水プール中で10分間泳がせた後に、水、グルコースあるいはHBCDを投与し、再度泳がせ、限界に達するまでの遊泳時間が測定された。その結果、水またはグルコースを投与した場合に比べて、HBCDを投与することにより10-20%遊泳時間が延びることが報告されている。現在、HBCDはスポーツ飲料などに使用されている¹³⁾。

3) リン酸化オリゴ糖

馬鈴薯デンプンには約0.083% (830ppm)のリン酸が含まれており、グルコースのC6位またはC3位水酸基にエステル結合している。また、このリン酸基の所でグルコアミラーゼの作用が停止することが知られている。従って、馬鈴薯デンプンに液化酵素、グルコアミラーゼおよびプルランナーゼを作用させてグルコースを製造する際に、リン酸化オリゴ

表2. リン酸化オリゴ糖の重合度とリン酸含量

	主成分	微量成分
平均重合度	4.02	5.82
リン酸含量 (モル/モル)	0.71	1.88

糖も生成していると考えられる。近年、釜阪らは馬鈴薯デンプンから異性化液糖を製造する際に同時にリン酸化オリゴ糖も生成していることを明らかにし、クロマト分画により単離することに成功した。その主成分はマルトトリオースからマルトペンタオースにリン酸基が一分子結合した構造(90%以上)である。分子内に複数個のリン酸基を有するオリゴ糖も少量含まれている(表2)¹⁴⁾。

リン酸化オリゴ糖は高いミネラル可溶化効果を有する。また、リン酸化オリゴ糖のカルシウム塩(POs-Ca)は、高い水溶性を示し、可溶性カルシウムの供給源として有用な糖質である。このPOs-Caはショ糖の酸発酵によるプラーク内のpH低下を緩衝作用により抑制し、ミュータンス菌によるショ糖からの不溶性グルカンの合成およびエナメル質の脱灰を抑制する。さらに、POs-Ca配合ガムの初期虫歯の再石灰化促進効果をヒト唾液浸漬法で調べた結果、有意に促進していることが明らかにされた(図2)¹⁵⁾。本糖質は虫歯予防に有効な素材としてガムなどに利用されている。

4) 環状4糖

環状4糖はグルコース4分子が α -1,6結合と α -1,3結合とで交互に環状に連なったオリゴ糖である。このオリゴ糖はグルコース分子が α -1,6結合と α -1,3結合で交互に連なった多糖類アルトランに、ある種の微生物の生産する酵素、アルタナーゼを作用させることにより合成されることは以前から知られていた。最近、*Bacillus globisporus* C11株の生産する2つの酵素、6- α -グルコシルトランスフェラーゼと α -イソマルトシルトランスフェラーゼをデンプンに作用させることにより合成できることが報告された¹⁶⁾。

環状4糖は砂糖の27%の甘味度を呈し、消化酵素によって分解されず、腸内細菌によっても資化されない非消化、難発酵性の糖質である。また、アルコール保持能を有し、環状4糖1モルあたりプロパノールを0.53モル、エタノールを0.40モル、ブタノールを0.24モル保持する。さらに、ビタミンD3、ビタミンEおよびエイコサペンタエン酸を安定化する作用を有し、粉末化基剤としても有用である¹⁷⁾。現在、用途開発中である。

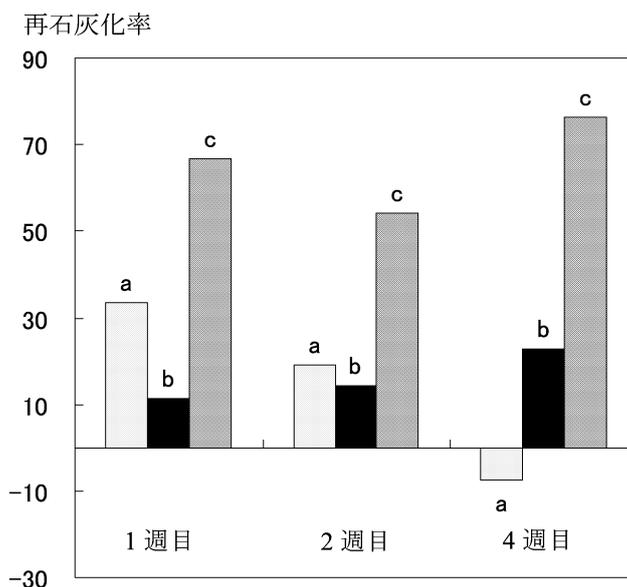


図2. ヒト口腔内試験による摂取ガムの違いによるエナメル質再石灰化率の比較
a：ショ糖配合ガム，b：キシリトールガム，c：POs-Ca 配合ガム

表3. CGTase および α -グルコシダーゼによるグリコシルグリセロールの合成

化合物	糖質 (mg/ml)	
	CGTase	α -グルコシダーゼ
グリコシルグリセリン	69.1	75.6
ジグリコシルグリセリン	36.6	7.8
トリグリコシルグリセリン	13.7	0
テトラグリコシルグリセリン	3.7	0
グルコース	2.4	128
マルトース	1.1	18.6
未同定物質*	61.3	4.7

*：HPLC分析により分離できないか、または同定できなく生成量をグルコース換算で表示。

5) グリコシルグリセリン

グリセリンにグルコースが結合した配糖体、グリコシルグリセリン (Glc-Gly) は酒、みりんや味噌などの伝統的発酵食品に、それぞれ約0.5%、0.1%、0.5%含まれており、食品にコク味や甘味を付与している。Glc-Gly はショ糖の約50%の甘味度を呈し、高い熱安定性と保湿性を示し、かつ低褐変性の配糖体である。また、難消化性で非う蝕性である。さらに、ラット小腸の二糖類加水分解酵素を阻害する活性も有している。すなわち、小腸における二糖類の消化・吸収を阻害し、血糖値の上昇を抑える効果を示す。このため、Glc-Gly は飲食品、化粧品および医薬品などへの用途が期待されている。

Glc-Gly はマルトースとグリセリンから、*Asp. niger* の α -グルコシダーゼの糖転移作用を用いて

合成する方法が報告されている¹⁸⁾。本法による合成では加水分解酵素を用いるため、転移効率が低く、かつ分解生成物であるグルコースを大量に生成する。Glc-Gly の特徴である非還元性を謳うためには、反応後、還元糖であるグルコースを分離する必要がある。

最近、中野らは糖転移酵素、CGTase の転移作用を用いて合成する方法を開発した¹⁹⁾。すなわち、デンプンとグリセリンの混合液に *Bacillus stearothermophilus* および *Thermoanaerobacter* sp. 由来の CGTase を作用させ、グリセリンの配糖体を合成した。この場合、グリセリンにグリコシル基が1分子、2分子、3分子と数個結合した配糖体、それぞれ Glc-Gly, Glc2-Gly および Glc3-Gly が合成された。本法は、 α -グルコシダーゼによる合成に比べて、

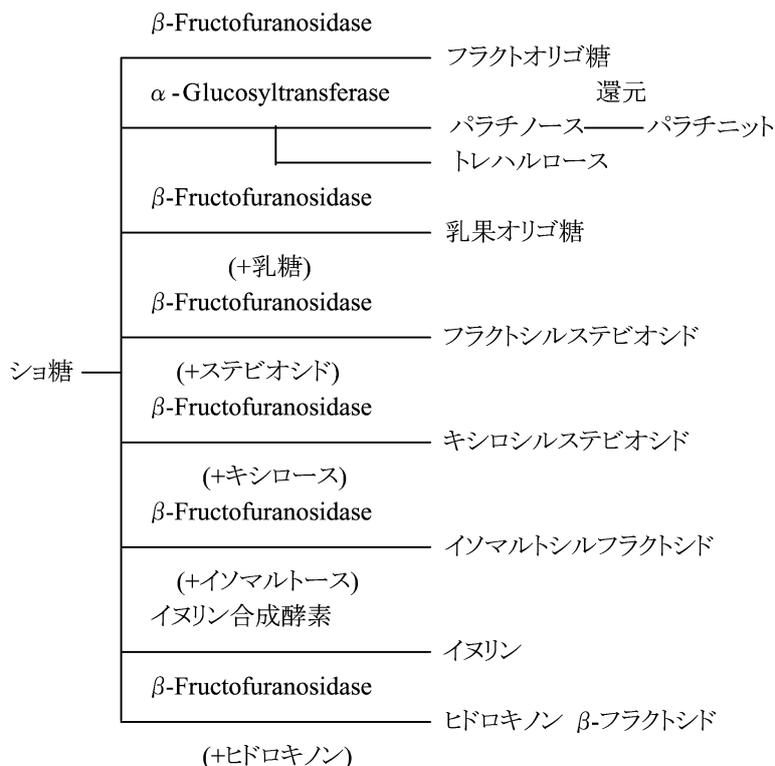


図3. ショ糖から合成されている各種糖質および配糖体

表4. グリコシルグリセロールによるブタ膵臓 α -アミラーゼ阻害活性

糖質	IC50 (mM)
グルコシルグリセリン	26.4
ジグルコシルグリセリン	0.245
トリグルコシルグリセリン	0.065

還元糖の生成量が少なく、グリセリンにグルコシル基が数分子結合した配糖体、グリコシルグリセリンを多く生成する (表3)。

Glc-Gly, Glc2-Gly および Glc3-Gly によるブタ膵臓 α -アミラーゼ活性の阻害の程度を比較すると、Glc2-Gly および Glc3-Gly は Glc-Gly に比べて強く阻害していることが認められた (表4)¹⁹⁾。このことは、グリコシルグリセリンはデンブ質食品の消化・吸収を阻害する可能性のあることを示している。現在、用途を開発中である。

3. ショ糖から合成される糖質

日本におけるショ糖の消費量は1972年に300万トンを超え、国民一人当たり30kgに達したが、その後、異性化糖などの進出に伴い、ショ糖の消費量は徐々に減少し、現在では約230万トンにまで落ち込んでいる。このうち、約3/4が食品加工業者によ

り各種製品の加工に使われている。ショ糖の加工に用いられる酵素としては、 β -フラクトフラノシダーゼ (β -FFase), α -グルコシルトランスフェラーゼ (α -GTase), デキストランシュクララーゼおよびイヌリン合成酵素などである。ショ糖から種々の糖質が合成されている。それに利用されている酵素を図3に示す²⁰⁾。

β -FFaseは加水分解酵素であるが、酵素の起源により転移反応をも触媒する。高濃度のショ糖溶液に *Asp. niger* 起源の β -FFase を作用させ、その転移作用を利用してフラクトオリゴ糖が合成されている。フラクトオリゴ糖はショ糖にフラクトシル基が β -2,1結合で1分子、2分子および3分子結合した、それぞれケストース、ニストースおよび1-フラクトシルニストースが主成分である。一方、細菌起源の *Arthrobacter sp.* K-1由来の β -FFaseは、受容体特異性がカビ起源の酵素とは異なり、ショ糖にはあまり転移せず、乳糖、キシロース、イソマルトースなどの糖質によく転移し、それぞれ、非還元性糖質のラクトシルフラクトシド (商品名、乳果オリゴ糖)、キシロシル・フラクトシド (XF) およびイソマルトシル・フラクトシド (IMF) を効率よく合成する。乳果オリゴ糖の製造工程を図4に示す。 α -GTaseはショ糖に作用して、分子内転移反応を触媒し、その結合様式を α -1,2結合から α -1,6また

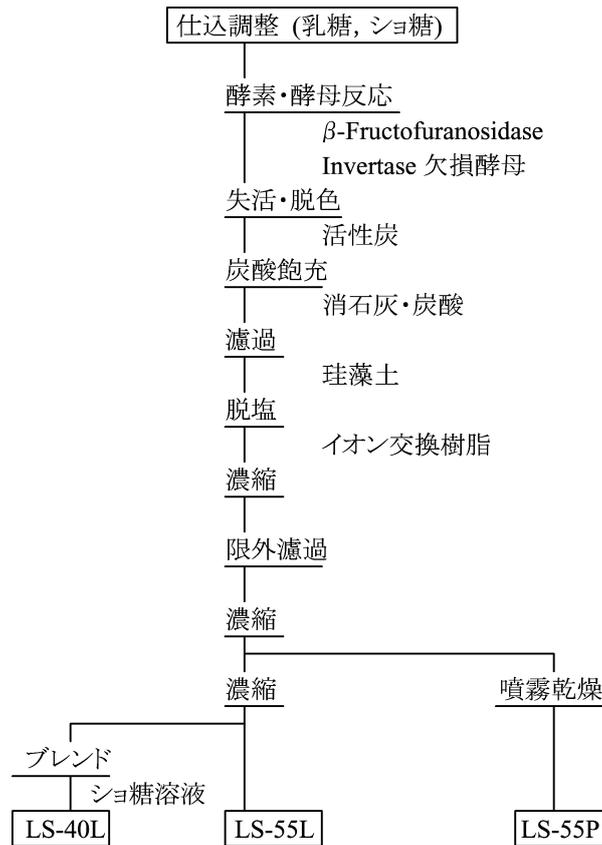


図4. 乳果オリゴ糖の製造工程

は α -1,1結合に繋ぎ変え、それぞれ、パラチノースおよびトレハロースを合成する。

フラクトオリゴ糖や乳果オリゴ糖を経口摂取した場合、いずれも消化酵素では分解されず、そのまま大腸にまで到達する。すなわち、血糖値およびインシュリン値を上昇させることのない低カロリー（2 kcal/g）糖質である。さらに、これらのオリゴ糖は大腸内ではウェルシュ菌や大腸菌などの腐敗細菌には利用されず、有用菌の代表であるビフィズス菌に優先的に利用され、酢酸、プロピオン酸および酪酸などの脂肪酸を生産する。このため、次のような効果が報告されている。①腸内菌叢の改善、②便性改善、③血清脂質の低減、④腸内腐敗産物の減少、および⑤カルシウム吸収促進などである^{21,22}。いずれのオリゴ糖も特定保健用食品の認可を受け、「ビフィズス菌を適正に増加させ、お腹の調子を整える働きを有する」という整腸作用に関する表示が許可されている。現在、乳製品、飲料、お菓子あるいはテーブルシュガーとして利用されている。

パラチノースおよびトレハロースはいずれも酸発酵されにくい糖質で、しかも *St. mutans* による不溶性グルカン合成を阻害し、抗う蝕性の機能を有している。現在、ガムをはじめ各種食品加工用糖質

素材として使用されている。XF および IMF も不溶性グルカン合成を強く阻害し、抗う蝕性糖質である。しかし、その阻害機構は両者で異なっている。すなわち、IMF はカップリングシュガー、パラチノースなどの糖質と同じくショ糖からの不溶性グルカン合成を阻害するのに対し、XF はショ糖の基質アナログとして働き、ショ糖の分解そのものを阻害する。現在の所、XF および IMF はいずれも実用化されていないが、強い抗う蝕性を示し、特に XF はショ糖の分解を阻害するという興味ある性質を有しており、新たな用途が期待される。

最近、開発された新規糖質、イヌリンおよびヒドロキノン β -フラクトシドの製法、性質および用途について以下紹介する。

1) イヌリン

イヌリンはキクイモなどのキク科植物の塊茎、チコリの根、タマネギ、ニンニクおよびニラなどのユリ科植物などに含まれているフラクトースが2ないし60分子 β -2,1結合した多糖類である。イヌリンは難消化性で水溶性の食物繊維として注目されている。また、脂肪に似た食感を有し、水と混ぜると脂肪状のクリームを作り、脂肪代替効果があるとも報告されている。現在、地域興しの一環として岩手県など

で小規模で生産されている。最近、このイヌリンをショ糖から効率よく合成する微生物酵素が見だされた²³⁾。高濃度のショ糖溶液に、*Bacillus* sp. 217C-11株の生産するイヌリン合成酵素を作用させることにより、45%の高収率でイヌリンが合成される。生成物は植物起源のイヌリンとは異なり、分子量分布の幅が狭く、重合度16付近にピークを持ち、重合度10から25のフラクタン混合物(平均重合度18)である。現在、健康食品として市販されている。

2) ヒドロキノンβ-フラクトシド

フェノール性水酸基はアルコール性水酸基に比べて、解離しやすく、酸化されやすい。そのフェノール類に糖質を結合させて配糖化することにより安定性向上、溶解性の改善、毒性の低減が期待される。すでに、ベリー植物の葉に含まれるアルブチン(ヒドロキノン(HQ)β-グルコシド)、酵素合成されたα-アルブチン(HQ α-グルコシド)が美白効果を目的に化粧品に使用されている。

最近、*Arthrobacter* 起源のβ-FFaseがHQおよび緑茶カテキンの主成分であるエピカテキン(EC)を効率よく配糖化することを見だした。生成物のヒドロキノンβ-フラクトシドは、皮膚のメラニン合成で主要な働きをしているチロシナーゼを阻害し、その活性はアルブチンと同程度であった。また、生成物のエピカテキンフラクトシドは配糖化前のECよりもチロシナーゼ阻害活性は約1/3に減少したが、水溶性は大幅に改善された²⁴⁾。

4. 乳糖から合成される糖質

乳糖は牛乳中に約4.5%含まれており、乳製品製造時の副産物であるホエーから回収されている。日本における乳糖の需要は、年間85,000トンで、調製粉乳に添加したり、賦形剤、固結防止剤、分散剤、安定化剤および発酵基質として食品、医薬品の製造に使われている。

乳糖を金属触媒により接触還元してラクチトールが、アルカリ異性化してラクチュロースが製造されている。また、β-ガラクトシダーゼの糖転移作用を用いてβ-ガラクトオリゴ糖が製造されている。ラクチトールは低甘味、低カロリー甘味料で、ノンシュガーのお菓子や飲料に添加して、甘味の調整、味質の改善に利用されている。ラクチュロースはビフィズス菌の選択増殖活性を有しており、粉ミルクに添加されている。また、β-ガラクトオリゴ糖は先に述べたフラクトオリゴ糖や乳果オリゴ糖と同様

の整腸効果を有しており、ヨーグルトや飲料などに使用されている。その他、最近、開発中のオリゴ糖について紹介する。

1) α-ガラクトオリゴ糖

α-ガラクトシル基を含む糖質は、天然にはラフィノースやメリビオース、あるいは、生体内糖鎖の末端にα-ガラクトビオース(α-Gal2)の形で存在し、強いビフィズス菌選択増殖活性、経口投与による制がん効果、NK細胞活性化作用など重要な生理機能を有することが報告されている。さらに、近年、ラフィノースが、経口投与によるアトピー性皮膚炎の改善効果や免疫賦活活性を示すこと、また、α-1,3Gal2が、動物の臓器をヒトに移植したときに起こる急性の拒絶反応の低減効果や腸炎の原因菌であるディフィシレ菌の毒素の中和効果を示すこと、α-1,4Gal2が病原性大腸菌O157や院内感染で問題となる尿路感染性大腸菌の感染予防・治療効果を示すことが報告されている。α-ガラクトシル基は、生体内においては主としてα-Gal2の形で存在するため、これらの機能の本体はα-Gal2と考えられ、α-Gal2は新しい機能をもつ食品や医薬品素材として期待できる。しかし、α-Gal2は、未だに安価な大量生産技術は開発されておらず、その機能の実用的な評価やそのメカニズムの解明は十分になされていない。

著者らは安価な乳糖から調製したガラクトースを原料に、α-ガラクトシダーゼの縮合反応を利用してα-Gal2を安価に合成する方法を検討している。すなわち、乳糖をカチオン交換樹脂で加水分解後、擬似移動層分画装置でグルコースを除去する。得られたガラクトースを高濃度に濃縮後、*Asp. niger* APC-9319株の生産するα-ガラクトシダーゼを作用させ、α-結合ガラクトオリゴ糖(α-GOS)を得る。α-GOSの糖組成は2糖画分(α-Gal2)が58%で、その他にα-ガラクトトリオースが28%、α-ガラクトテトラオース以上のオリゴ糖(重合度が8まで)が14%含まれていた。α-Gal2の主成分は1,6結合(71%)で、その他に1,3結合(18%)、1,2結合(5%)、1,4結合(3%)および1,1結合(3%)が含まれていた²⁵⁾。

得られたα-GOSの甘味度は、ショ糖の25%で、刺激のないまろやかな味質を示した。α-GOSは、熱や酸性条件下で非常に安定で、水分活性もショ糖と同等であったことから、ショ糖と同様に食品加工上作業性の良いオリゴ糖と考えられる。α-GOSは、各種飲食物に添加すると、旨味を損ねることなく、

食品素材としての評価

- ・ ショ糖の25%の甘味，刺激のないまろやかな味質
- ・ 熱や酸性条件下で非常に安定，水分活性や粘度もショ糖と同等
- ・ 風味改善効果（酸味，苦味，渋味および苦味の抑制）

生理機能の評価

- ・ 難消化性
- ・ ヒト腸内細菌による資化性
→ 腸内有用細菌（ビフィズス菌や酪酸生産菌）の選択的増殖活性
- ・ アトピー性疾患の改善効果

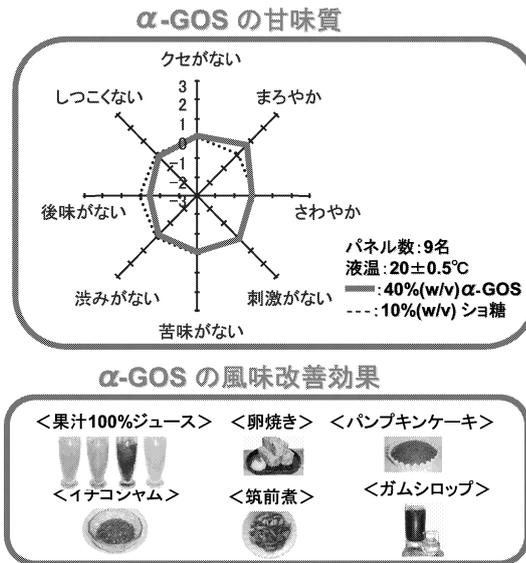


図5. α -結合ガラクトオリゴ糖の特長

酸味，苦味，渋味，えぐ味を抑制し，食品本来の風味を引き立てた。さらに， α -GOSは，難消化性で，腸内有用細菌（ビフィズス菌や酪酸生産菌）を選択的に増殖させた（図5）。 α -GOSは，アレルギー予防などの免疫調節機能も有しており，現在，企業化が検討されている²⁶⁾。

2) ラクトビオン酸

ラクトビオン酸はラクトースの還元性末端のグルコースが酸化されて，グルコン酸になったアルドビオン酸である。ラクトビオン酸はビフィズス菌選択増殖活性を有すること，また，ミネラルと水溶性の塩を形成することより，ミネラル補給剤として利用可能であることが報告されている。さらに，移植用臓器の保存液への添加が効果的であるなど，種々の用途が期待されている糖質素材である。現在，日本では化学合成されていることもあり，研究用試薬として使われているにすぎない。

近年，各種機能性オリゴ糖が酵素合成されているが，いずれも加水分解酵素あるいは転移酵素を利用して合成されている。酸化還元酵素を利用したオリゴ糖の製造についてはほとんど研究されていなかった。最近，村上らは土壤中から新たに検索した *Burkholderia cepacia* の生産する菌体内酵素，グルコースオキシダーゼは基質特異性の幅が広く，グルコースとほぼ同じ速度で乳糖を酸化し，ラクトビオン酸を生産することを見だした^{27,28)}。また，本菌を用いて発酵法により，乳糖を全てラクトビオン酸に変換することが出来た。さらに，菌体反応法によるラクトビオン酸製造法についても確立した。ラクト

ビオン酸はカルシウム，マグネシウムおよび亜鉛などと可溶性の塩を形成し，ミネラル補給剤としての可能性を秘めた糖質である。

引用文献

- 1) 北畑寿美雄：糖質関連酵素の作用，岡田茂孝・北畑寿美雄監「工業用糖質酵素ハンドブック」，pp.19-21，講談社サイエンティフィック，1999.
- 2) 北畑寿美雄：糖質関連酵素の現状と将来，FFIジャーナル，**178**，11-18，1998.
- 3) Kitahata, S: Cyclomaltodextrin glucanotransferase, "Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes", pp. 6-17, CRC Press, 1995.
- 4) 海野剛裕：ゲンチオオリゴ糖の工業的生産に関する研究，応用糖質科学，**42**，83-89，1995.
- 5) 小西 豊，加藤 優，山本 健，海野剛裕：ニゲロオリゴ糖含有シロップの開発とその応用：月刊フードケミカル，**6**，55-59，1997.
- 6) Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Kusaka, H., Liu, T. and Yoshikai, Y.: Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T Helper 1-Like immune response in mice, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 373-378, 1999.
- 7) 藤田孝輝，原 浩司，濱保健一，吉村佳典：分岐シクロデキストリン，岡田茂孝・北畑寿美雄監「工業用糖質酵素ハンドブック」，pp.122-127，講談社サイエンティフィック，1999.
- 8) 北畑寿美雄，吉川恵温，岡田茂孝，竹内 叶，今井 奨，西沢俊樹，荒谷真平：虫歯とオリゴ糖，澁

- 粉科学, **28**, 142-149, 1981.
- 9) 久保田倫夫:トレハロース, 岡田茂孝・北畑寿美雄監「工業用糖質酵素ハンドブック」, pp.173-178, 講談社サイエンティフィック, 1999.
 - 10) 中村弘康, 鷹羽武史, 岡田茂孝:新規環状糖質サイクロアミロースの合成と諸性質, 食品工業, **39**, 52-59, 1996.
 - 11) Machida, S., Ogawa, S., Xiaohua, S., Takaha, T., Fujii, K. and Hayashi, K.: Cycloamylose as an efficient artificial chaperon for protein refolding, *FEBS Letters*, **486**, 131-135, 2000.
 - 12) Takata, H., Takaha, T., Nakamura, H., Fujii, K., Okada, S., Takagi, M. and Imanaka, T.: Production and some properties of a dextrin with a narrow size distribution by the cyclization reaction of branching enzyme, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 119-123, 1997.
 - 13) Takii, H., Ishikawa, K., Kometani, T., Okada, S. and Fushiki, T.: Enhancement of swimming endurance in mice by highly branched cyclic dextrin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2045-2052, 1999.
 - 14) Kamasaka, H., To-o, K., Uchida, M., Kusaka, K., Kuriki, T., Kometani, T., Hayashi, H., Okada, S. and Ichikawa, T.: Studies of phosphoryl oligosaccharides prepared from potato starch, *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 253-261, 1997.
 - 15) Inaba, D., Kamasaka, H., Minami, K., Nishimura, T., Kuriki, T., Imai, S. and Yonemitsu, M.: Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (POs) supplied by chewing gum, *J. Dent. Hlth*, **52**, 112-118, 2002.
 - 16) Aga, H., Nishimoto, T., Kuniyoshi, M., Maruta, K., Yamashita, H., Higashiyama, T., Nakada, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y.:6-O- α -Glucosyltransferase and 3- α -isomaltosyltransferase from *Bacillus globisporus* N75, *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 215-224, 2003.
 - 17) 渡辺 光, 黒瀬真弓, 工藤尚樹, 奥 和之, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫:環状4糖による脂溶性ビタミン類の安定化, 2003年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.68, 2003.
 - 18) Takenaka, F. and Uchiyama, H.: Synthesis of α -D-glucosylglycerol by α -glucosidase and some of its characteristics, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1821-1826, 2000.
 - 19) Nakano, H., Kiso, T., Okamoto, K., Tomita, T., Manan, M. B. and Kitahata, S.: Synthesis of glycosyl glycerol by cyclodextrin glucanotransferase, *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 583-588, 2003.
 - 20) 北畑寿美雄, 石川 弘:酵素によるショ糖の加工, 岡田茂孝・北畑寿美雄監「工業用糖質酵素ハンドブック」, pp.136-143, 講談社サイエンティフィック, 1999.
 - 21) 平山匡男:新規糖質の生理的, 物理的機能性, FFI ジャーナル, **178**, 42-51, 1998.
 - 22) Kitahata, S. and Fujita, K.: Production and properties of oligosaccharides synthesized from sucrose, Edited by Ohnishi, M., "Glycoenzymes", pp. 227-239, 2000.
 - 23) 和田 正:スクロースを原料とした新規イヌリン合成酵素によるイヌリンの製造とその利用, 第43回澱粉研究懇談会資料集, 78-82, 2003.
 - 24) Nakano, H., Hamayasu, K., Nakagawa, K., Tabata, A., Fujita, K., Hara, K., Kiso, T., Murakami, H. and Kitahata, S.: Transglycosylation of hydroquinone and epicatechin by β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp., *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 115-121, 2002.
 - 25) Hashimoto, H., Yamashita, A., Ikura, K., Katayama, C., Goto, M., Yasuno, S., Kamei, M. and Kitahata, S.: Production of the positional isomers of α -galactosidase by the reverse reaction of α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404, *J. Appl. Glycosci.*, **48**, 279-285, 2001.
 - 26) 山下亜希子, 橋本博之, 北畑寿美雄, 菊地恵理子, 藤田孝輝, 岡田正通, 水谷安津司, 森 茂治, 天野良彦, 神田鷹久: *Asp. niger* APC-9319 α -ガラクトシダーゼによる α -結合ガラクトオリゴ糖 (α -GOS) の製造とその諸性質, *J. Appl. Glycosci.* (in press).
 - 27) Murakami, H., Kawano, J., Yoshizumi, H., Nakano, H. and Kitahata, S.: Screening of lactobionic acid producing microorganisms, *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 469-477, 2002.
 - 28) Murakami, H., Seko, A., Azumi, M., Ueshima, N., Yoshizumi, H., Nakano, H. and Kitahata, S.: Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*, *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 117-120, 2003.
-

Present Status in Development of Useful Saccharides

Sumio KITAHATA, Akiko YAMASHITA and Hiroyuki HASHIMOTO

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Shinshu University

Summary

Since the 1970s, a number of new carbohydrate active enzymes such as hydrolases and transglycosidases have been discovered. Nowadays, with transglycosylation and reverse reactions of these enzymes, many kinds of saccharides such as coupling sugar, trehalose, fructooligosaccharides, palatinose, lactosucrose, and galactooligosaccharides, are industrially produced, mainly from starch, sucrose, and lactose as raw materials. These oligosaccharides have favorable physiological characteristics such as low-calorie, non- or anti-cariogenicity, and improvement of intestinal microflora based on selective proliferation of *Bifidobacteria*. In 1991, the Japanese government enacted legislation concerning "Foods for specified Health Use". In this paper, the production and properties of these saccharides on the market and under development are reviewed.

Key word : Useful saccharides, Enzymatic synthesis, Function of saccharides, Oligosaccharides