



微生物によるガラクトオリゴ糖の生産とその機能性

大塚, 耕太郎

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1990-09-28

(Date of Publication)

2009-05-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1458

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3057224>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001458>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

微生物によるガラクトオリゴ糖の
生産とその機能性

平成2年8月

大塚 耕太郎

目次

| | | |
|------|--|----|
| 第1章 | 緒言 | 1 |
| 第2章 | ガラクトオリゴ糖生産菌株のスクリーニング と同定 | 7 |
| 1. | 序 | 7 |
| 2. | 実験方法 | 8 |
| 3. | 実験結果 | 10 |
| 4. | 考察 | 17 |
| 5. | 要約 | 18 |
| 第3章 | <u>Cryptococcus laurentii</u> OKN-4株の生産する ガラクトオリゴ糖の分離・精製と構造解析 | 20 |
| 1. | 序 | 20 |
| 2. | 実験方法 | 20 |
| 3. | 実験結果 | 24 |
| 4. | 考察 | 32 |
| 5. | 要約 | 32 |
| 第4章 | <u>Cryptococcus laurentii</u> OKN-4株の4'-ガラクト シルラクトース生成酵素の精製と諸性質 | 34 |
| 1. | 序 | 34 |
| 2. | 酵素の精製 | 35 |
| 2-1. | 実験方法 | 35 |
| 2-2. | 実験結果 | 37 |
| 3. | 酵素の諸性質と転移反応の検討 | 44 |
| 3-1. | 実験方法 | 44 |
| 3-2. | 実験結果 | 45 |
| 4. | 考察 | 57 |

| | |
|--|-----|
| 5. 要約 | 61 |
| 第5章 4'-ガラクトシルラクトースの発酵生産条件の 検討 | 62 |
| 1. 序 | 62 |
| 2. 実験方法 | 62 |
| 3. 実験結果 | 63 |
| 4. 考察 | 69 |
| 5. 要約 | 71 |
| 第6章 4'-ガラクトシルラクトースの生体利用 | 72 |
| 1. 序 | 72 |
| 2. <u>in vitro</u> における4'-GLの消化酵素による 加水分解 | 73 |
| 2-1. 実験方法 | 73 |
| 2-2. 実験結果 | 75 |
| 3. ラットにおける ¹⁴ C-4'-GLの吸収と排泄 | 79 |
| 3-1. 実験方法 | 79 |
| 3-2. 実験結果 | 84 |
| 4. 4'-GL摂取の生体に及ぼす影響 | 92 |
| 4-1. 実験方法 | 92 |
| 4-2. 実験結果 | 94 |
| 5. 考察 | 104 |
| 6. 要約 | 112 |
| 第7章 4'-ガラクトシルラクトースの腸内フローラに 及ぼす影響 | 114 |
| 1. 序 | 114 |
| 2. ヒト腸内フローラ構成菌による4'-GLの資化性 | 115 |
| 2-1. 実験方法 | 115 |

| | |
|---------------------|-----|
| 2 - 2. 実験結果 | 116 |
| 3. ラットの腸内フローラに及ぼす影響 | 119 |
| 3 - 1. 実験方法 | 119 |
| 3 - 2. 実験結果 | 120 |
| 4. ヒトの腸内フローラに及ぼす影響 | 124 |
| 4 - 1. 実験方法 | 124 |
| 4 - 2. 実験結果 | 126 |
| 5. 考察 | 131 |
| 6. 要約 | 135 |
| | |
| 第 8 章 総括 | 136 |
| 英文要約 | 139 |
| | |
| 文献 | 142 |
| | |
| 謝辞 | 154 |

第 1 章 緒 言

近年、食糧の生産、加工技術、食品関連分野の研究の著しい進展によって、日本をはじめ先進諸国の多くの食生活は豊かになり飽食の時代を迎えた。しかしながら、過剰摂取による肥満、糖尿病、高脂血症、心疾患など恵まれた食生活からくる疾病が増加している。

一方、高齢化社会の進展とともに健康に対する関心は一段と高まり、これに伴って栄養問題など食品に対する関心も高まっている。

食品は人間が活動エネルギーを得るための最も重要な物質であり、生命や健康の維持に欠かせないものである。従来、食品は人体への栄養素の供給体としての栄養性と味覚や嗅覚を満足させるための嗜好性を中心に評価されてきた。

しかし、食品中にはこれらとは別に生理活性物質とも呼ぶべき成分が存在し、摂取後生体防御系、ホルモン系、神経系、循環系、消化系などを調節し、健康の維持や回復に直接寄与していることが最近の研究で明らかにされ始めた。しかし、この新しい機能は学術的に不明な点が多いと同時に、食と健康への志向のきわめて高い今日、社会的な大きな関心事ともなっている。

食品の機能、とりわけ生体調節機能を学術的に整理、解析する研究は、文部省特別研究として昭和59年から3年間行われ、このプロジェクトは現在文部省重点領

域研究として継続されている。そして、食品の生体調節機能が明かになるに伴い、この機能を有する食品を機能性食品と呼ぶことが提唱されてきた。これまで明かになった食品に存在する生体調節因子とその機能の抄例をTable 1-1(1)に示した。これら生体調節因子としてはペプチド、糖質、脂質、複合糖質など多くのものが存在するが、なかでもオリゴ糖は早くから研究され現在そのいくつかは商品化されている(2~4)。

本来、オリゴ糖など糖質の持つ生理機能は、甘味あるいはエネルギー源としての働きが最も典型的なものであった。しかし、近年になり消費者の甘味離れや低カロリー志向により、甘味料としての他に整腸作用や抗う蝕性、低カロリーなどの特性を有するものが求められるようになってきた。

現在、整腸作用を有するオリゴ糖としては、腸内有用細菌である Bifidobacterium を増殖させるフラクトオリゴ糖(5)、ガラクトオリゴ糖(6,7)、イソマルトオリゴ糖(8)などが開発されている。また、抗う蝕性としてのパラチノース(9,10)やカップリングシュガー(11,12)、低カロリー糖質としてのエリスリトール(13,14)など糖アルコールが開発されている。

その他、オリゴ糖の機能として血清脂質改善、腸内腐敗物の抑制、血圧上昇の抑制、静菌作用などが期待されている。

これらオリゴ糖は植物や動物など自然界に広く分布

Table 1-1 食品中の生体調節因子とその機能の抄例

| 食品 | 生体調節因子 | 主な機能 |
|-----------|-------------------------|------------|
| (生体防御系) | | |
| ミルク | イムノグロブリン | 体液性免疫 |
| ミルク | 食食細胞活性化ペプチド* | 細胞性免疫 |
| シイタケ | β -1,3-グルカン | 免疫増強 |
| エビ、カニ | キチン | 免疫増強 |
| (ホルモン系) | | |
| ミルク | 成長ホルモン放出因子 | 成長ホルモン分泌 |
| ミルク | ガストリン放出ペプチド | ガストリン分泌 |
| オオムギ | 黄体形成ホルモン放出因子 | 黄体形成ホルモン分泌 |
| ギムネマジルベスタ | ギムネマ酸 | インスリン分泌 |
| (神経系) | | |
| ミルク | オピオイドペプチド* | 神経鎮静 |
| ミルク | オピオイドアンタゴニスト* | 神経調節 |
| コムギ | オピオイドペプチド* | 神経鎮静 |
| (循環系) | | |
| ミルク | エリスロポエチン | 造血 |
| ミルク | アンジオテンシン変換酵素 阻害ペプチド* | 血圧調節 |
| トウモロコシ | アンジオテンシン変換酵素 阻害ペプチド* | 血圧調節 |
| イワシ | エイコサペンタエン酸 | 抗血栓 |
| エビ、カニ | キトサン** | コレステロール低減 |
| ダイズ | グリシニン | コレステロール低減 |
| 海藻 | 食物繊維 | コレステロール低減 |
| (消化系) | | |
| ミルク | Ca結晶成長阻害ペプチド | カルシウム吸収促進 |
| ミルク | シアロオリゴ糖 | ビフィズス菌活性化 |
| キクイモ | フラクトオリゴ糖** | ビフィズス菌活性化 |
| ダイズ | ガラクトオリゴ糖** | ビフィズス菌活性化 |
| トウモロコシ | イソマルトオリゴ糖** | ビフィズス菌活性化 |
| ミルク | ラクトフェリン | 抗菌 |
| ミルク | ラクトペルオキシダーゼ | 抗菌 |
| ミルク | シスタチン | 抗ウイルス |
| ダイズ | ソヤサポニン | 抗ウイルス |
| ミルク | グリコマクロペプチド** | 抗ウイルス |
| ミルク | ガングリオシド | 抗毒 |
| (細胞系) | | |
| ミルク | 上皮成長因子 | 細胞成長 |
| ツキミソウ | γ -リノレン酸 | 細胞膜強化 |
| ソバ | ルチン | 細胞膜強化 |
| コメ | γ -オリザノール | 細胞老化抑制 |
| ゴマ | セサミノール | 細胞老化抑制 |
| クルミ | エラグ酸 | 細胞老化抑制 |

* タンパク質中に潜在

** 加工によって作成

(15)していることが古くから知られていたが、きわめて少量であるため食品素材として大量安価に供給されることができなかつた。

近年、酵素化学の進歩発展によって、多くの微生物起源の糖質関連酵素の検索や研究が進み(16,17)、これらの酵素を利用してオリゴ糖を大量に生産することが可能となってきた。

私たちは、食品の機能性について関心がもたれ始めた初期においてオリゴ糖に着目しその開発を試みた。オリゴ糖を生成するための原料として、チーズや乳製品製造行程で不用物として廃棄されるホエー中のラクトースの有効利用を考え、ラクトースからのガラクトオリゴ糖の生成の研究を開始した。

これまでホエー中のラクトースは、アルコール発酵原料などとしての利用法(18)も考えられてきてきたが、いまだ有効に利用されることなくその多くは廃棄されている。

ガラクトオリゴ糖は一般にはその多くがほ乳類のミルク中に存在し、ヒトの乳汁や牛乳から分離されその構造解析がおこなわれている(15,19,20)。また、ガラクトオリゴ糖は、牛乳の消化吸収をよくするため牛乳中のラクトースを β -ガラクトシダーゼで分解する際に β -ガラクトシダーゼの糖転移作用によって少量副成されることが知られていた(21)。Table 1-2に β -ガラクトシダーゼの糖転移作用によって生成されたガラクト

Table 1-2. Galactooligosaccharide-producing organisms.

| Organisms | Galactooligosaccharides | References |
|----------------------------------|--|------------|
| <u>Saccharomyces fragilis</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \text{D} - \text{Glc}$ | (22) |
| <u>Saccharomyces lactis</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \text{D} - \text{Glc}$ $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \text{D} - \text{Gal}$ $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | (24, 25) |
| <u>Sporobolomyces singularis</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | (26) |
| <u>Penicillium chrysogenum</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | (27) |
| <u>Bacillus circulans</u> | trisaccharide | (30) |
| <u>Chaetomium cochlioides</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | (35) |
| <u>Chaetomium globosum</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | |
| <u>Chaetomium funicola</u> | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \text{D} - \text{Glc}$ | |
| Fungi | $\underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \underline{0} - \beta - \text{D} - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \text{D} - \text{Glc}$ | (36) |

オリゴ糖の例を示した。私たちは、ラクトースからのガラクトオリゴ糖調製に当り、ガラクトース転移作用の強い β -ガラクトシダーゼを生産する微生物を広く自然界からスクリーニングし、数種の優良菌株を得た。この微生物を利用しガラクトオリゴ糖を大量に生産する条件を検討する一方、動物試験や臨床試験でその機能の有用性を検討した。

以下得られた結果を第2章から第7章までにまとめるとともに第8章で総合的に考察することとした。

第 2 章 ガラクトオリゴ糖生産菌株のスクリーニングと同定

1. 序

ガラクトオリゴ糖はほ乳類のミルク中に存在することが知られており、ヒトの乳汁から数多くのガラクトオリゴ糖が分離され、その構造解析が行われている(15,19,20)。また、ラクトースを β -ガラクトシダーゼで加水分解した場合、分解物であるグルコースとガラクトースの他にこれらを構成糖としたガラクトオリゴ糖が少量副成することが古くから知られており、Saccharomyces fragilis(22,23)、Saccharomyces lactis(24,25)、Sporobolomyces singularis(26)、Penicillium chrysogenum(27)など多くの微生物 β -ガラクトシダーゼによってラクトースからガラクトオリゴ糖を生成することが報告されている。

しかしながら、いずれの場合も生成されるガラクトオリゴ糖は数種類以上の混合物であり、また生成量も少ない。

そこで、微生物の β -ガラクトシダーゼのガラクトース転移作用を利用し、ラクトースから単一のガラクトオリゴ糖を大量に生産することを目的に、このような特徴を有する微生物を新たに土壌中より分離し、その菌株の同定を行った。

2. 実験方法

ガラクトオリゴ糖生産菌株のスクリーニング

土壌約1gを滅菌水10mlに懸濁し、その上澄液0.5mlをTable 2-1に示す培地に加え、30℃で振とう培養を行った。約2日間培養を行った後、その0.1mlを新しい培養液に加え再び30℃で2日間培養を行った。この操作を2～3回繰り返し、最終培養液をTable 2-1に示す組成の平板培地（寒天1.5%添加）を用い菌株の分離を行った。

ガラクトオリゴ糖の検出

1) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 薄層プレートは Kieselgel 60 20cm×20cm (Merck社)を用い、培養濾液を直接スポットし、n-ブタノール・ピリジン・水(60:25:15)で室温下、4時間展開した。オリゴ糖の検出には、0.2%ナフトレゾルシン/エタノール、20%硫酸を用い発色を行った。

2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 日立655A-11型高速液体クロマトグラフィーを用い以下の条件で行った。

カラム: LiChrosorb NH₂カラム φ4×250mm (Cica-Merck社), 溶液: アセトニトリル・水(70:30), 温度: 室温, 流速: 1.0ml/min, 検出器: Shodex RI SE31型示差屈折検出器

なお培養液をミリポアフィルター(0.45μ)で濾過し

Table 2-1. Culture medium.

| | |
|---|----------|
| Lactose | 10.0 g/l |
| NH ₄ Cl | 2.0 g/l |
| Yeast extract | 0.2 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 2.4 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 8.1 g/l |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2 g/l |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 4 mg/l |
| CaCl ₂ | 10 mg/l |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 1 mg/l |
| pH 6.0 | |

たものを試料液としインジェクションした。

菌株の同定 菌株の同定は、The Yeasts a
Taxonomic Study(28)の分類方法に従った。

3. 実験結果

ガラクトオリゴ糖生産菌株のスクリーニング

集積培養法により、土壌から1019株の菌株を分離した。培養濾液をTLCにスポットし展開を行い、ラクトースからのガラクトオリゴ糖の生成を調べた。生成菌株は細菌、酵母、糸状菌、放線菌など広く分布していたが、展開後の発色スポットの濃度、形状から判断したところ、生成量の高い菌株はいずれも酵母に属していた。Table 2-2に代表的な15株および本研究に使用した菌種の標準菌株について、培養5日目の培養液をHPLCで測定したときのガラクトオリゴ糖の対ラクトース収率を示した。

本研究に使用したOKN-4株について、TLCによる培養液構成糖の経時変化、ならびに4日間培養した液のHPLC分析の結果をFig.2-1および2-2に示した。Fig.2-1のTLCの結果から、本菌株は培養18時間経過後ガラクトオリゴ糖GO-1を生成し、66時間後にはその量は残存するラクトースよりも多くなった。なお、48時

Table 2-2. Yield of galactooligosaccharides from lactose by isolated organisms.

| Strain No. | Yield (%) |
|--|-----------|
| OKN-3 (Y) | 39 |
| OKN-4 (Y) | 43 |
| X-118-5 (Y) | 37 |
| X-118-6 (Y) | 29 |
| O-179-25 (Y) | 29 |
| O-179-26 (Y) | 27 |
| O-245-1 (Y) | 22 |
| O-267-2 (Y) | 29 |
| H-189 (F) | 12 |
| H-222 (F) | 9 |
| H-109 (A) | 7 |
| H-117 (A) | 9 |
| H-142 (A) | 1 |
| H-217 (A) | 7 |
| H-223 (A) | 4 |
| <u>Cryptococcus laurentii</u> var. <u>laurentii</u> IF0-0609 | 2 |

(Y): Yeast, (F): Fungi, (A): Actinomycetes

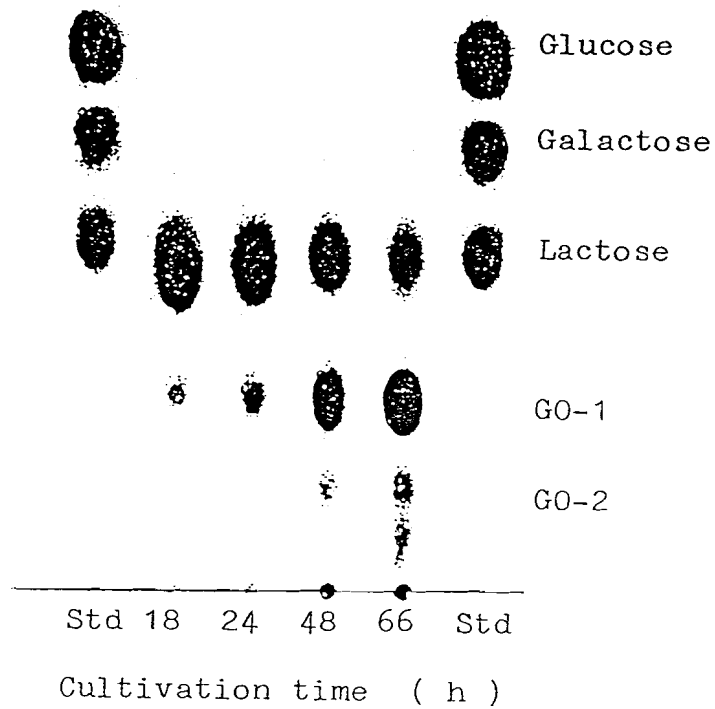


Fig.2-1. Thin-layer chromatograms of oligosaccharides produced by Cryptococcus laurentii OKN-4 from lactose.

Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30°C. Two ml of culture medium was taken out at the indicated time. Sugars were detected with naphthoresorcinol reagent. GO-1,GO-2; Oligosaccharides produced during the cultivation. Std; Standard samples.

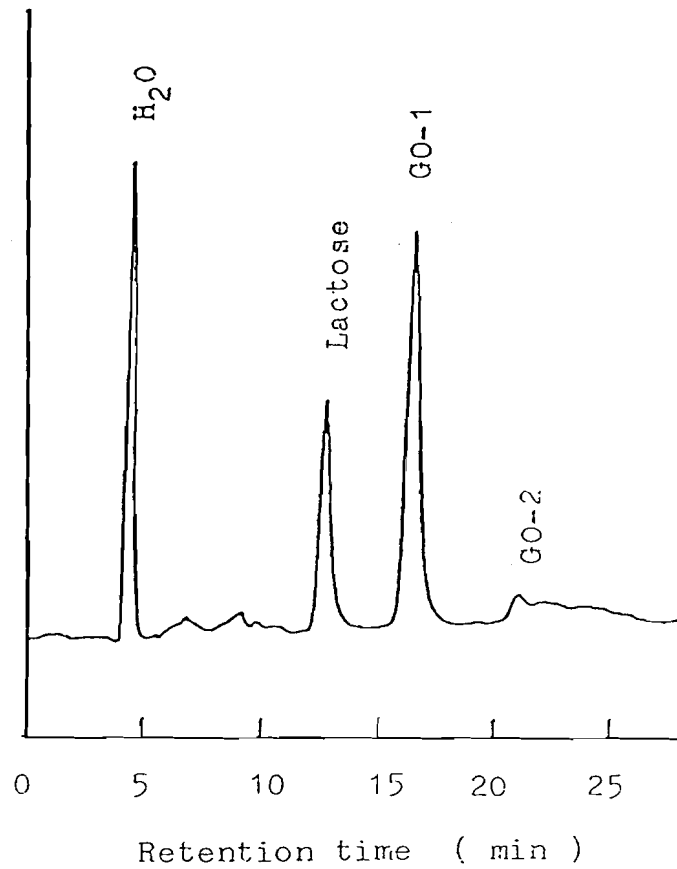


Fig.2-2. High performance liquid chromatogram of culture medium. Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30°C for 4 days. G0-1, G0-2; Oligosaccharides produced during the cultivation.

間頃より G O - 1 とは異なるガラクトオリゴ糖 (G O - 2) が生成しはじめることが分かった。 Fig.2-2 の HPLC の結果から培養 4 日目のガラクトオリゴ糖の対ラクトース収率は 43% であり、培養液中の全糖量に対して 62% を占めていることが分かった。

OKN-4 株の同定 菌株の形態的及び生理的性質を Table 2-3 に示した。なお菌株の形態は M Y 液体培地、M Y 寒天培地 (29) を用いて観察した (Fig.2-3)。

本菌株の細胞の形態は、楕円形で、大きさは、 $3.0 \sim 5.3 \times 4.0 \sim 5.3 \mu\text{m}$ 、仮性菌糸および子嚢胞子の形成は認められなかった。糖の発酵性はなく、各種炭素化合物の同化性はラクトースが特に強くイノシトールも同化した。硝酸還元能は認められず、ビタミン要求性でグルコースからデンプン様物質を形成した。

これらの特徴から、The Yeasts a Taxonomic Study (28) の分類法に従い、OKN-4 株を Cryptococcus laurentii に属するものと同定した。

Table 2-3. Characteristics of strain OKN-4.

| Characteristics | OKN-4 |
|--|----------------------------------|
| Cell morphology and cell size : | round, (3.0~5.3) × (4.0~5.3) μ m |
| Growth on malt agar : | cream-colored, smooth |
| Pseudomycelium : | - |
| Ascospore : | - |
| Assimilation of carbon compounds : | |
| Glucose + Melezitose | + Inositol + |
| Galactose + Inulin | + Dulcitol + |
| L-Sorbose + Salicin | + D-Mannitol + |
| Sucrose + D-Xylose | + D-Sorbitol + |
| Maltose + L-Arabinose | + α-Methyl-D-glucoside + |
| Cellobiose + D-Arabinose | + Erytitol + |
| Trehalose + D-Ribose | + Succinate + |
| Lactose + L-Rhamnose | + Soluble Starch ± |
| Melibiose + Ethanol | + Citrate - |
| Raffinose + Glycerol | + DL-Lactic acid - |
| Assimilation of nitrate : | - |
| Growth in vitamin-free medium : | - |
| Starch formation : | + |
| Urease : | + |
| Cycloheximide resistant : | - |
| Acid production : | - |
| Gelatin liquefaction : | - |
| Growth on 50% (W/W) glucose-yeast extract agar : | - |
| Growth at 37°C : | + |

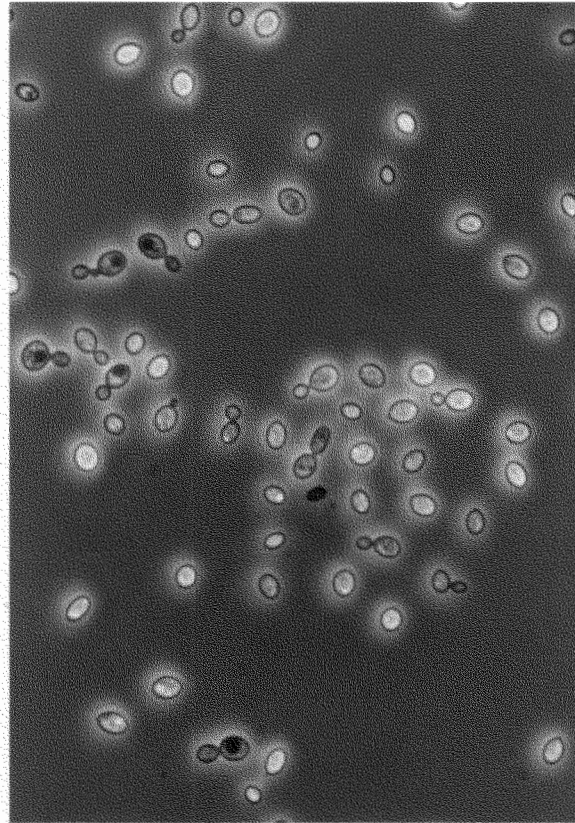


Fig.2-3 Micrographs of Cryptococcus laurentii OKN-4 cells.
Bar: 20 μ m.

4. 考察

集積培養法によりラクトースからガラクトオリゴ糖を生成する菌株のスクリーニングを行ったところ、酵母、カビ、放線菌など、ガラクトオリゴ糖を生産するさまざまな微生物を得た。今回のスクリーニングにおいて、多量のガラクトオリゴ糖を生成するものには酵母が多く見受けられた。その中でもOKN-4株が最も単一のガラクトオリゴ糖を高収率で生成し、この菌株の同定を行ったところ、Cryptococcus laurentii に分類された。

ガラクトオリゴ糖のうちには β -ガラクトシダーゼの転移作用によってラクトースから生成されるものがあることが知られていた。Wallenfels(21)は1951年に、Aspergillus flavusの β -ガラクトシダーゼでラクトースを加水分解した時、オリゴ糖が生成することを初めて報告している。

その後、Saccharomyces fragilis (22,23)、Saccharomyces lactis (24,25)、Penicillium chrysogenum(27)、Bacillus circulans (30)、Escherichia coli(31)、Aspergillus niger (32)の諸菌株でもそれぞれラクトースから3~5種類のガラクトオリゴ糖を生成することが報告されている。

一方、今回のスクリーニングで得たCryptococcus laurentii OKN-4株は、ラクトースを含む培地で培養

を行った場合、単一のガラクトオリゴ糖 (GO-1) のみを大量に生成しその他のオリゴ糖をほとんど生成しないことが大きな特徴であった。

ガラクトオリゴ糖は自然界において、ほ乳類の乳汁に多く分布していることが知られており、Kuhnら(33)やMontreuilら(34)によって乳汁中のオリゴ糖の構造解析が行われている。Yamasitaら(19)は、6'-ガラクトシルラクトース ($\underline{0}-\beta-D\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\underline{0}-\beta-D\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}D\text{-glucopyranose}$) を、Danaldら(20)は、3'-ガラクトシルラクトース ($\underline{0}-\beta-D\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\underline{0}-\beta-D\text{-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}D\text{-glucopyranose}$) がヒト乳汁に存在することを報告している。これらガラクトオリゴ糖は、最近、ヒトの腸内優勢菌であるビフィズス菌の増殖物質として期待されている。

5. 要約

ラクトースからガラクトオリゴ糖を大量に生成する微生物を、集積培養法を用いて検索を行った。土壤中より1019株の微生物を分離したところ、ガラクトオリゴ糖生成菌株として、細菌、酵母、カビ、放線菌などさまざまな微生物を得た。これらの中で Cryptococcus laurentii OKN-4株と同定された酵母が、ラクトース

から単一のガラクトオリゴ糖（GO-1）を著量に生成することを見出した。

第 3 章 Cryptococcus laurentii OKN-4株の生産するガラクトオリゴ糖の分離・精製と構造解析

1. 序

ラクトースからガラクトオリゴ糖 (GO-1 と略記) を大量に生成する Cryptococcus laurentii OKN-4株を土壌中より分離した。これまで微生物によって数多くのガラクトオリゴ糖が生成されること (Table 1-2) が知られていたが、Cryptococcus laurentiiによるガラクトオリゴ糖の生成は報告されていなかった。そこで、この菌株が生産するガラクトオリゴ糖の構造を明らかにするため培養液から分離・精製し、GC-MSや¹H-NMRなどの機器分析によりGO-1構造の決定を行った。

2. 実験方法

カーボン・セライトカラムクロマトグラフィー
ガラクトオリゴ糖の分離のために、カーボン・セライトカラム (1:1, φ 50×740mm) を使用した。カーボンはクロマトグラフ用活性炭 (和光純薬工業㈱)、セライトはセライト 545 (純正化学工業㈱) を用いた。

培養濾液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した濃縮液 100ml を、カラムへ 300ml/hr の流速で通液した。

次いで4.5 lの水を500ml/hrで流し単糖を溶出させ、2.5%エタノール溶液4.1 lを1000ml/hrの流速で流しラクトースを溶出させた後、5.0%エタノール溶液3.5 l、10%エタノール溶液2.0 lをそれぞれ1000ml/hrの流速で流し、GO-1の溶出を行った。GO-2は20%エタノール3.0 lで溶出した。溶出液は250mlずつ分画し、フェノール硫酸法(37)で全糖量の測定を行った。

GO-1の結晶化 純度97.3%のGO-1凍結乾燥物を適量の水に溶解し、メタノールで希釈した後、アセトンを溶液が少し白濁するまで徐々に添加した。白濁した液を4℃で2日間放置し、針状白色のGO-1の結晶を析出させた。

糖の定量 全糖量はフェノール硫酸法(37)、還元糖量はソモジー・ネルソン法(38)で測定した。

GO-1の定量 結晶GO-1を標準品として、HPLCによるピーク面積から培養液中のGO-1量(g数)を測定した。

薄層クロマトグラフィー(TLC) 薄層プレートはKieselgel 60 20cm×20cm (Merck社)を用い、培養濾液を直接スポットし、n-ブタノール・ピリジン・水(60:25:15)で室温下、4時間展開した。オリゴ糖の検

出には、0.2%ナフトレゾルシン/エタノール、20%硫酸を用い発色を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 日立 655A-11型高速液体クロマトグラフィーを用い以下の条件で行った。

カラム: LiChrosorb NH₂カラム φ4×250mm (Cica-Merck社), 溶液: アセトニトリル・水(70:30), 温度: 室温, 流速: 1.0ml/min, 検出器: Shodex RI SE31型示差屈折検出器

なお培養液をミリポアフィルター(0.45μ)で濾過したものを試料液としインジェクションした。

G O - 1 の 酵 素 加 水 分 解 pH7.0の60mMリン酸緩衝液に溶かした1%G O - 1溶液2.0mlに、市販のホラ貝由来のβ-ガラクトシダーゼ(生化学工業株)、あるいは、Mortierella vinaceu由来のα-ガラクトシダーゼ(生化学工業株)0.1ml(50U/ml)を加え、30℃で1時間反応を行った。加水分解の様子は反応液をHPLCで分析し、G O - 1の加水分解物を調べた。

G O - 1 の 還 元 G O - 1 500mgを水25mlに溶解し、水素化ホウ素ナトリウム500mgを添加後室温で4時間攪拌しながらG O - 1の還元を行った。

G O - 1 の アセチル化 G O - 1 50mg に 無水酢酸とピリジン各1mlを加え、封管後10時間沸騰浴中で加熱した。反応液を氷水100mlに注加し、G O - 1 の完全アセチル体を無定型粉状固体として沈澱させた。

G O - 1 の メチル化 箱守法 (39) により、G O - 1 500mg を乾燥ジメチルスルホキシド10mlに溶解した後、メチルスルフィニルカルバニオン8mlとヨウ化メチル6mlで処理しメチル化した。

メチル化アルジトールアセテートの調製

Yamashitaらの方法(19)に従って行った。完全メチル化G O - 1 を90%ギ酸10mlに溶解、封管中100℃にて3時間加熱した。反応液を30℃で減圧濃縮し、さらにメタノールでギ酸を共沸留去した。次に、残渣を0.25N硫酸10mlに溶解し、封管中で90℃にて16時間加熱した。イオン交換樹脂IRA-401(OH⁻)で硫酸を中和し、シロップ状加水分解物を得た。次いで、G O - 1 の還元、アセチル化の方法と同様な方法で上記シロップ状加水分解物を還元、アセチル化し、オイル状のメチル化アルジトールアセテート混合物を得た。メチル化アルジトールアセテート混合物1滴を酢酸エチル1mlに溶解し、その3~5μlをGC-MSで分析した。

G C - M S 分析 日立M-80 Mass Spectrometerに

て以下の条件で測定した。

イオン化電圧： 70 eV, カラム： ϕ 3.4 mm \times 1 m, 担体：
ケイソウ土 ユニポート HP (ガスクロ工業株), 液層： OV-1,
キャリアーガス： He, 流速： 20 ml/min, 注入口温度： 150°C,
カラム恒温槽温度： 180°C。

^1H -NMR分析 Varian社製、EM-390, 90MHz

Spectrometerにて測定した。測定溶媒として重クロロホルム、
内部基準としてTMS (テトラメチルシラン) を使用した。

3. 実験結果

G O - 1 の分離・精製

1) 培養液 Table 2-1に示した培地のラクトース濃度を5%にし、
500ml容三角フラスコ10本を用い、30°Cで4日間 Cryptococcus laurentii
OKN-4株を培養した。培養液800mlを遠心分離器 (8000 rpm, 10 min.)
で菌体を除去し、上澄液を0.45 μ mのミリポアフィルターで濾過した。
この濾液をロータリーエバポレーターを用い約100mlまで減圧濃縮した。

2) カーボン・セライトカラムによる分画 濃縮液100mlを、
カーボン・セライトカラムで分画し、フェノール硫酸法で全糖量の測定を行った。
TLCでG O - 1

画分の確認を行い、フラクションNo.36～57の5.5 lをGO-1画分として集め、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

濃縮液を凍結乾燥し、純度97.3%のGO-1を8.3g得た。次いで凍結乾燥GO-1の結晶化を行い、針状白色のGO-1の結晶6.2gを得た(Fig.3-1)。この結晶をTLCおよびHPLCで純度を調べ単一であることを確認した。

GO-1の構造決定

1) 構成糖の分析 GO-1を1N塩酸中で100℃、60分間加熱し、完全加水分解してHPLCで分析するとグルコースとガラクトースが1:2の割合で生成した。また、GO-1を0.1N塩酸中で100℃、30分間加熱し部分加水分解するとラクトースとグルコースとガラクトースが検出された。

2) 分子量・構成糖数の決定 GO-1の完全メチル化物および完全アセチル化物の分子量をマススペクトルから求めたところ、それぞれ658および966であった。従ってGO-1自体は分子量504の三糖類であることが明らかになった。

3) 還元末端の決定 GO-1を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、1N塩酸中で100℃、60分間加熱し加水分解すると、TLC上で単糖としてはガラクトースのみが検出され、グルコースは検出されなかった。また、GO-1の全糖量対還元糖量比が3:1であることから、

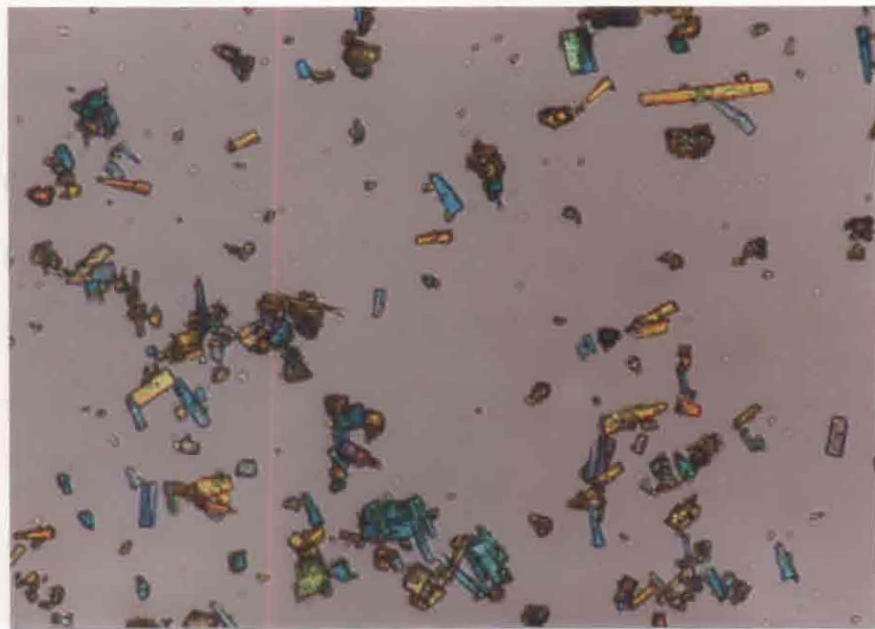
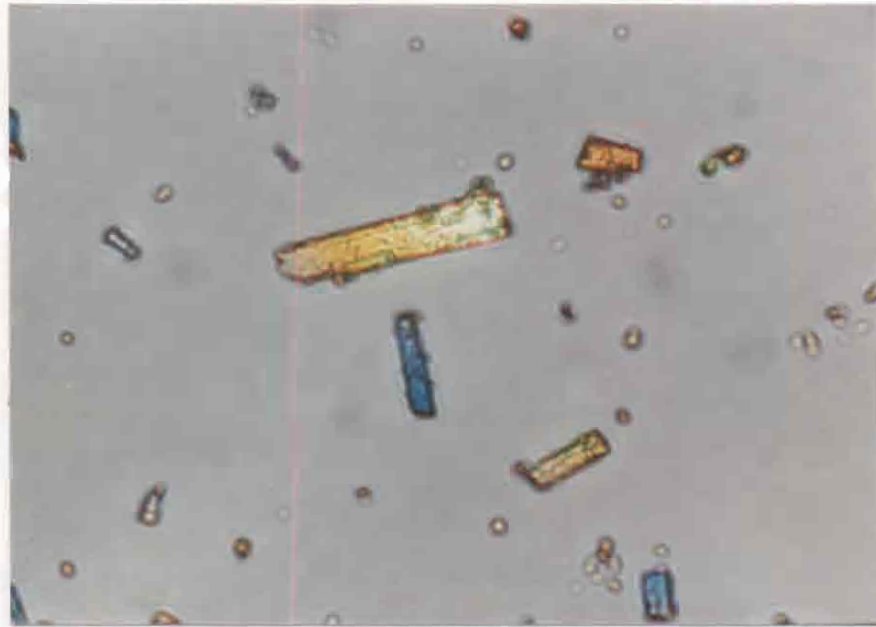


Fig.3-1 Crystal of GO - 1 .

グルコース残基が還元末端であることが確認された。

4) 構成糖の配列と結合位置の決定 G O - 1 の完全メチル体を加水分解し、次いで水素化ホウ素ナトリウムで還元後アセチル化して得たメチル化アルジトールアセテート混合物を、GC-MS分析した。

Fig.3-2に示すように、マスキロマトグラム上に保持時間1.9分(m/e 323)、2.4分(m/e 351)、2.7分(m/e 351)の3ピークが検出された。ラクトースを同様に処理、分析して得られたデータとの比較などから、それぞれ 1,5-di-0-acetyl-2,3,4,6-tetra-0-methyl-galactitol、1,4,5-tri-0-acetyl-2,3,6-tri-0-methyl-glucitol、1,4,5-tri-0-acetyl-2,3,6-tri-0-methyl-galactitolのM + 1ピークと同定された。

従って、還元末端がグルコース残基であることから、G O - 1 の構成糖の配列と結合位置は、Gal(1→4)Gal(1→4)Glcと決定された。

5) 結合様式の決定 G O - 1 中の2箇所の糖-糖間結合様式を決定するため、G O - 1 の完全メチル体の¹H-NMRにおけるアノメリックプロトン・シグナルをラクトースの完全メチル体のアノメリックプロトン・シグナルと比較することにより解析したところ、2箇所ともβ結合であることが明らかになった(Table 3-1)。

また、ホラ貝由来のβ-ガラクトシダーゼでG O - 1 の加水分解を行ったところ、グルコースとガラクトー

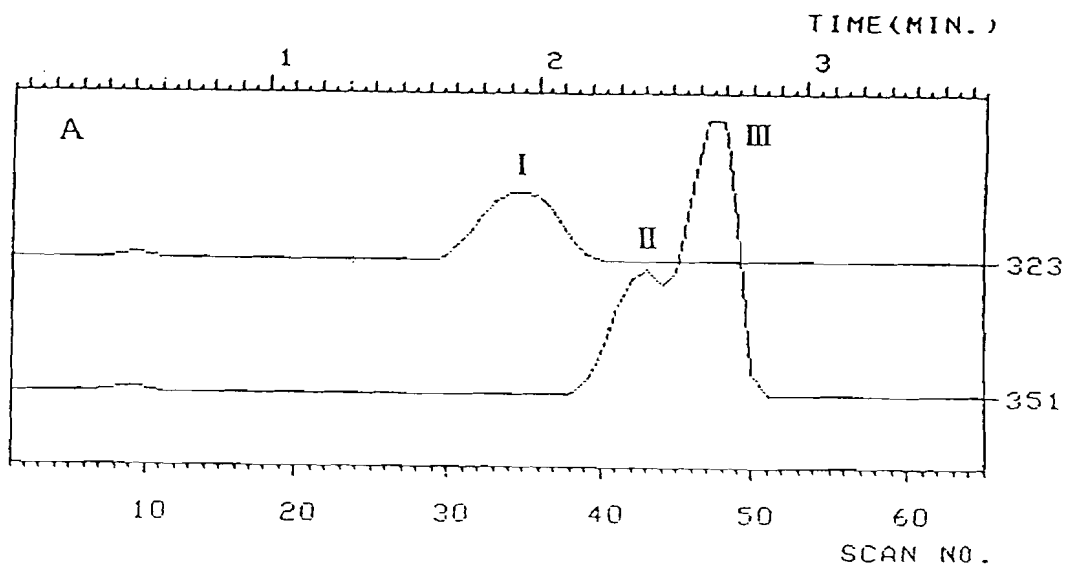


Fig.3-2. Mass spectrograms of the alditols obtained from G0-1 by permethylation, hydrolysis and NaBH_4 reduction followed by acetylation.

- I 2,3,4,6-tetra-O-Me-1,5-di-O-Ac-Galactitol ($m/e, 323, M+1$)
- II 2,3,6-tri-O-Me-1,4,5-tri-O-Ac-Glucitol ($m/e, 351, M+1$)
- III 2,3,6-tri-O-Me-1,4,5-tri-O-Ac-Galactitol ($m/e, 351, M+1$)

Table 3-1. Analysis of proton signals of permethylated G0-1 and lactose by ¹H-NMR spectra (90MHz).

| | H-1 | | H-1' | | H-1'' | |
|-----------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | Chemical shift | Coupling constant | Chemical shift | Coupling constant | Chemical shift | Coupling constant |
| | δ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | δ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | δ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) |
| | ration | | ration | | ration | |
| | configu- | | configu- | | configu- | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Permethylated lactose | 4.80 | 3.90 | 4.31 | 7.05 | - | - |
| (α -anomer) | | | | | | |
| Permethylated lactose | 4.13 | 7.05 | 4.32 | 6.90 | - | - |
| (β -anomer) | | | | | | |
| Permethylated G0-1 | 4.77 | 3.60 | 4.29 | 6.90 | 4.58 | 6.75 |
| (α -anomer) | | | | | | |
| Permethylated G0-1 | 4.14 | 7.50 | 4.34 | 6.90 | 4.59 | 6.75 |
| (β -anomer) | | | | | | |

スに加水分解された。一方、Mortierella vinaceu 由来の α -ガラクトシダーゼではまったく加水分解されなかった。この結果からも G O - 1 中の 2 箇所の糖-糖間結合様式が β 結合であることが証明された。

以上の分析結果より G O - 1 の構造を、 $\underline{0}$ - β - D -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $\underline{0}$ - β - D -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- D -glucopyranose と決定した。

なお、元素分析値は $C_{18}H_{32}O_{16}$ としての理論値：C, 42.90%; H, 6.40% に対し実験値：C, 42.47%; H, 6.30% であった。また、結晶の融点は 229.5~230.5 $^{\circ}C$ 、旋光度は $[\alpha]_D + 61^{\circ} \rightarrow 39^{\circ}$ であった。この値は Gorin ら (26) が報告している $\underline{0}$ - β - D -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $\underline{0}$ - β - D -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- D -glucopyranose の構造を有するオリゴ糖の測定値 (融点; 228~231 $^{\circ}C$ 、 $[\alpha]_D + 68^{\circ} \rightarrow 45^{\circ}$) とほぼ同じであった。

G O - 1 の構造式を Fig. 3-3 に示した。

G O - 2 も G O - 1 同様に分離精製を行なったが微量であるため、グルコースとガラクトースが 1 対 3 の構成比のガラクトオリゴ糖である以外は解析できなかった。

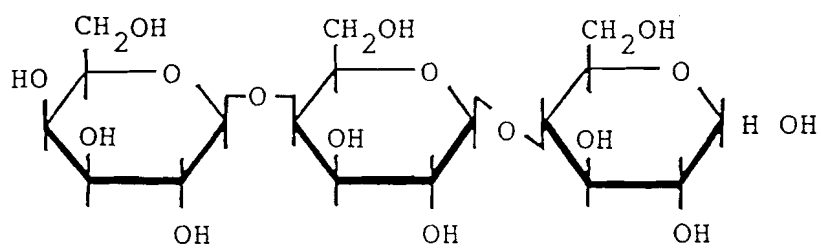


Fig.3-3. Structure of 4'-galactosyl lactose

α - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)

- α - β -D-galactopyranosyl

-(1 \rightarrow 4)-D-glucose

4. 考察

結晶化したGO-1の加水分解、¹H-NMR分析、GC-MS分析を行い糖-糖間の結合様式および結合位置を決定しGO-1の構造解析を行なったところ、GO-1は β -D-galactopyranosyl-(1→4)- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranoseであることが明らかになった。このガラクトオリゴ糖はラクトースのガラクトース残基の4位にガラクトースがもうひとつ β 1-4結合した三糖類であるので、一般には4'-ガラクトシルラクトース(4'-GLと略記)とよばれる。

Gorinら(26)も、Sporobolomyces singularisを用いて同様なガラクトオリゴ糖の生成を確認しているが、三糖類の他に四糖類も同時に多く生成すると報告している。Table 1-2に示したように、これまで微生物によって数多くのガラクトオリゴ糖が生成されることが知られていたが、4'-ガラクトシルラクトースのみを大量に生成することは報告されていなかった。

5. 要約

土壌中より分離したCryptococcus laurentii OKN-4株がラクトースから、三糖類のガラクトオリゴ糖(GO-1)を著量に生成することを見出した。生成

したガラクトオリゴ糖 (GO-1) を GC-MS や $^1\text{H-NMR}$ などの機器分析により構造解析を行い、 $\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-glucopyranose}$ と同定した。

第4章 Cryptococcus laurentii OKN-4株の
4'-ガラクトシルラクトース生成酵素の
精製と諸性質

1. 序

Cryptococcus laurentii OKN-4株はラクトースから
 $0-\beta-D-galactopyranosyl-(1\rightarrow4)-0-\beta-D-galacto-$
 $pyranosyl-(1\rightarrow4)-D-glucopyranose$ (4'-ガラクトシルラクト
ース, 4'-GLと略記) の構造を持つガラクトオリゴ糖を大
量に生成することが明らかになった。4'-GLは、
Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダー
ゼのガラクトース転移反応によって、ラクトースのガ
ラクトース残基が他のラクトースに転移し生成したと
考えられる。

β -ガラクトシダーゼ ($\beta-D-galactoside$ galacto-
hydrolase E.C.3.2.1.23)は動物、植物、微生物等に広
く存在していることが知られ、微生物では、
Escherichia coli (40,41)、Aspergillus oryzae (42)、
Kluyveromyces fragilis (43)、Aspergillus
foetidus (44)などから多くの β -ガラクトシダーゼが
分離、精製されその特性が報告されている。

さらに、 β -ガラクトシダーゼはラクトースの β -ガ
ラクトシド結合を加水分解するだけではなく、転移作
用も有していることが古くから知られている。そして
Saccharomyces fragilis (22,23)、Saccharomyces

lactis (24,25)、Sporobolomyces singularis (26)、Penicilium chrysogenum (27)、など多くの微生物 β -ガラクトシダーゼによってラクトースからガラクトオリゴ糖が生成することが報告され、その構造解析が行われた。

4'-GLもこれらの微生物同様 β -ガラクトシダーゼの転移反応によって生成されたと考えられるため、Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼを分離、精製しその特性を調べた。さらに、この酵素を利用して種々のオリゴ糖生成の検討を行った。

2. 酵素の精製

2-1. 実験方法

培養方法 500ml容三角フラスコに80mlの培地を入れ、Cryptococcus laurentii OKN-4株の前培養菌体液1mlを加え、30℃、160rpmの条件で回転振とう培養を行った。培地はTable 2-1に示したものを基本培地(ただしラクトースは2.5%)として使用し、48時間培養を行った。ラクトースは、純正化学工業㈱の特級試薬を用いた。

β -ガラクトシダーゼ活性測定法 β -ガラクトシ

ダーゼ活性は O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (東京化成工業 株)、またはラクトース (純正化学工業 株) を基質として測定した。

ONPGによる活性測定は、5mM ONPG 1.0ml、McIlvaine緩衝液 (pH5.0) 2.0mlに酵素液 1.0mlを加え 40℃で 30分間反応を行った。反応液に 1.0M Na_2CO_3 1.0mlを加え反応を停止した後、遊離した O-nitrophenolを日立分光光度計 (U-3200)を用い、420nmの吸光度を測定した。

β -ガラクトシダーゼ活性単位は、pH5.0、40℃で 1分間に $1\mu\text{mol}$ の O-nitrophenolを遊離する力価を 1 unitとした。

また、ラクトースを基質とした場合、ラクトースから遊離したグルコース量を測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性とした。10%ラクトース 1.0ml、McIlvaine緩衝液 (pH5.0) 2.0mlに酵素液 1.0mlを加え 40℃で 30分間反応を行った。反応液を沸騰浴中で 5分間加熱し反応を停止した後、反応液 $20\mu\text{l}$ をサンプリングし、これに 3mlのグルコース測定試薬 (Glucose B-Test Wako、和光純薬工業 株) (45)を加え 37℃で 20分間反応を行い、505nmの吸光度を測定し生成したグルコース量を求めた。

β -ガラクトシダーゼ活性単位は、pH5.0、40℃で 1分間に $1\mu\text{mol}$ のグルコースをラクトースから遊離する力価を 1 unitとした。酵素の比活性は酵素タンパク 1mg 当りの unit (units/mg protein)で表した。

タンパク量の測定

酵素のタンパク量はLowry法

(46)を用い、牛血清アルブミンを標準タンパクとして定量した。また、カラムクロマトグラフィーによって分画された酵素のタンパク量は、280nmの紫外部吸収によって測定した。

ディスクポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)

Orstein-Davisの方法(47,48)に従い、7.5%ポリアクリルアミドゲル(pH8.9)にて行った。

泳動後ゲルを0.1% Coomassie Brilliant Blue、45%メタノール含有9%酢酸溶液により染色し、5%メタノール含有7.5%酢酸溶液により脱色した。

2 - 2. 実験結果

菌体破碎

Cryptococcus laurentii OKN-4株の培

養液10 lから遠心分離(5000rpm、10分)により菌体の回収を行い209g(湿重量)の菌体を得た。菌体を蒸留水で4回洗浄後、160mlの酢酸エチルと40mlの20mM磷酸緩衝液(pH5.8)を加え、4℃で24時間インキュベートした。処理菌体を蒸留水で5回洗浄後、再び蒸留水に懸濁し、1lの菌体懸濁液を調製した。これを冷却しながらマントンゴーリング菌体破碎機により破碎(8000psi、10回)し、破碎物を蒸留水で4回洗浄した。遠心分離(5000rpm、10分間)により破碎物を回収した後、

凍結乾燥により27.6gの菌体破砕物を得た。

顕微鏡観察により、得られた破砕物のほとんどが細胞壁画分であることが確認された。破砕前の菌体および細胞壁画分のONPGに対する β -ガラクトシダーゼ活性はそれぞれ、3.6U/g(乾燥菌体)、9.9U/g(乾燥細胞壁画分)であった。

β -ガラクトシダーゼの精製

1) ザイモリエース20-Tによる酵素の可溶化

27.6gの細胞壁画分を690mlのMcIlvaine緩衝液(pH5.0)に懸濁し、0.01%のザイモリエース20T(生化学工業株)を加え30℃3時間インキュベートした。インキュベート後細胞壁画分懸濁液をTOYOろ紙No.2で濾過し、ろ液を脱イオン水で一夜透析した。透析液を凍結乾燥し、4.0gの粗酵素標品を得た。

2) DEAE-Sephadex A-50クロマトグラフィー

ザイモリエース20Tにより細胞壁画分から可溶化した粗酵素を340mlの20mM磷酸緩衝液(pH5.8)に溶解し、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-50(Pharmacia Fine Chemicals社)のカラム(ϕ 50×740mm)に供した。20mMの同緩衝液にて洗浄後、0~1.0M NaCl(20mM磷酸緩衝液(pH5.8))によるリニアグラディエントにより流速70ml/hで溶出した。フラクションNo.100~160の活性画分900mlを脱イオン水で一夜透析し、凍結乾燥により1.75gの粗酵素標品を得た(Fig.4-1)。

3) TSKgel Toyo Pearl HW-55Sによるゲル濾過

DEAE-Sephadex A-50クロマトグラフィーで得た酵素活性画分1.75gを24mlの20mM燐酸緩衝液(pH5.8)に溶解し酵素液とした。酵素液4mlを20mM燐酸緩衝液(pH5.8)で平衡化したTSKgel Toyo Pearl HW-55S(東ソー(株))カラム(ϕ 22×750mm)に供し同緩衝液にて流速1.0ml/minでゲル濾過を行った。同じ条件で6回ゲル濾過を繰り返し、フラクションNo.42~50の活性画分108mlを得た(Fig.4-2)。脱イオン水で一夜透析し、凍結乾燥により9.0mgの粗酵素標品を得た。

4) TSKgel DEAE-5PWによるHPLC

TSKgel Toyo Pearl HW-55Sによるゲル濾過で得た酵素活性画分9.0mgを12mlの20mM燐酸緩衝液(pH5.8)に溶解し酵素液とした。酵素液3mlを20mM燐酸緩衝液(pH5.8)で平衡化したTSKgel DEAE-5PW(東ソー(株))カラム(ϕ 7.5×75mm)に供した。酵素画分は東ソー(株)のHPLCシステムを用い、20mMの同緩衝液にて洗浄後、0~1.0M NaCl(20mM燐酸緩衝液(pH5.8))によるリニアグラディエントにより流速60ml/hで溶出した。同じ条件で4回分画を繰り返し、フラクションNo.36,37の活性画分8mlを得た(Fig.4-3)。脱イオン水で一夜透析し、凍結乾燥により2.0mgの酵素標品を得た。この酵素はディスク電気泳動法で単一のバンドを示した(Fig.4-4)。

以上の精製結果をTable 4-1に示した。酵素は細胞壁可溶化画分より比活性は246倍まで精製され収率は25%

であった。

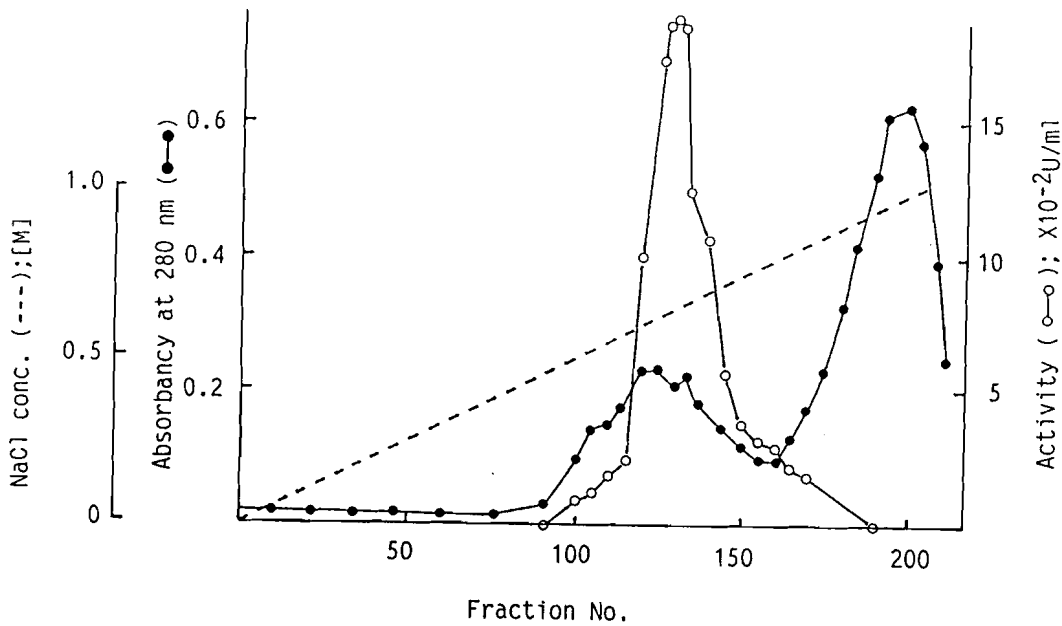


Fig.4-1. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of crude β -galactosidase from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. The crude enzyme was put on a DEAE-Sephadex A-50 column (ϕ 50 \times 740mm) equilibrated with 20mM phosphate buffer, pH5.8. Gradient elution was done with 1.0M NaCl in 20mM phosphate buffer, as indicated by the dotted line. Fifteen ml fractions of eluent were collected at a flow rate of 70ml per hr. β -Galactosidase activities were assayed with lactose as a substrate by the standard method. ○-○: β -galactosidase activity, ●-●: absorbance at 280nm,: NaCl concentration.

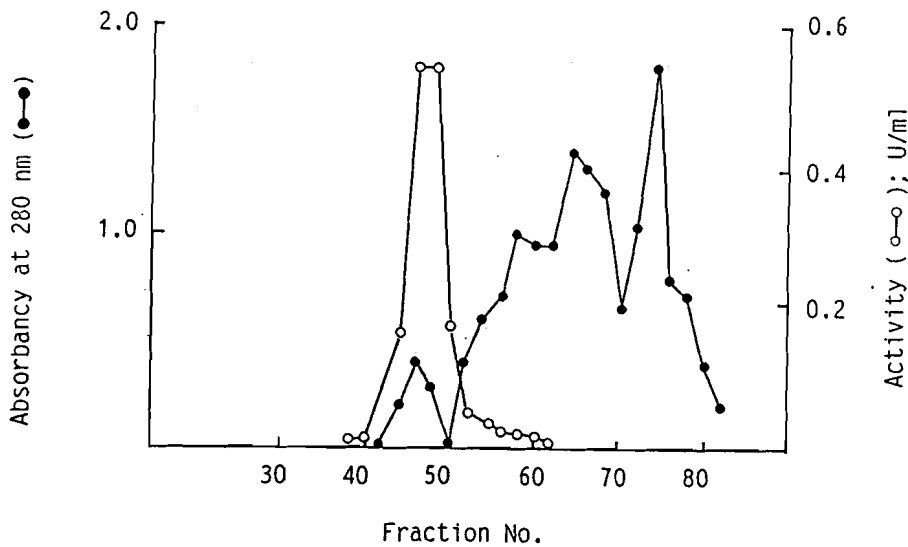


Fig.4-2. TSK gel Toyo Pearl HW-55S column chromatography of crude β -galactosidase from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. The enzyme preparation was put on a TSK gel Toyo Pearl HW-55S column (ϕ 22 \times 750mm) equilibrated with 20mM phosphate buffer, pH5.8, and eluted with the same buffer. Three ml fractions of eluent were collected at a flow rate of 60 ml per hr. β -Galactosidase activities were assayed with lactose as a substrate by the standard method. ○-○: β -galactosidase activity, ●-●: absorbance at 280nm,: NaCl concentration.

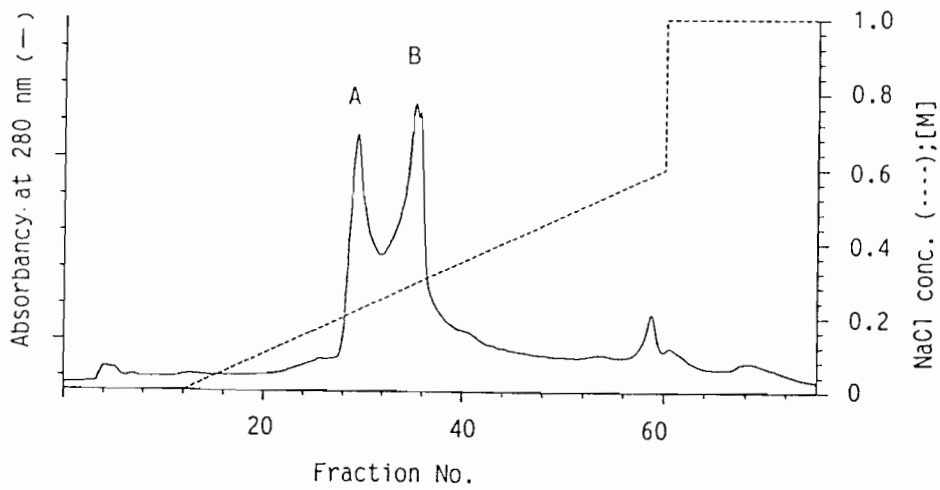


Fig.4-3. HPLC on TSK gel DEAE-5PW of β -galactosidase from *Cryptococcus laurentii* OKN-4.

The enzyme preparation was put on a TSK gel DEAE-5PW column ($\phi 7.5 \times 75$ mm) equilibrated with 20mM phosphate buffer, pH5.8. Gradient elution was done with 1.0M NaCl in 20mM phosphate buffer, as indicated by the dotted line. One ml fractions of eluent were collected at a flow rate of 60ml per hr. β -Galactosidase activities were assayed with lactose as a substrate by the standard method.

— : absorbance at 280nm, : NaCl concentration.

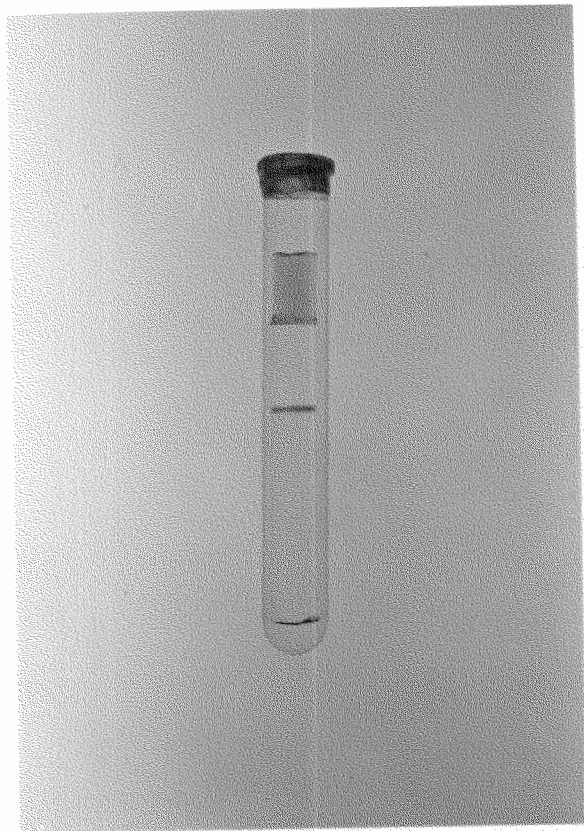


Fig.4-4. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified β -galactosidase.

Approximately $30 \mu\text{g}$ of the enzyme was put on. The gel concentration was 7.5%.

Table 4-1. Purification of β -galactosidase from Cryptococcus laurentii OKN-4.

| | Volume (ml) | Total Protein (mg) | Total Activity (unit) | Specific Activity (unit/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|--------------------|----------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|--------------|
| Solubilization | 340 | 1985 | 98.5 | 0.05 | 1.0 | 100.0 |
| DEAE-Sephadex A-50 | 24 | 185 | 61.5 | 0.33 | 6.7 | 62.4 |
| TSK gel | | | | | | |
| Toyo Pearl HW-55S | 54 | 9 | 43.9 | 4.86 | 97.9 | 44.6 |
| TSK gel DEAE-5PW | 8 | 2 | 24.6 | 12.3 | 246 | 25.0 |

3. 酵素の諸性質と転移反応の検討

3 - 1. 実験方法

ゲル濾過による分子量の測定 第4章の2 - 2で

述べた精製酵素を20mM磷酸緩衝液(pH5.8)で平衡化したTSKgel Toyo Pearl HW-55S(東ソー(株))カラム(ϕ 22×750mm)に供し同緩衝液にて流速1.0ml/minでゲル濾過を行った。同様に標準タンパクもゲル濾過を行い流出パターンから分子量を求めた

標準タンパクは thyrogloblin (669,000)、 ferritin (440,000)、 catalase (232,000)、 aldolase (158,000)、 bovine serum albumin (67,000)、 ribonuclease A (13,700)を用いた。

ディスク SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

(SDS-PAGE)

Orstein-Davisの方法(47,48)に従い、3-5%のアクリルアミドゲルグラディエントにより、0.12%のラウリル硫酸ナトリウム(SDS)存在下、pH8.8で電気泳動を行った。精製酵素を1% SDS、10% 2-メルカプトエタノールと2分間100℃で加熱し、SDS処理を行った。標準タンパクは、1% SDS、1% 2-メルカプトエタノール、1mMエチレンジアミン三酢酸と15分間60℃加熱した。

標準タンパクとして ferritin (220,000, 18,500)、

bovine serum albumin(BSA) monomer (67,000), BSA dimer (134,000)、 catalase (60,000)、 lactose dehydrogenase (36,000)を用いた。

泳動後ゲルを0.1% Coomassie Brilliant Blue、 45%メタノール含有9%酢酸溶液により染色し、 5%メタノール含有7.5%酢酸溶液により脱色した。

分子量は酵素の泳動距離より求めた。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 日立 655A-11型高速液体クロマトグラフィーを用い以下の条件で行った。

カラム: LiChrosorb NH₂カラム 4φ × 250mm (Cica-Merck社), 溶液: アセトニトリル・水(70:30), 温度: 室温, 流速: 1.0ml/min, 検出器: Shodex RI SE31型示差屈折検出器

なお酵素反応液をミリポアフィルター(0.45μ)で濾過したものを試料液としインジェクションした。

3 - 2. 実験結果

酵素の諸性質

1) 至適pHと至適温度 酵素反応に対するpHと温度の影響をONPGを基質に調べたところ、 40℃、 30分間反応において至適pHはpH4.3であった。 Fig.4-5 に示す

ように、酵素は酸性域において活性が高く、pH2.5でも最高活性の約70%を示した。一方、アルカリ域では活性が低く、pH7.0において相対活性は約10%にすぎなかった。

温度の影響を調べたところ、Fig.4-6に示すように、pH5.0、30分間反応において、60℃が最も高い活性を示したが、65℃では活性が急激に低下した。

2) pH安定性と温度安定性 酵素のpH安定性の結果をFig.4-7に示した。酵素を30℃で60分間、各pHの緩衝液でインキュベートした後、酵素の残存活性をONPGを基質に測定した。酵素はpH2.8~9.3の間で安定で、95%以上の残存活性を示した。しかし、pH2.0では残存活性は約20%であった。

酵素の熱安定性を調べた結果をFig.4-8に示した。pH5.0の条件下各温度において10分間加熱した後、ONPGを基質に残存活性を調べたところ、57.5℃以下では酵素は安定であったが、65℃になると完全に失活した。

3) 金属イオンと酵素阻害剤の影響 金属イオンと酵素阻害剤の酵素に対する影響を調べるため、0.5mlの酵素液と0.5mlの各種金属イオンまたは酵素阻害剤を混合し、30℃で10分間インキュベートした。その後、1.0mlの5mM ONPGと2.0mlのMcIlvaine緩衝液(pH5.0)を加え、40℃で30分間反応を行った。蒸留水0.5mlを加えてインキュベートしたものをコントロールとし、各種

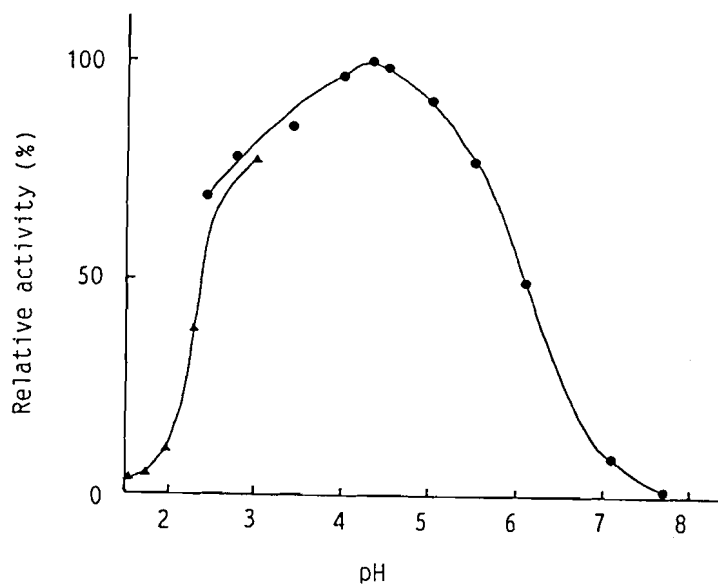


Fig.4-5. Effect of pH on the enzyme activity.

The reaction mixtures containing 1.0 ml of 5mM ONPG, 1.0 ml of enzyme solution and 2.0 ml of buffer solution were incubated at 40°C and various pH's for 30 min.

The buffers used were as follows: pH1.4 to 3.4, Glycine·NaCl-HCl buffer; pH2.4 to 7.7, McIlvaine buffer.

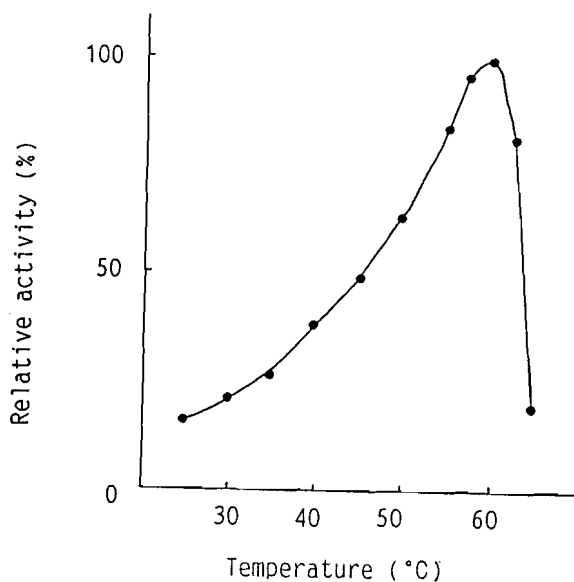


Fig.4-6. Effect of temperature on the enzyme activity.

The reaction mixtures containing 1.0 ml of 5mM ONPG, 1.0 ml of enzyme solution and 2.0 ml of McIlvaine buffer (pH5.0) were incubated at various temperatures and pH5.0 for 30 min.

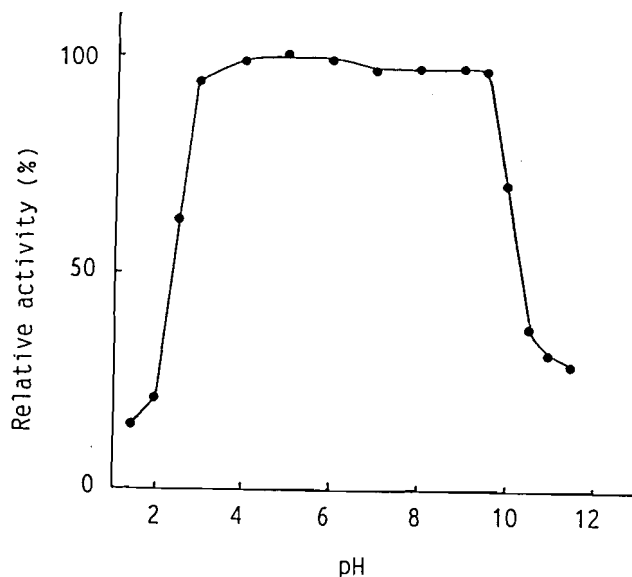


Fig.4-7. Effect of pH on stability of the enzyme.
 The enzyme solution was incubated at 30 °C for 60 min in an appropriate buffer and the residual activity was assayed with ONPG as a substrate by the standard method.
 Initial activities before incubation were expressed as 100%.
 The buffers used were as follows: pH1.4 to 3.4, Glycine·NaCl-HCl buffer; pH2.4 to 7.7, McIlvaine buffer; pH8.0 to 11.0, Kolthoff buffer.

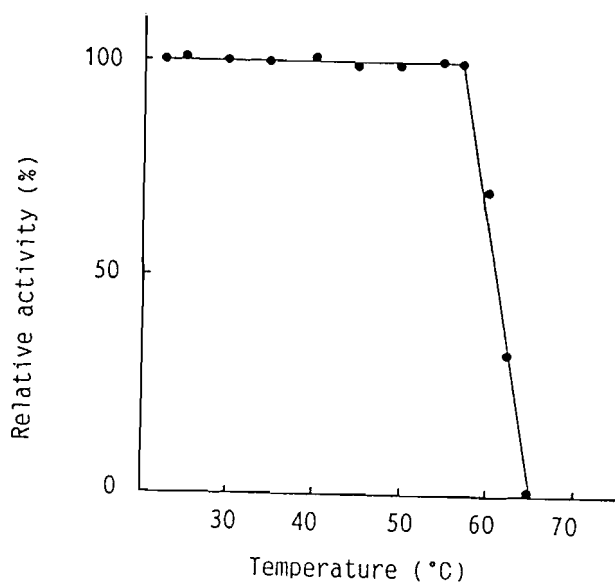


Fig.4-8. Effect of temperature on stability of the enzyme.
 After the enzyme was incubated in McIlvaine buffer (pH5.0) at various temperatures for 10 min, the remaining activities were assayed with ONPG as a substrate by the standard method.

金属イオンまたは酵素阻害剤添加による相対活性を測定し Table 4-2 に示した。酵素活性は、 Hg^{2+} と Ag^+ 、2-メルカプトエタノールによって強く阻害を受けた。しかしながら、EDTA や PCMB などの阻害剤ではまったく阻害を受けなかった。

4) 各種糖質による影響 各種糖質の酵素活性に及ぼす影響を調べるため、反応液に 10mM の濃度になるように各糖質を添加し、金属イオンによる影響を調べた場合と同様な方法で阻害を調べた。各種糖質添加による活性を相対活性で表し Table 4-3 に示した。

酵素活性はマルトースによって強い阻害を受けることが明らかになった。また、グルコースとマルトトリオースもマルトースについて強い阻害が認められた。しかしながら、ガラクトースによる阻害はなかった。

5) 分子量 精製 β -ガラクトシダーゼの分子量を TSKgel Toyo Pearl HW-55S を用いたゲル濾過法 (Fig. 4-9) および、SDS-PAGE (Fig. 4-10) により測定したところ、それぞれ 200,000 と 100,000 であった。SDS-PAGE で酵素は単一バンドを示したことから、 β -ガラクトシダーゼは 2 つのサブユニットからなると考えられた。

6) K_m 値と V_{max} ONPG と ラクトースの各濃度における加水分解速度を調べ、Lineweaver Burk プロットからそれぞれの基質に対する K_m 値と V_{max} を計算した。精製 β -ガラクトシダーゼの ONPG と ラクトースに対する K_m 値はそれぞれ 18.2mM と 11.4mM であった。また、 V_{max}

Table 4-2. Effect of metal ions and other chemicals on the enzyme activity.

| Material | Concentration (mM) | Remaining activity (%) | Material | Concentration (mM) | Remaining activity (%) |
|---|--------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------------|
| None | 0 | 100 | MnSO ₄ | 0.5 | 97 |
| NaCl | 0.5 | 100 | ZnCl ₂ | 0.5 | 99 |
| KCl | 0.5 | 100 | SrCl ₂ | 0.5 | 99 |
| CaCl ₂ | 0.5 | 98 | LiSO ₄ | 0.5 | 106 |
| MgSO ₄ | 0.5 | 100 | Pb(CH ₃ COO) ₂ | 0.5 | 100 |
| AgNO ₃ | 0.5 | 27 | Iodoacetic acid | 0.5 | 100 |
| HgCl ₂ | 0.5 | 49 | PCMB ^a | 0.5 | 98 |
| CuSO ₄ | 0.5 | 100 | L-Cystein | 0.5 | 99 |
| CoCl ₂ | 0.5 | 99 | EDTA-2NA ^b | 0.5 | 100 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 0.5 | 100 | Mercapto ethanol | 0.5 | 61 |
| FeSO ₄ | 0.5 | 93 | Hydroxylamine hydrochloride | 0.5 | 89 |

^a p-Chloromercuribenzoate

^b Ethylenediaminetetraacetate

A mixture of 0.5 ml enzyme solution, 1.0 ml of 5mM ONPG and 2.0 ml of MacIlvaine buffer (pH5.0) was incubated at 40 °C for 30 min in the presence of 0.5 ml of water or reagent solution, and the activities were assayed.

Table 4-3. Effect of sugar on the enzyme activity.

| Sugar | Concentration (mM) | Relative activity (%) |
|-------------|--------------------|-----------------------|
| None | 0 | 100 |
| Glucose | 10 | 55 |
| Galactose | 10 | 92 |
| Fructose | 10 | 90 |
| Xylose | 10 | 76 |
| Arabinose | 10 | 78 |
| Ribose | 10 | 94 |
| Maltose | 10 | 18 |
| Maltotriose | 10 | 63 |
| Sucrose | 10 | 91 |

A mixture of 0.5 ml enzyme solution, 1.0 ml of 5mM ONPG and 2.0 ml of McIlvaine buffer (pH5.0) was incubated at 40 °C for 30 min in the presence of 0.5 ml of water or sugar solution, and the activities were assayed.

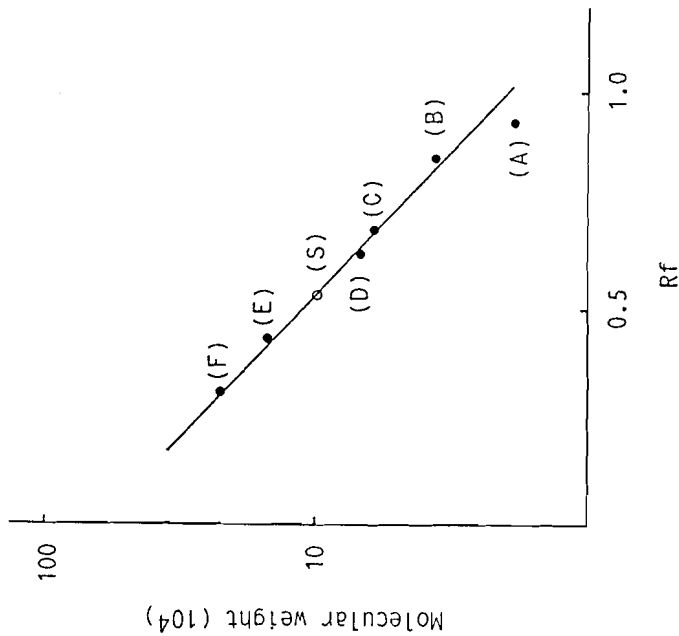


Fig. 4-10. Estimation of molecular weight of the purified enzyme by SDS-electrophoresis.
 Standard protein: (A):ferritin (18,500), (B):lactose dehydrogenase (36,000), (C):catalase (60,000), (D):bovine serum albumin(BSA) monomer (67,000), (E):BSA dimer (134,000), (F):ferritin (220,000), (S): purified enzyme.

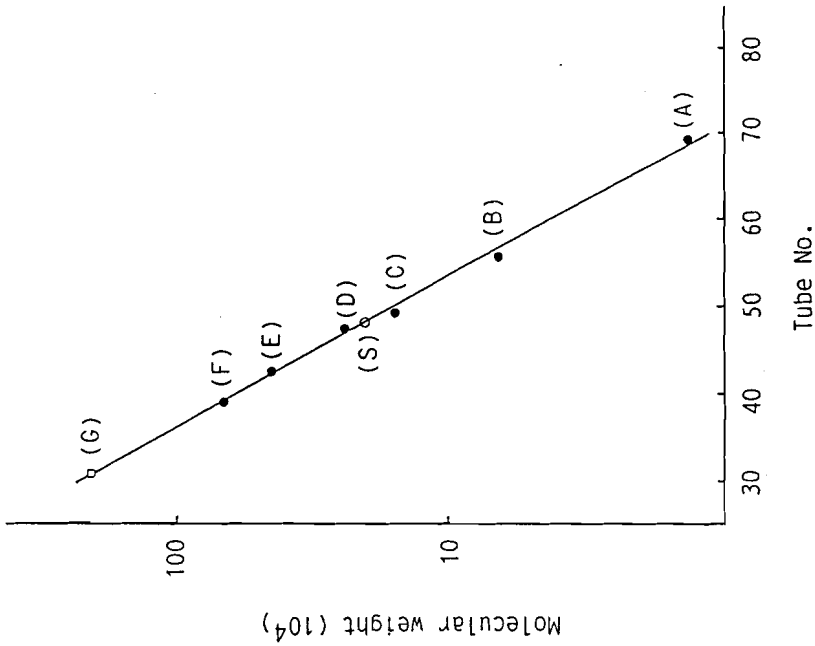


Fig. 4-9. Estimation of molecular weight of the purified enzyme by gel filtration.
 Column: TSK gel Toyo Pearl HW-55S column (ϕ 22X750mm), eluent: 20mM phosphate buffer(pH5.8), flow rate: 1.0ml/min, fraction: 3.0ml/tube.
 Standard protein: (A):ribonuclease A (13,700), (B):bovine serum albumin (67,000), (C):aldolase (158,000), (D):catalase (232,000), (E):ferritin (440,000), (F):thyroglobulin (669,000), (G): Blue dextran (2,000,000), (S): purified enzyme.

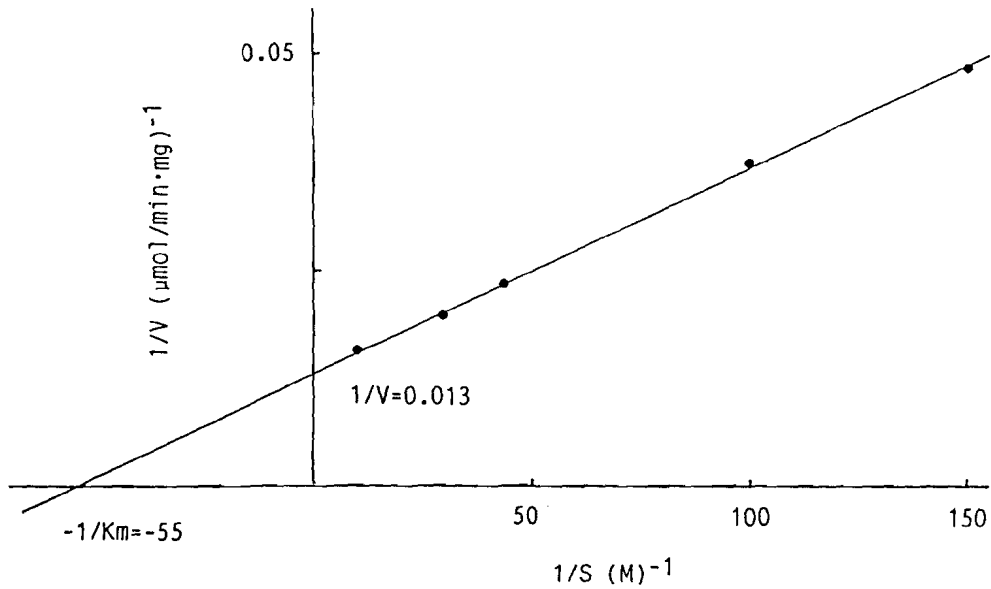


Fig.4-11. Lineweaver-Burk plots of activity of β -galactosidase. Assay was carried out at 40 °C and pH 5.0 for 30 min. ONPG was used as substrate.

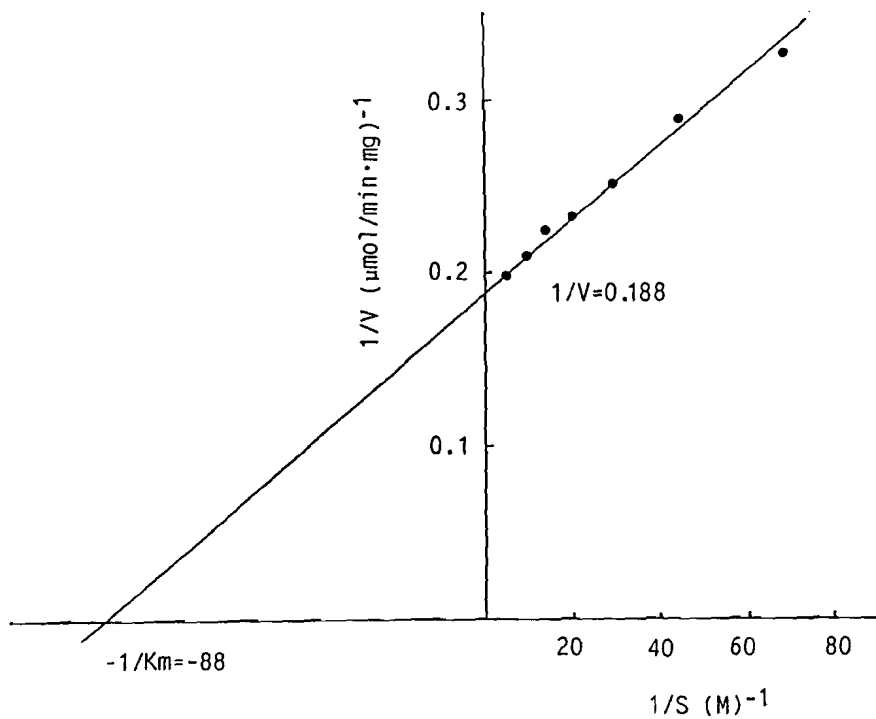


Fig.4-12. Lineweaver-Burk plots of activity of β -galactosidase. Assay was carried out at 40 °C and pH 5.0 for 30 min. Lactose was used as substrate.

はそれぞれ 76.9と 5.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ であった
(Fig. 4-11, 4-12)。

酵素のガラクトース転移活性

1) ラクトースからのオリゴ糖生成

5%ラクトース 0.5ml、McIlvaine緩衝液 0.25mlに酵素液 0.25mlを加え、50℃で29時間反応を行い反応生成物の経時変化を調べた。各時間における生成物はHPLCで分析した。Fig. 4-13に示したようにラクトースからのガラクトース転移生成物として4'-GLが多く生成し、反応16時間目において基質ラクトースに対し28.2%の収率に達したが、その後時間の経過とともに減少した。

一方、反応初期からラクトースとは異なる未知の二糖類がしだいに増加し、反応29時間後には収率11.4%に達した。また4'-GL以外の三糖類や四糖類と思われるオリゴ糖も認められ、反応に用いたラクトースに対し、それぞれ4.8%と2.8%の収率で生成した。

2) 各種糖質に対するガラクトース転移

本酵素の受容体特異性を、ガラクトース供与体としてラクトースを用いて調べた。10%ラクトース 0.25ml、各種糖質を10%含む溶液 0.25ml、McIlvaine緩衝液 0.25mlに酵素液 0.25mlを加え、50℃で12時間反応を行い、生成物をHPLCで調べた (Table 4-4)。

ラクチュロースやラクチトールを受容体とした場合、これら単独に酵素を働かせた場合に生成するオリゴ糖

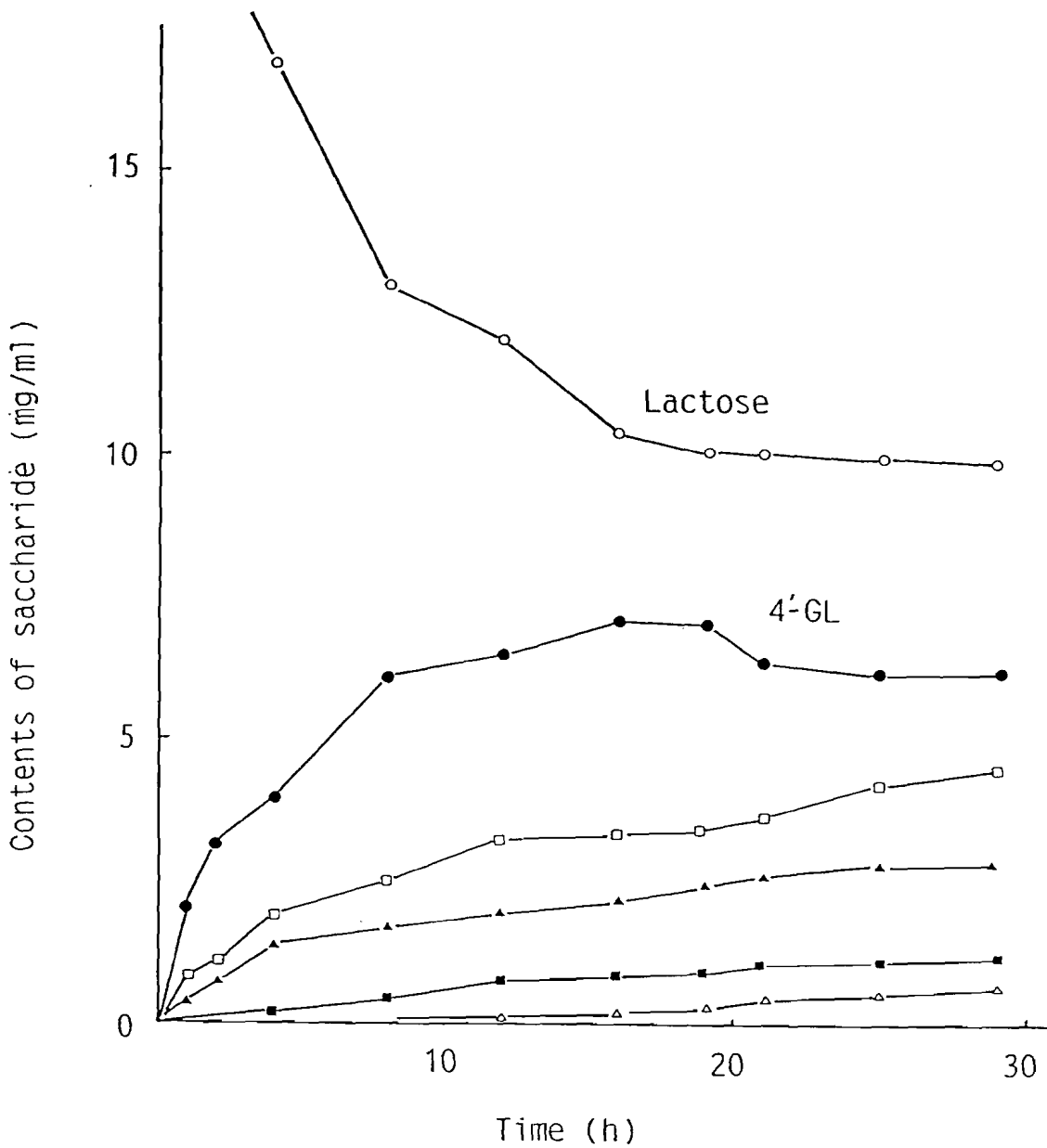


Fig.4-13. Course of lactose hydrolysis with β -galactosidase from *Cryptococcus laurentii* OKN-4.

The lactose solution (2.5%) was incubated with purified enzyme at 50°C, pH5.0.

○-○:lactose, ●-●:4'-GL, □-□:monosaccharide, ▲-▲:disaccharide
 ■-■:trisaccharide, △-△: tetrasaccharide.

とは異なるオリゴ糖のピークがいくつか認められた。また、キシロースやアラビノース、リボース、グルコース、ガラクトースなどの単糖を受容体とした場合、それぞれ結合様式が異なると思われるいくつかのオリゴ糖が生成した。一方、フラクトース、ソルビトール、マルトース、セロビオースなどを受容体とした場合、転移生成物は認められなかった。

3) ラクトース濃度と4'-GL生成

Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼの4'-GL生成に及ぼすラクトース濃度の影響を調べた。1%~20%濃度のラクトース溶液5種類を用いpH5.0、50℃で5時間反応を行い、4'-GL生成量をHPLCで測定した。Table 4-5に示すように、4'-GL生成量はラクトース濃度が高くなるに従い増加した。本酵素は低濃度のラクトースからも4'-GLを生成し、1%ラクトースから18.7%の高収率で4'-GLが生成された。

Table 4-4. Galactosyl transfer from lactose to several acceptors.

| Acceptor | Galactose transferred |
|----------------------|-----------------------|
| Lactose ^a | + ^b |
| Lactulose | + |
| Lactitol | + |
| Xylose | + |
| Arabinose | + |
| Ribose | + |
| Glucose | + |
| Galactose | + |
| Fructose | - |
| Sorbitol | - |
| Maltose | - |
| Cellobiose | - |

^a Self-transferred product(4'-GL) of lactose.

^b The symbol + indicates the presence of the transferred products.

Table 4-5. Effect of lactose concentration on the 4'-GL production.

| Initial lactose (%) | 4'-GL production (mg/ml) |
|---------------------|--------------------------|
| 1.0 | 1.87 |
| 2.5 | 2.99 |
| 5.0 | 3.47 |
| 10.0 | 4.77 |
| 20.0 | 5.49 |

The enzyme was incubated with various concentrations of lactose at pH5.0, 50 °C for 5 hr.

4, 考察

Cryptococcus laurentii OKN-4株をラクトース培地で培養した場合、多量の4'-GLが生成した。これは、Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼの転移反応によるものと考えられたため、酵素の分離・精製を行いその諸性質を調べた。

本酵素は菌体を破砕した場合、菌体破砕物中に存在することが明らかになったため、酵素精製を行うにあたり可溶化を行う必要があった。菌体破砕物中からの酵素の可溶化は困難で収率は低かったが、菌体内のタンパクと分離されたため、その後の精製が容易であった。

本酵素の至適pHはpH4.3で、酸性域で高い活性を示しpH2.8~9.0の間では安定であったが、それ以上のpHでは急激に失活した。また、温度安定性が高く60℃で最高活性を示す耐熱性の β -ガラクトシダーゼであった。

本酵素は Hg^{2+} と Ag^+ 、2-メルカプトエタノールによって強く阻害を受けたが、EDTAやPCMBなどの阻害剤ではまったく阻害を受けなかった。PCMBによって阻害を受けない点は、Uwajimaら(49)が報告している

Saccharomyces fragilis の β -ガラクトシダーゼの性質とは異なり、活性部位にフリーのサルファジル基を持たないと推察された。

ゲル濾過とSDS電気泳動により測定分子量は、それぞれ

れ 200,000 と 100,000 であった。この結果から、本酵素は 100,000 の 2 つのサブユニットからなると推察された。

精製酵素によるラクトースからのオリゴ糖の生成を調べたところ 4'-GL が主に生成したが、それ以外に二～四糖と思われるいくつかのオリゴ糖の生成が認められ、4'-GL のみが多量に生成する培養の場合とは生成物のパターンが異なった。Cryptococcus laurentii 0KN-4 株の培養による 4'-GL の生産では、ガラクトース転移反応によってラクトースから生じるグルコースが菌体の生育に利用されると考えられるため、ラクトースのみがガラクトースの受容体となり 4'-GL が特異的に生成する。しかしながら、酵素反応ではラクトースの分解によって生成したグルコースが反応系から除かれなため、グルコースもガラクトースの受容体となり、種々のオリゴ糖が生成したと考えられる。

また、今回は精製を行わなかったが、Cryptococcus laurentii 0KN-4 株には、ラクトースの加水分解能が強く、転移活性をほとんど示さない他の β -ガラクトシダーゼが存在する。この酵素の存在が培養と酵素反応の生成物のパターンの違いに関係している可能性も考えられる。

一般に、 β -ガラクトシダーゼの転移反応は、ラクトースなどのガラクトース供与体の β -ガラクトシド結合が切断され、ガラクトース残基が受容体に転移する。

β -ガラクトシダーゼが加水分解と転移反応の両方の反

応を示すのは他の糖加水分解酵素と同じく、水が受容体の場合は加水分解反応、糖が受容体の場合は転移反応になると考えられる(50)。そのため一般に糖濃度が高いほど転移生成物量が多くなる。 β -ガラクトシダーゼの転移反応もラクトース濃度が高いほど効率よくガラクトオリゴ糖が生成する(23)。

Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼもラクトース濃度が高くなるに従い4'-GL生成量が増加したが、本酵素は1%ラクトースという低濃度条件下でも、18.7%の収率で4'-GLを生成することが特徴であり、これまで報告された β -ガラクトシダーゼ(23, 24, 32)と比べ転移活性の強い酵素であった。

転移反応によって生成するオリゴ糖の種類は酵素の起源によって異なっている。一般に微生物起源の β -ガラクトシダーゼは β -1 \rightarrow 6結合を含むオリゴ糖を生成するものが多い(22, 25, 27)が、Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼは β -1 \rightarrow 4結合のオリゴ糖を主に生成した。これは Sporoboromyces singularis (26)によって生成されることが報告されている以外数少ない例である。また、酵素によっては二糖類を大量に生成するもの(51, 52)があるが Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼは三糖類を多く生成した。

各糖質に対するガラクトース転移を調べたところ、ラクチュロース、ラクチトール、キシロース、アラビ

ノース、リボース、グルコース、ガラクトースなどが受容体となりいくつかのオリゴ糖が生成した。ラクトースと類似した構造を有するラクチュロースやラクチトールはそれ自体もガラクトース供与体となりオリゴ糖を生成した。

これまで β -ガラクトシダーゼは工業的には牛乳に作
用させてラクトースを加水分解し、消化吸収しやすい
ミルクを製造することに利用されてきたにすぎなかつ
た。しかし、最近ガラクトオリゴ糖が整腸作用など健
康に関する機能を有することが明らかになってきたこ
とから、 β -ガラクトシダーゼの新しい工業的利用法と
してガラクトオリゴ糖製造やその他の利用方が開発さ
れてくると考えられる。

5, 要約

Cryptococcus laurentii OKN-4の β -ガラクトシダーゼを、菌体からの細胞壁面分の調製、Zymolyase-20Tによる細胞壁面分からの酵素の可溶化、DEAE-Sephadex A-50、TSKgel Toyo Pearl HW-55S、TSKgel DEAE-5PWなどのカラムクロマトグラフィーにより、ディスク電気泳動的に単一のバンドになるまで精製した。酵素の分子量をTSKgel Toyo Pearl HW-55Sによるゲル濾過法、SDS電気泳動法により測定したところ、それぞれ200,000、100,000であった。酵素の諸性質を調べたところ、酵素は57.5℃まで(pH 5.0)、またpH2.8~9.3(40℃、10分間処理)の範囲で安定であった。反応最適pH、温度はそれぞれpH4.3、60℃であった。ONPG、ラクトースに対する K_m 値はそれぞれ18.2mMと11.4mMであった。また、 V_{max} は76.9と5.3 μ mol/min/mg \cdot proteinであった。酵素は、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、2-メルカプトエタノール、グルコース、マルトース、マルトトリオースによって活性が阻害された。精製酵素を2.5%のラクトースに反応させた場合、ガラクトース転移反応により28.2%の収率で4'-GLを生成した。さらにラクトース以外にラクチュロース、ラクチトール、キシロース、アラビノース、リボース、グルコース、ガラクトースなどもガラクトース基の受容体になりオリゴ糖が生成した。

第5章 4'-ガラクトシルラクトースの発酵生産条件の検討

1. 序

ラクトースからガラクトオリゴ糖を大量に生成する Cryptococcus laurentii OKN-4株を土壤中より分離した。このガラクトオリゴ糖は、第3章で述べたように、 $\text{O}-\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-O}-\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-glucopyranose}$ の構造を持つ4'-ガラクトシルラクトース(4'-GLと略記)であり、

Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼのガラクトース転移反応によって生成することが明らかになった。

発酵によってラクトースから4'-GLを生成させた場合、酵素反応の場合と比べ、4'-GLのみが大量に生成した。そこで、4'-GLのみを効率よくラクトースから生成させることを目的に、Cryptococcus laurentii OKN-4株の培養条件の検討を行った。

2. 実験方法

培養 500ml容三角フラスコに80mlの培地を入れ、前培養菌体液1mlを加え、30℃、160rpmの条件で回転

振とう培養を行った。培地はTable 2-1に示したものを基本培地（ただしラクトースは5%）として使用し、1週間培養を行った。ラクトースは、純正化学工業㈱の特級試薬を用いた。菌体量は培養液の660nmにおける吸光度によって測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 日立 655A-11型高速液体クロマトグラフィーを用い以下の条件で行った。

カラム: LiChrosorb NH₂カラム φ4×250mm (Cica-Merck社), 溶液: アセトニトリル・水(70:30), 温度: 室温, 流速: 1.0ml/min, 検出器: Shodex RI SE31型示差屈折検出器

なお培養液をミリポアフィルター(0.45μ)で濾過したものを試料液としインジェクションした。

3. 実験結果

培養条件の検討

1) pHの影響 培地中の Na₂HPO₄・12H₂Oと KH₂PO₄の割合を変えpHを4.0から8.0に調整し、30℃で7日間培養を行った。菌体の生育はpH7.0が良好であったが4'-GLの生成はpH6.0が高く、5%ラクトース濃度の培地から、対ラクトース収率45%で4'-GLが生成した。

Fig.5-1に示すように4'-GLは酸性域では比較的安定な生成が認められるがpH8.0になると生成は急激に減少した。

2) 窒素源の影響 Fig.5-2に、基本培地に酵母エキス、ペプトン(日本製薬株)を添加して培養を行ったときの4'-GLの生成と菌体の生育について示した。

基本培地の酵母エキスを0.1~1.0%の範囲で変化させた培地を用いて検討したところ、添加量に比例して菌体の生育は増大したが、4'-GLの生成量は酵母エキス0.2%の場合が最高であった。

一方、酵母エキスをペプトンに置き換えた場合、無添加の場合に比べ菌体の生育は若干増加したが、酵母エキスと比べると効果は少なかった。4'-GLの生成はペプトン0.1%添加した場合最高で、それ以上の添加では生成量は急激に減少した。

3) グルコース添加の影響 培地に0.1~1.0%のグルコースを添加したときの4'-GLの生成に及ぼす影響をFig.5-3に示した。グルコース添加による菌体生育の増加はほとんど認められなかったが、4'-GLの生成はグルコース0.5%以上の添加で抑制された。グルコース0.2%添加した場合、培養初期において4'-GLの生成が若干遅れたが、その後無添加の場合と同じになった。しかし、0.5%以上のグルコースを添加すると4'-GLの生成は抑制され培養4日目でその生成量は無添加の場合の70~80%であった。

4) ラクトース濃度の検討 4'-GL生成の基質であるラクトースについて最適濃度の検討を行った。Fig. 5-4は培地のラクトース濃度を5, 10および20%に変化させたときの4'-GL生成の経時変化の結果を示したものである。4'-GLの生成量はラクトース濃度10%の場合5%に比べ約2倍であったが、濃度を20%にしてもそれ以上の生成量の増加は認められず、10%濃度の場合とほぼ同じであった。

5) 通気の影響 4'-GL生成に対する通気の影響を検討するため回転振とう培養機の回転数を100rpmと160rpmで培養を行った。その結果Fig. 5-5に示すとおり回転数による菌体生育の影響はほとんどなかったが、4'-GL生成が回転数が高い方が高く、培養96時間目において、100rpmでは4'-GL生成の収率が基質ラクトースの24%であるのに対し、160rpmでは43%であった。

以上培養諸条件の検討結果をもとに最適条件（ラクトース 100g、 NH_4Cl 2g、酵母エキス 2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 24g、 KH_2PO_4 81g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg、 CaCl_2 10mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg、水 1 l、30℃、pH6.0.)を設定し、その培養の経時変化をFig. 5-6に示した。その結果、30℃で4日間培養を行った場合、基質ラクトースに対して47%の収率で4'-GLが生成し、培養液中の全糖量に対し60%以上を占めるようになった。

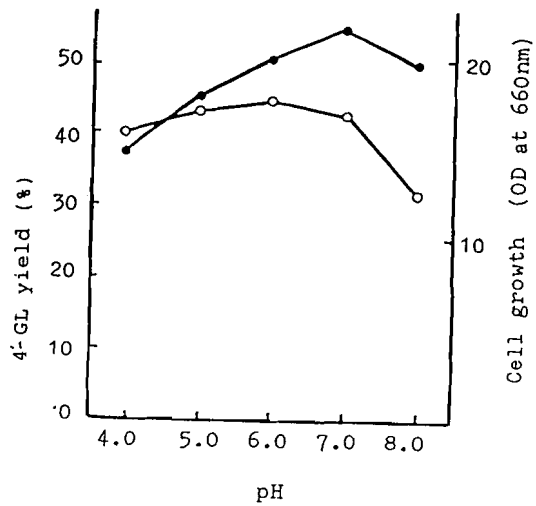


Fig.5-1. Effect of pH on cell growth and 4'-GL production. *Cryptococcus laurentii* OKN-4 was incubated at 30°C for 7 days. M/15 phosphate buffer was used for pH4.0~8.0. ○: 4'-GL production, ●: cell growth.

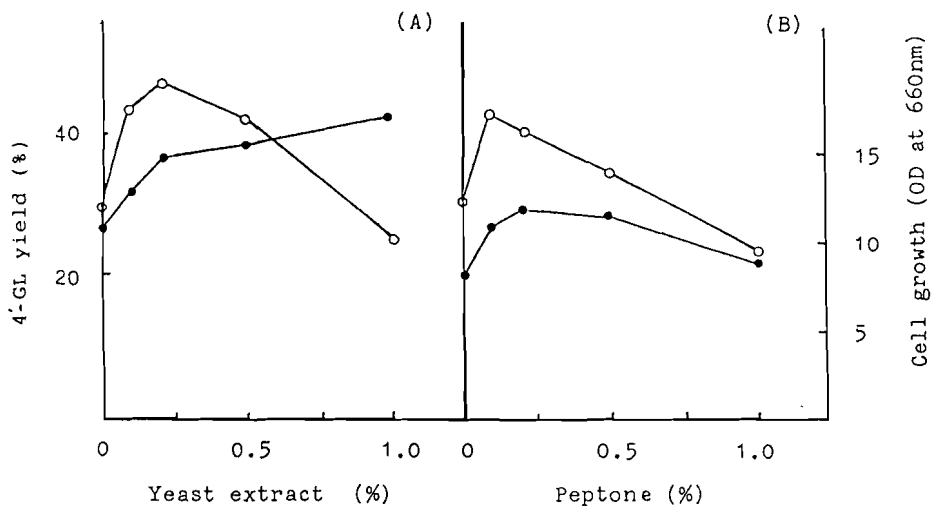


Fig.5-2. Effect of organic nitrogen sources on 4'-GL production. *Cryptococcus laurentii* OKN-4 was incubated at 30°C, pH6.0 for 7 days. 0.1, 0.2, 0.5, 1.0% yeast extract(A) or 0.1, 0.2, 0.5, 1.0% peptone (B) ○: 4'-GL production, ●: cell growth.

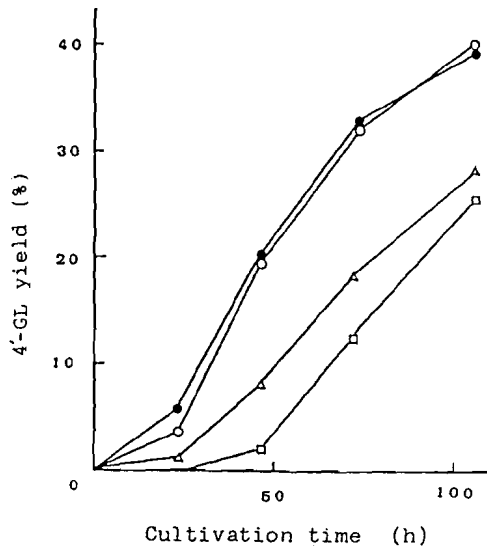


Fig.5-3. Effect of glucose on 4'-GL production.
Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30°C, pH6.0 for 4 days.
 ●: control, ○: 0.2% glucose, △: 0.5% glucose, □: 1.0% glucose.

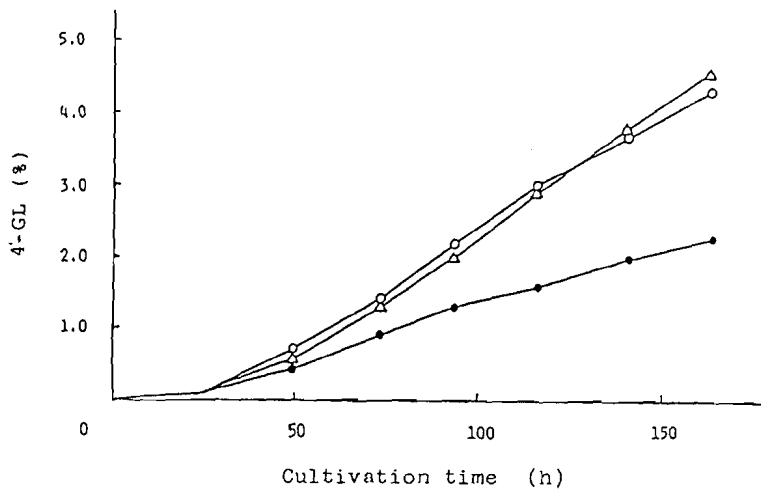


Fig.5-4. Effect of lactose concentration on 4'-GL production.
Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30°C, pH6.0 for 7 days.
 ●: 5% lactose medium, ○: 10% lactose medium, △: 20% lactose medium.

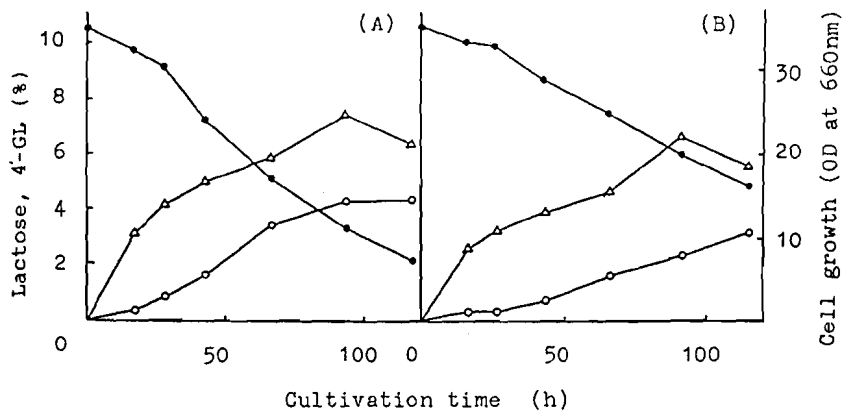


Fig.5-5. Effect of aeration on 4'-GL production.
Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30°C, pH6.0 on rotary shaker for 5 days. Aeration was changed by rotation of rotary shaker at 160rpm (A) or 100rpm (B). ●: lactose, ○: 4'-GL, Δ: cell growth.

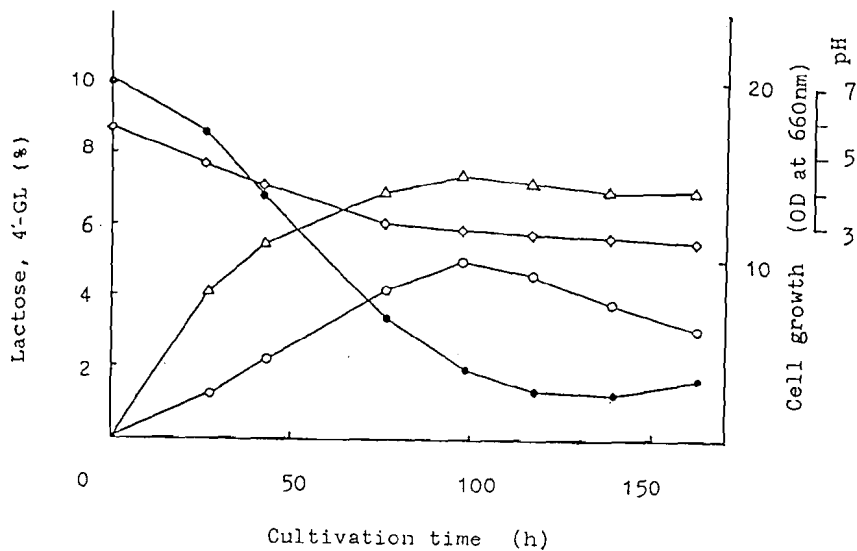


Fig.5-6. 4'-GL production by *Cryptococcus laurentii* OKN-4.
Cryptococcus laurentii OKN-4 was incubated at 30 °C, pH6.0 on rotary shaker for 7 days. Culture medium : lactose 100g, NH₄Cl 2g, yeast extract 2g, Na₂HPO₄·12H₂O 24g, KH₂PO₄ 81g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, FeSO₄·7H₂O 4mg, CaCl₂ 10mg, MnCl₂·4H₂O 1mg and 1 l of water.
 ●: lactose, ○: 4'-GL, Δ: cell growth, ◇: pH.

4. 考察

発酵による4'-GLの大量生産を目的に、pHや窒素源、ラクトース濃度など諸条件の検討を行った。

菌体の増殖と4'-GL生成の至適pHは異なり、中性域で菌体が最もよく生育したが、4'-GLの生成は酸性域で良好であった。同量の菌体当りの4'-GL生成量に換算した場合、pH4.0~5.0の間が最高で、これは酵素の至適pHと一致した。

酵母エキスを0.2%添加した場合、菌体生育と4'-GL生成が最高となった。しかし、それ以上の添加では菌体生育はわずかに増加したが4'-GL生成は減少した。菌体の生育が良好な場合、4'-GLの生成は抑制されるのかもしれないが明らかではない。

培養液にグルコースを添加した場合、4'-GL生成が遅れ、生成量も減少した。精製酵素はグルコースによって活性が阻害されたが、培養の場合もグルコースの存在によって β -ガラクトシダーゼ活性が阻害されたと考えられるが、その他にグルコース存在による β -ガラクトシダーゼの誘導が遅れたことも考えられる。

4'-GL生成に及ぼす培地中のラクトース濃度の影響を調べたところ、ラクトース10%までは効果が認められたが20%では10%の場合とほぼ同じ生成量であった。精製酵素の場合、濃度が高くなるに従い4'-GL生成量も増加したが、発酵による4'-GL生成では菌体の生育も関係し

てくるためこのような結果になったと考えられる。

これらの培養条件の検討により、Cryptococcus laurentii OKN-4株は四糖類をほとんど生成せず、50%近い収率で三糖類である4'-GLを大量に蓄積した。そして培養液中の全糖量に対しては60%以上を占めた。

一般に、ラクトースに β -ガラクトシダーゼを反応させガラクトオリゴ糖を生成する場合、数種類以上のガラクトオリゴ糖が生成する(21, 25, 30)。今回のように、菌体の培養を行いガラクトオリゴ糖を生成させると、ラクトースの加水分解によって生成するグルコースは菌体の増殖に利用されガラクトースだけが転移反応に関与するため、副生成物が少なく単一のガラクトオリゴ糖が高収率で生成すると考えられる。このことはCryptococcus laurentii OKN-4株の洗浄菌体を用いて、菌体が生育できない50℃でラクトースとを反応させた場合や、精製酵素をラクトースに反応させた場合、4'-GL以外にいくつかのガラクトオリゴ糖が生成することからも推察できる。今後さらに酵素の誘導の解析や、その他の因子を検討することにより4'-GLの生成量を向上させることができると考えられる。

5. 要約

発酵による4'-GL生成条件の検討を行ったところ、4'-GL生成は酸性域において良好で、pH8.0では減少することが分かった。また、適量の酵母エキスやペプトンなど天然系窒素源の添加は菌体の生育および4'-GLの生成に有効であるがグルコースの添加は4'-GLの生成を著しく抑制した。これらの諸条件を検討し、pH6.0の10%ラクトース培地を用い30℃で4日間培養した結果、添加したラクトースに対して47%の収率で4'-GLが生成した。

第 6 章 4'-ガラクトシルラクトースの生体利用

1. 序

Cryptococcus laurentii OKN-4株はラクトースから $0-\beta-D-galactopyranosyl-(1\rightarrow 4)-0-\beta-D-galactopyranosyl-(1\rightarrow 4)-D-glucopyranose$ (4'-ガラクトシルラクトース、4'-GLと略記) の構造を有するガラクトオリゴ糖を大量に生成する。一般に、ガラクトオリゴ糖は摂取した場合、整腸作用やビフィズス菌の増殖作用が期待されるが、4'-GLも、慢性便秘の高齢患者が摂取した場合、なんらの副作用もなく有用な便秘改善効果および腸内フローラの改善効果を示すことが分かった(53)。

これらの結果から4'-GLは食物繊維などと同様にヒトの胃や小腸で加水分解されることなしに大腸まで到達し、エネルギー源として生体では利用されにくい糖質であると推察されたが、まだ詳細な研究は行われていない。4'-GLの生体による利用を明らかにするため、ラットの小腸粘膜酵素などの消化酵素を用いた in vitro における4'-GLの加水分解ならびに、ラットに ^{14}C でラベルした4'-GLを投与し、生体による代謝ならびに排泄の様相を検討した。また、4'-GLを摂取した場合のラットの成長や生体に及ぼす影響についても検討を行った。

2. in vitroにおける4'-GLの消化酵素による

加水分解

2 - 1. 実験方法

4'-GLの調製 ラクトースを含む培地で

Cryptococcus laurentii OKN-4株を30℃、4日間培養を行い4'-GLを蓄積させた。培養液をカーボン・セライトカラムを用いて分画し、凍結乾燥後エタノールにより結晶化させ4'-GLの結晶を得た。

唾液および膵液アミラーゼによる4'-GLの加水分解

4'-GLの唾液アミラーゼによる加水分解は、pH6.0の50mMマレイン酸緩衝液に溶かした1% 4'-GL溶液 2.0mlに市販ヒト唾液アミラーゼ (SIGMA社, Type IX-A, 50 U/ml) 0.1mlを加え37℃、30分間反応させた。

膵液アミラーゼによる加水分解は、pH6.6の50mMマレイン酸緩衝液に溶かした1% 4'-GL溶液2.0mlに市販ブタ膵液アミラーゼ (Boehringer Mannheim GmbH社, 20U/ml) 0.1mlを加え37℃、30分間反応させた。

加水分解活性は、反応液の還元力の増加をSomogyi-Nelson法(54,55)により測定し調べた。標準基質として1%可溶性デンプン (Merck社) を用い加水分解を比較した。

人工胃液による4'-GLの加水分解

4'-GLの人工胃

液による加水分解は、pH1.0、pH1.5、pH2.0の3種類の人工胃液（NaCl 2.0g、ペプシン 3.2g、10% HCl 12~118ml、水 1000ml）（56）5.0mlに4'-GL 100mgを加え、37℃で6時間反応を行った。反応1時間目より1時間毎にサンプリングを行った。加水分解によって生じたグルコース量は、グルコースBテスト（和光純薬工業（株））を用いてグルコースオキシダーゼ法（45）で測定した。生成したグルコース量から加水分解の割合を求めた。対照としてシュークロース、フラクトオリゴ糖（1-kestose 28%, nystose 60%, 1^F-β-fructofuranosyl-nystose 12%）を用いて同様の実験を行った。

小腸粘膜酵素による4'-GLの加水分解

実験には日

本クレアより購入したSD系雄ラット（体重約280g）を用いた。ラットを断頭、放血後ただちに小腸をとりだし、十二指腸、空腸（十二指腸を除いた残り上部半分）、回腸（同下部半分）に分割した。各部位の粘膜を剥離した後、生理食塩水を用いて小腸粘膜の10%ホモジネートを調製し、遠心分離（3,000rpm, 10min.）した上清液を酵素液とした。

4'-GLの加水分解の測定は、0.1M McIlvaine緩衝液（pH5.5）に溶解した56mM 4'-GL溶液0.5mlに適当に希釈した上記酵素液0.5mlを加え、37℃、1時間反応させた。生成したガラクトース、グルコース量は微量測定可能

なFキット (Boehringer Mannheim GmbH 社) を用い酵素法 (57) により定量した。

マルトース、シュークロース、ラクトースの加水分解活性は Dahlqvist の方法 (58) に準じて行った。生成したグルコース量はグルコースBテスト (和光純薬工業) を用いてグルコースオキシダーゼ法 (45) で測定した。酵素活性単位は、タンパク質 1mg 当り 1 時間に分解された基質のモル数で表した。酵素のタンパク質量は、Lowry 法 (46) を用い定量した。

2 - 2. 実験結果

in vitroにおける4'-GLの加水分解

1) 唾液および膵液アミラーゼによる4'-GLの加水分解

市販ヒト唾液アミラーゼ、ブタ膵液アミラーゼによる4'-GLの加水分解の結果を Fig.6-1 に示した。対照として用いた可溶性デンプンは唾液アミラーゼ、膵液アミラーゼによって加水分解を受け還元糖量が増加したが、4'-GLは還元糖量の増加は認められず、これらのアミラーゼによっては加水分解を受けなかった。

2) 人工胃液による4'-GLの加水分解

pH 1.0, pH 1.5, pH 2.0 に調製した人工胃液による4'-GLの加水分解の結果を Fig.6-2 に示した。対照として用いたシュークロースは pH 1.0 の人工胃液で反応 3 時間において半分以上が加水分解された。フラクトオ

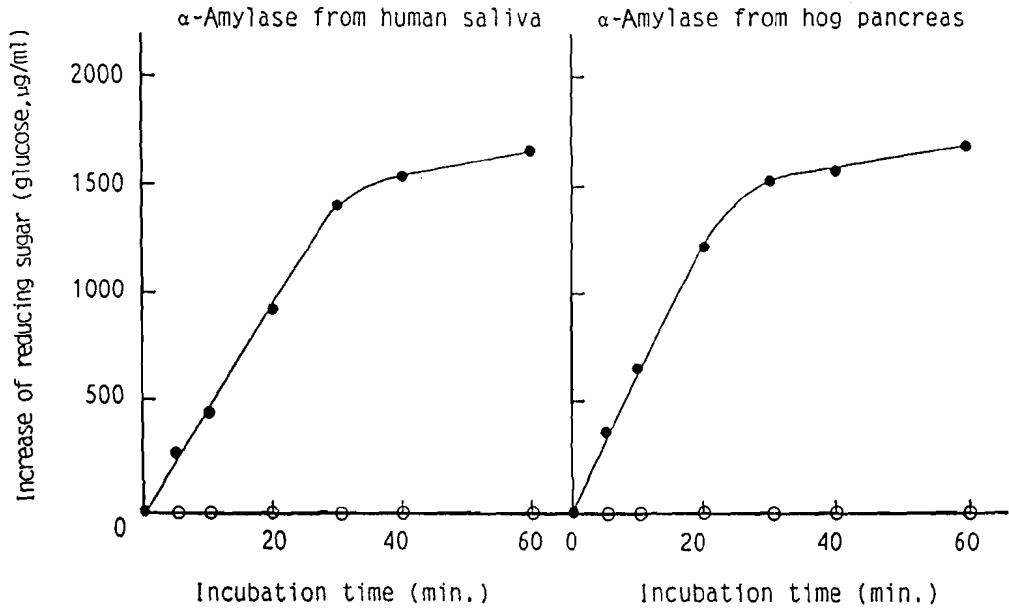


Fig.6-1. Hydrolysis of 4'-GL and soluble starch by α -amylase. Hydrolyzing activities were measured by using 1% 4'-GL or 1% soluble starch in 50mM sodium malate buffer. ○: 4'-GL, ●: soluble starch.

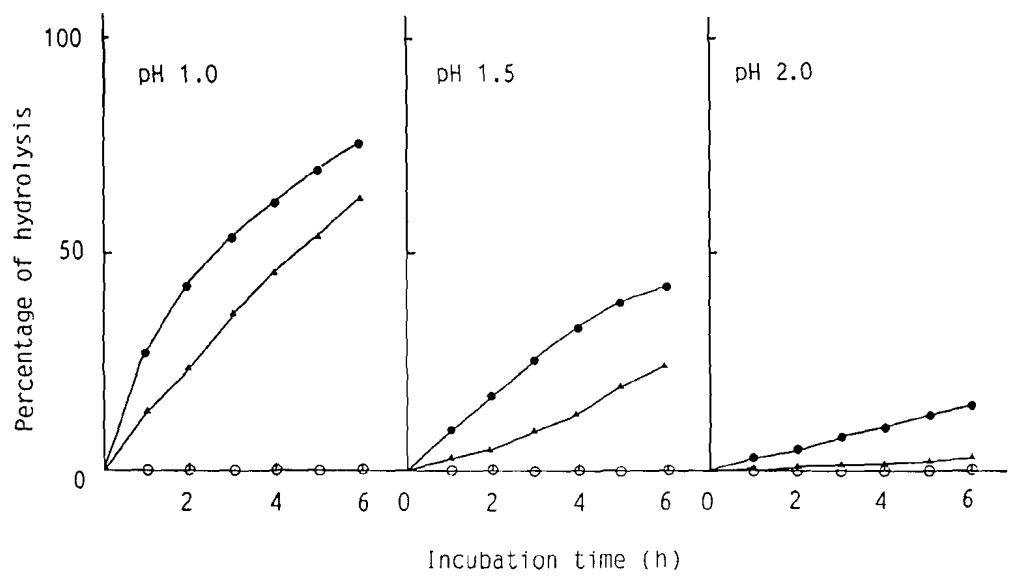


Fig.6-2. Hydrolysis of 4'-GL by artificial gastric juice. Each 5.0 ml of gastric juice (pH1.0, 1.5, 2.0) and 100mg of 4'-GL, sucrose or fructooligosaccharides were mixed. The incubation was performed at 37°C for 1~6 hr. Liberated glucose was measured with glucose oxidase method. ○: 4'-GL, ●: sucrose, ▲: fructooligosaccharides.

リゴ糖も pH2.0では加水分解を受けにくいものの、pH 1.0では反応5時間で半分以上が加水分解された。

しかしながら、4'-GLはpH1.0で6時間反応を行ってもまったく加水分解を受けなかった。

3) ラット小腸粘膜酵素による4'-GLの加水分解

ラット小腸粘膜酵素による4'-GLおよびマルトース、シュクロース、ラクトースの加水分解を調べた結果をTable 6-1に示した。

4'-GLは小腸粘膜酵素ではほとんど加水分解されず比較として用いたマルトース、シュクロース、ラクトースなどの加水分解と比べかなり低い値であった。マルトースやシュクロースの加水分解活性の高い空腸部位でも4'-GLの加水分解は $24.1\text{nmol/mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{hr}$ と低く、マルトースの約1300分の1、シュクロースの約270分の1、ラクトースの約85分の1であった。

Table 6-1. Hydrolyzing activities of Duodenal, Jejunal and Ileal mucosa homogenates.

| | 4' -GL | Maltose | Sucrose | Lactose |
|----------|---|------------|----------|----------|
| | (nmoles substrate hydrolyzed / mg protein·hr) | | | |
| Duodenum | 9.7±1.3 | 13710±860 | 4140±120 | 570±50 |
| Jejunum | 24.1±2.2 | 31780±1450 | 6460±330 | 2040±190 |
| Ileum | 9.8±0.68 | 20330±550 | 2780±200 | 1240±50 |

Rats weighing about 280g were used.

The incubation period was 60 minutes for 4' -GL, maltose, sucrose and lactose, respectively.

Each value represents the mean ± S.E. for 6 rats.

3. ラットにおける¹⁴C-4'-GLの吸収と排泄

3-1. 実験方法

¹⁴C-4'-GLの調製 ¹⁴C-4'-GLの調製は第3章の方法をもとにFig.6-3に示した方法で、ラクトース-U-¹⁴C (New England Nuclear社) 0.3ml (1.1×10^7 Bq)に培養液 (Lactose 5.0g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.1g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, Meat extract 0.2g, Yeast extract 0.2g, Water 70ml) 0.7mlを加え、あらかじめ前培養しておいた Cryptococcus laurentii OKN-4株の培養液0.1mlを接種し、30℃、48時間振とう培養を行い調製した。

生成した¹⁴C-4'-GLの培養液からの精製は、カーボン・セライトカラム(1:1, φ10×200mm)を使用した。カーボンはクロマトグラフ用活性炭(和光純薬工業㈱)、セライトはセライト545(純正化学工業㈱)を用いた。上記培養液1mlに蒸留水2mlを加え、カラムに通液した。蒸留水10mlで単糖を溶出した後、5%エタノール50ml, 10%エタノール100mlを流しそれぞれ¹⁴C-ラクトース、¹⁴C-4'-GLを溶出した。溶出は流速8ml/hrで行い、0.8mlずつ分画した。

次に、各溶出画分をTLC (Kieselgel 60 20×20cm, Merck社)を用い、n-ブタノール・ピリジン・水(60:25:15)で室温下、4時間展開した後、0.2%ナフトレゾル

[U-¹⁴C] Lactose (1.1×10^7 Bq) 0.3ml , Culture medium 0.7ml

| Cryptococcus laurentii OKN-4
48 h incubated at 30 °C

Carbon-Celite column

| — Water 10ml
— 5% Ethanol 50ml
— 10% Ethanol 100ml

Concentration

|
[U-¹⁴C] 4'-GL (2.3×10^6 Bq / 9.92mg) in 31ml

Fig.6-3. Preparation of [U-¹⁴C] 4'-GL from [U-¹⁴C] Lactose.

シン／エタノール、20%硫酸で発色し4'-GL画分の確認を行った。4'-GL画分をロータリーエバポレーターで濃縮して、74 kBq/mlになるように調製した。

^{14}C -4'-GLおよび ^{14}C -ラクトースの放射能純度の分析

精製した ^{14}C -4'-GLと ^{14}C -ラクトースを標準4'-GL、ラクトースと同時にTLCで展開し比較した。また、TLCで展開した ^{14}C -4'-GLと ^{14}C -ラクトースの放射能分布をRadiochromalyzer JTC (楨アロカ) で分析した。

^{14}C -4'-GLの経口投与実験

1) 実験動物 実験には日本クレア(株)から購入した5週齢のSD系雄ラットを1群5匹とし、Table 6-2に示すAIN-76を基本とした飼料で2週間飼育したラット(体重約230g)、また同様の飼料を用い飼育しながら、抗生物質(SIGMA社、ペニシリンG、50U/ml、SIGMA社、クロラムフェニコール、50mg/ml)を含む水を1週間摂取させ腸内細菌を減少させたラットを使用した。

無菌ラットは日本クレアから購入したWistar系雄ラット(体重約80g、1群5匹)を直ちに用いた。

2) $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の測定 一夜絶食させたラットに生理食塩水に溶解した ^{14}C -4'-GL 37 kBq(比活性 37 kBq/0.16mg 4'-GL)を0.5mlストマックチューブを用い胃内に投与した。投与後ただちに硝子製呼気採取器中にラ

Table 6-2. Composition of diet

| | Control | 5% 4'-GL |
|------------------------------|---------|----------|
| Corn starch | 65.0 | 60.0 |
| 4'-GL | — | 5.0 |
| Cellulose | 3.0 | 3.0 |
| Casein | 22.0 | 22.0 |
| DL-Methionine | 0.3 | 0.3 |
| Corn oil | 5.0 | 5.0 |
| Vitamin mixture ^a | 1.2 | 1.2 |

^a AIN-76 TM, Oriental Yeast Co.,Tokyo.

ットを入れ、エアーポンプを用いて150ml/minで空気を吸引した。排出された $^{14}\text{CO}_2$ は、モノエタノールアミン・メチルセルソルブ（和光純薬工業㈱）（1:2 V/V）混液70ml（59）で捕集し、試験開始後12時間まで2時間ごとに試料を採取した。6時間後および12時間後に新しい液と交換した。採取した液0.2mlに10mlのシンチレーションカクテル（POPOP 0.2g, DPO 10g, トリトンX-100 500ml, トルエン 1500ml）（59）（和光純薬工業㈱）を加え、液体シンチレーションカウンター（Packard 3255 TRI-CARB）で放射能濃度を測定した。

3) 血清、尿、糞、各臓器中の ^{14}C の測定 血清中の ^{14}C の測定は、血清0.1mlにProtosol（Du Pont社）0.2mlを加え、50℃、1時間反応させた後、過酸化水素水で脱色を行いシンチレーションカクテル10mlを加え液体シンチレーションカウンターで測定した。尿中に排泄された ^{14}C は、尿0.5mlにシンチレーションカクテル10mlを加え一夜暗所保存後測定した。

糞および腸内容物、肝臓は、適当量の蒸留水を加えポリトロンホモジナイザー（Kinematica社）でホモジネートした。ホモジネート液0.2mlにProtosol 1mlを加え組織を溶解させた後、過酸化水素水で脱色を行った。これにシンチレーションカクテル10mlを加え一夜暗所保存後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

また、カーカス中に残存している ^{14}C は、カーカスをミートミルで破碎し、ポリトロンホモジナイザーでホ

モジネートしたものを同様の方法で測定した。

糞中4'-GLの測定 4'-GLを5%含む飼料を2週間摂取させたラットの2週間目の糞を採取し、80℃で乾燥した。乾燥した糞を乳鉢で粉碎した後、適当量の蒸留水に懸濁し4'-GLの抽出を行った。4'-GLの測定はHPLCを用い、第5章で記述した方法に従った。

3 - 2. 実験結果

¹⁴C-4'-GLの調製 ラクトース-U-¹⁴C 0.3ml (1.1 × 10⁷ Bq)に培養液0.7mlを加え、Cryptococcus laurentii OKN-4株を30℃, 48時間振とう培養を行った。培養液をカーボン・セライトカラムを用いて分離・精製し2.3 × 10⁶ Bqの¹⁴C-4'-GLを得た。

精製した¹⁴C-4'-GLをTLCで展開し、ナフトレゾルシンで発色させた後Radiochromanyzer JTCで放射能分布を分析したところ、4'-GLのスポットと放射能の分布が一致した。4'-GLのスポット以外の場所にはまったく放射能は認められず、純粋な¹⁴C-4'-GLを得ることができた。

¹⁴C-4'-GLを投与したラットの呼気中への¹⁴CO₂の排出
1) 通常ラットへの¹⁴C-4'-GL投与 通常ラットに¹⁴C-4'-GLを投与したところFig.6-4に示すように投与

2時間までは $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の呼気中への排出はほとんど認められなかったが、その後急速に増加した。8時間後からは排出がゆるやかになり、24時間内までに投与した $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ の47.0%に相当する $^{14}\text{C}\text{O}_2$ が排出された。一方、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の排出を比較するため ^{14}C -ラクトースをラットに投与したところ投与後ただちに $^{14}\text{C}\text{O}_2$ が排出し、2時間後にはすでに総排出量の約30%が排出された。6時間後まで急速に増加した後排出がゆるやかになり、24時間内に投与した $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ の41.6%に相当する $^{14}\text{C}\text{O}_2$ が排出された。

$^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ を投与した場合 ^{14}C -ラクトースを投与した場合と比べ $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 排出に5時間以上の遅れが認められたが、24時間内の総排出量は47.0%と逆に5.4%多くなった。

2) 抗生物質処理ラットへの $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ 投与 通常ラットに $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ を投与した場合 ^{14}C -ラクトースを投与した場合と比べ $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 排出に遅れが認められたが、24時間内の総排出量は逆に多くなった。そこで $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ からの $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 排出に腸内細菌の関与が考えられたので、抗生物質をあらかじめ1週間飲料水とともに摂取させ腸内細菌を減少させたラットに $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ と ^{14}C -ラクトース投与して同様の実験を行った(Fig.6-4)。

抗生物質処理ラットに $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ を投与した場合 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の排出は通常ラットに比べ2時間以上の遅れが認められ、24時間内の総排出量も約25%減少した。一方、 ^{14}C -ラクトースからの $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 排出の経時変化は通常ラッ

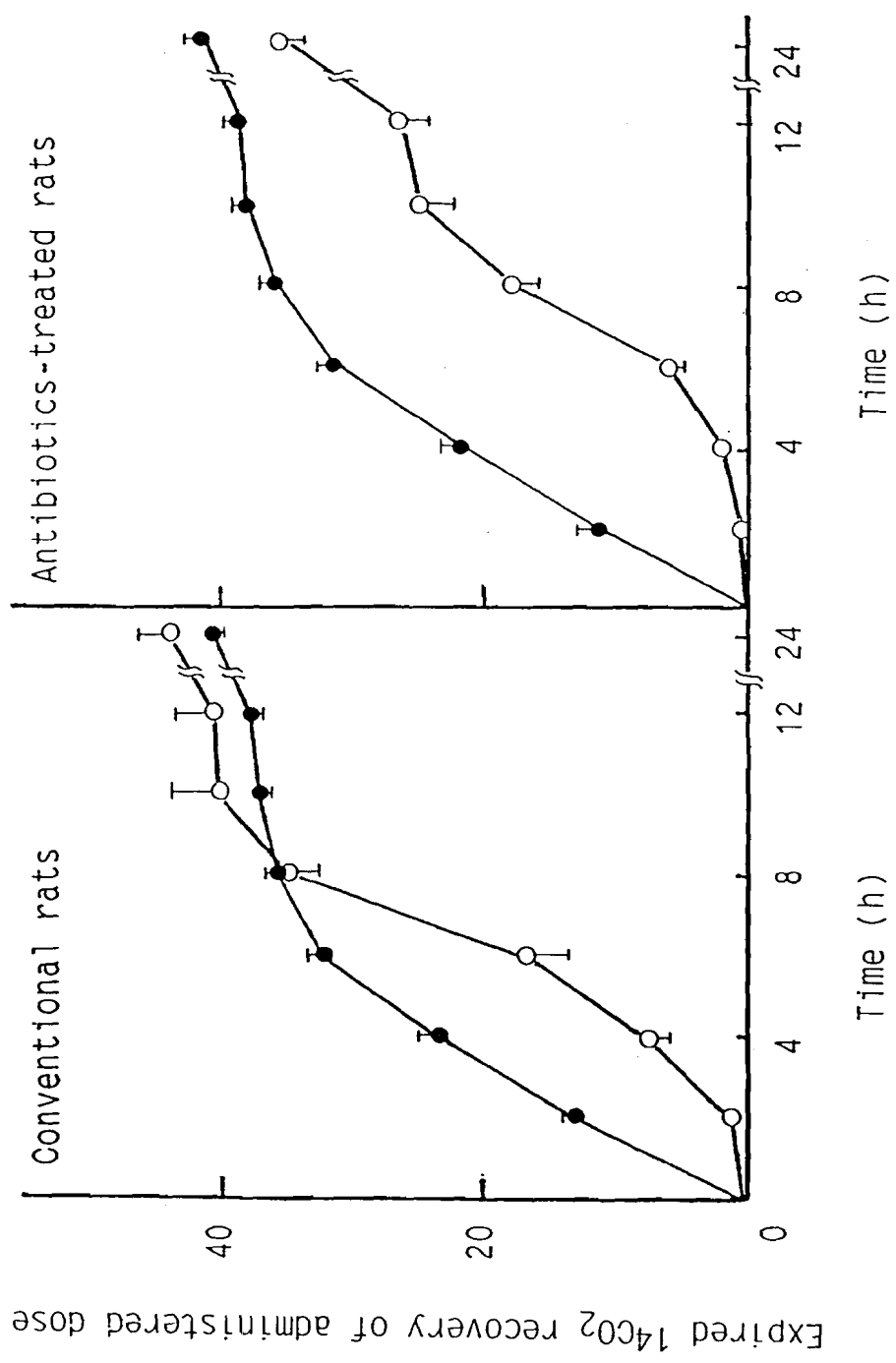


Fig. 6-4. Time course of ¹⁴C₂ excretion from conventional and antibiotics administered rats after an oral dose of ¹⁴C-4'-GL or ¹⁴C-lactose.

¹⁴C-4'-GL or ¹⁴C-lactose was orally administered to each rat, respectively.

The values are expressed as % of the radioactivity excreted to the radioactivity administered.

Five male SD rats (7 weeks of age) were used.

○: ¹⁴C-4'-GL, ●: ¹⁴C-lactose.

トと同じであった。

3) 無菌ラットへの ^{14}C -4'-GL投与 抗生物質処理
ラットへの ^{14}C -4'-GL投与による $^{14}\text{CO}_2$ 排出の結果から、
4'-GLの代謝に腸内細菌が関与している可能性が大とな
ってきたので、次に腸内細菌をまったく保有していな
い無菌ラットを用いて同様の実験を行った。Fig.6-5に
示したように無菌ラットに ^{14}C -4'-GLを投与したところ
 $^{14}\text{CO}_2$ 排出の遅れが顕著になり24時間内の総排出量も
17.7%と ^{14}C -ラクトースの45.9%と比べ半分以下になっ
た。

以上の結果から、 ^{14}C -4'-GL代謝による $^{14}\text{CO}_2$ 排出に
腸内細菌が関与していることが明かになった。

4) 5% 4'-GLを含む飼料で飼育した通常ラットへの
 ^{14}C -4'-GL投与

4'-GLの代謝に腸内細菌が関与していることが明かに
なったため、4'-GLを飼料とともに2週間摂取させ腸内
菌叢が4'-GL摂取に適応して変化したラットを用いて同
様の実験を行った。飼料はTable 6-2に示したAIN-76を
基本飼料とし4'-GLが5%になるように調製したものを
用いた。

結果をFig.6-6に示したが、 ^{14}C -4'-GLを摂取したラ
ットからの $^{14}\text{CO}_2$ 排出は対照群のラットと比べ速くなり
24時間内の総排出量も約1.5倍に増加した。

^{14}C -4'-GLおよび ^{14}C -ラクトースの代謝と排泄

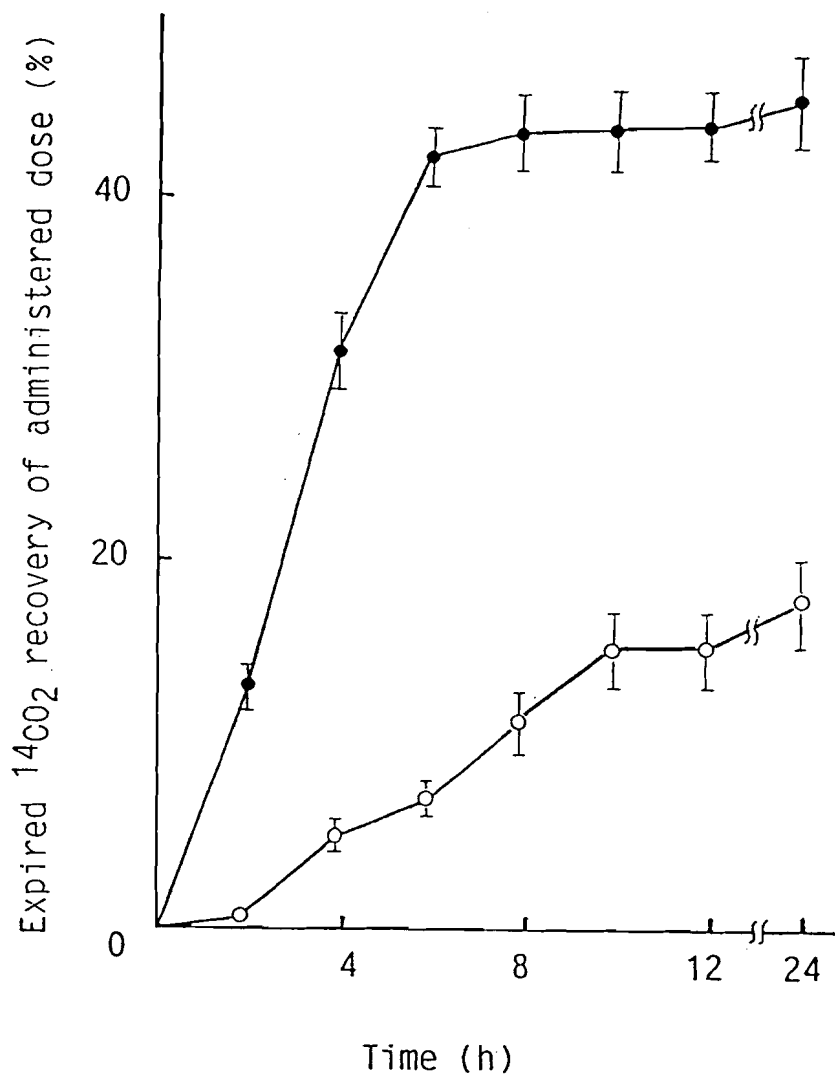


Fig.6-5. Time course of ¹⁴C₀₂ excretion after an oral dose of ¹⁴C-4'-GL or ¹⁴C-lactose to germfree rats.

¹⁴C-4'-GL or ¹⁴C-lactose was orally administered to each rat, respectively.

The values are expressed as % of the radioactivity excreted to the radioactivity administered.

Five male Wistar rats (4 weeks of age) were used.

○: ¹⁴C-4'GL , ●: ¹⁴C-lactose.

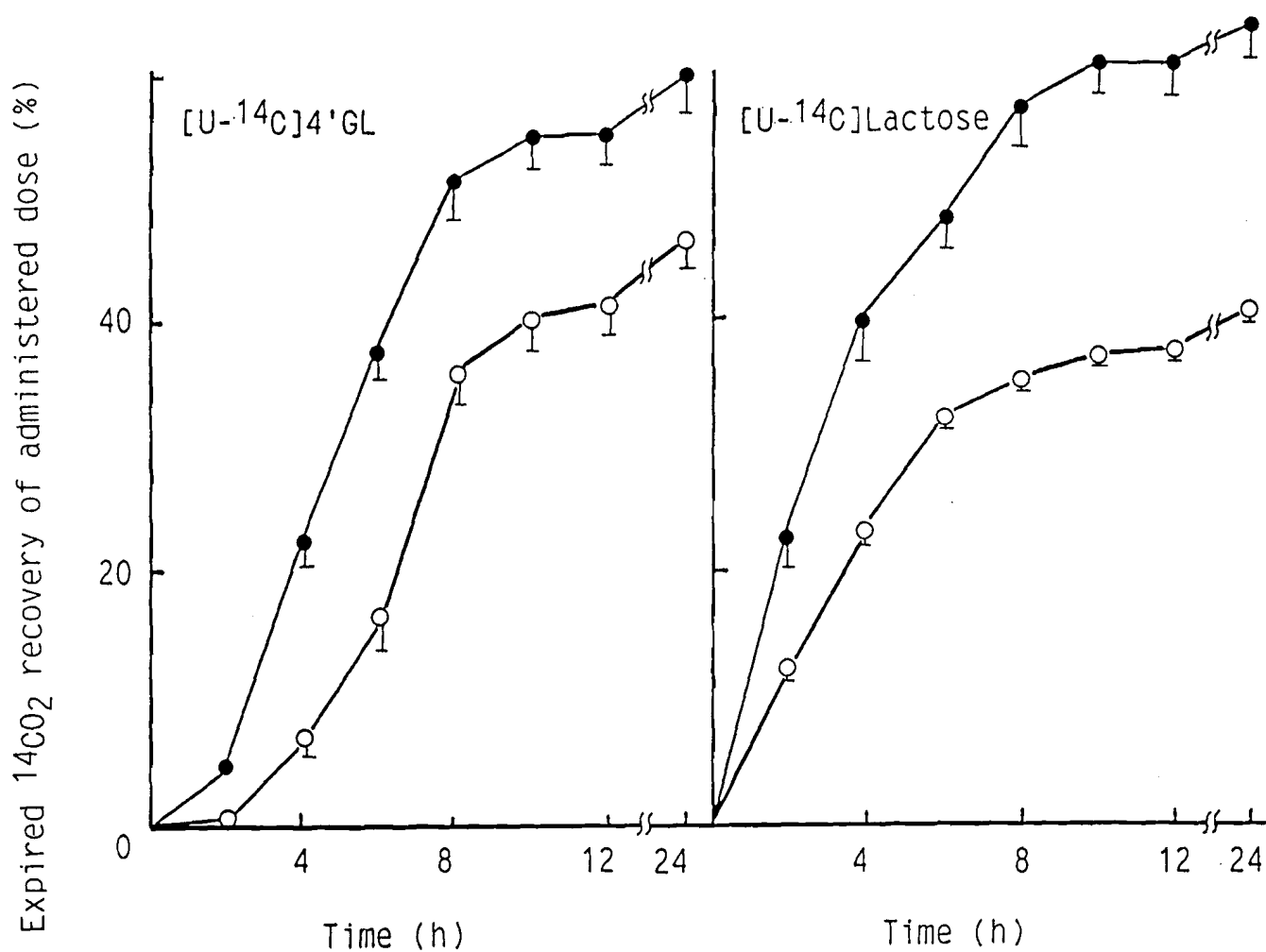


Fig.6-6. Time course of $^{14}\text{C}\text{O}_2$ excretion after an oral dose of ^{14}C -4'-GL or ^{14}C -lactose to 5% 4'-GL feeding rats.

^{14}C -4'-GL or ^{14}C -lactose was orally administered to each rat, respectively.

The values are expressed as % of the radioactivity excreted to the radioactivity administered.

Five male SD rats (7 weeks of age) were given experimental diets supplemented with 5% 4'-GL for 2 weeks.

●: 5% 4'-GL feeding group, ○: control group.

Table 6-3 に通常ラットと無菌ラットにそれぞれ¹⁴C-4'-GL、¹⁴C-ラクトースを投与したときの投与24時間内における¹⁴Cの排泄と体内における残存を示した。

通常ラットに¹⁴C-4'-GLを投与した場合、消化管内容物や糞へ排泄された¹⁴C量が¹⁴C-ラクトース投与群と比べ多くそれぞれ1.5倍、2.8倍であった。尿中にも¹⁴C-4'-GL投与群は¹⁴C-ラクトース投与群の1.5倍量の¹⁴Cが排泄された。一方、血清中や肝臓に残存する¹⁴C量は¹⁴C-4'-GL投与群では¹⁴C-ラクトース投与群より少なく、カーカスにおいては約半分量の¹⁴Cしか保留されていなかった。¹⁴C-4'-GLを投与した場合の血清中や肝臓、カーカスなど体内に保留された¹⁴Cの総量は約15%であるのに対し、¹⁴C-ラクトースを投与したときの体内における保留は約25%であった。

この傾向は無菌ラットを用いた場合顕著にあらわれ、投与した¹⁴C-4'-GLの58%が腸内容物中に残存しており¹⁴C-ラクトース投与群の4倍量であった。また、血清中や肝臓、カーカスに残存する¹⁴C量は約6%で¹⁴C-ラクトース投与群の約16%に比べ半分以下であった。

4'-GLの糞中への排泄 4'-GLを5%含む飼料で2週間飼育したラットの糞を採取し、糞中の4'-GL量をHPLCを用い測定した。その結果、今回の試験では4'-GLを摂取した一群のラットの糞からはまったく4'-GLは検出されなかった。

Table 6-3. Distribution of the radioactivity in rats after oral administration of ^{14}C -4'-GL and ^{14}C -Lactose.

| | Body weight (g) | Total respiratory CO_2 (%) | Total urinary excretion (%) | Total fecal excretion (%) | Intestinal and cecal contents (%) | Liver (%) | Serum (%) | Carcass (%) | Total (%) |
|-------------------|----------------------|--|--|-----------------------------------|---|----------------|----------------|------------------|----------------|
| Conventional rats | | | | | | | | | |
| Lactose (n=5) | 195.4±8.1 | 41.58±0.08 | 3.20±0.18 | 1.17±0.47 | 6.43±0.31 | 1.84±0.09 | 0.96±0.04 | 22.54±0.98 | 77.72 |
| 4'-GL (n=5) | 196.2±8.5 | 47.00±3.60 | 4.64±0.61 | 3.29±1.46 | 9.46±1.24 | 1.44±0.07 | 0.63±0.02 | 12.90±0.37 | 79.36 |
| Germfree rats | | | | | | | | | |
| Lactose (n=5) | 81.4±2.8 | 45.92±3.15 | 3.72±0.89 | 1.41±0.72 | 14.63±0.77 | 1.12±0.08 | 0.68±0.05 | 14.40±0.79 | 81.88 |
| 4'-GL (n=4) | 83.4±0.5 | 17.72±2.95 | 5.50±0.71 | 0.50±0.20 | 58.31±6.52 | 0.56±0.09 | 0.43±0.12 | 7.71±0.62 | 90.72 |

Rats were not given the diet for 24 hours before and after the dose of ^{14}C -4'-GL or ^{14}C -lactose. ^{14}C -4'-GL or ^{14}C -lactose was orally administered. The values are expressed as % of the radioactivity excreted for 24 hours to the radioactivity administered. Each value represents as the mean±S.E..

4. 4'-GL摂取の生体に及ぼす影響

4 - 1. 実験方法

4'-GL摂取の生体に及ぼす影響

- 1) 実験動物 実験には日本クレアより購入したSD系雄ラットを用いた。3週齢のラット(体重約50g)を1群6匹とし、5% 4'-GL群、10% 4'-GL群、10% ラクトース群、10% ラクチュロース群、対照群の5群に分け、Table 1 6-4に示した組成の飼料を用い6週間飼育した。飼料および水は自由に摂取させた。
- 2) 体重、摂食量、糞量の測定 4'-GL投与実験におけるラットの体重と飼料の摂食量は2日毎に測定した。糞量は屠殺する7日前から3日前まで連続4日間測定し、1日当りの量を算出した。糞は乾燥重量を測定した。
- 3) 消化管および各臓器重量 小腸、盲腸、結腸は内容物を生理食塩水で除去した後、湿重量を測定した。その他の臓器は解剖後ただちに重量を測定した。
- 4) 血清および肝臓脂質の測定 血清コレステロール、高密度リポタンパク(HDL)コレステロール、リン脂質はそれぞれデタミナー TC555、デタミナー HDL、デタミナー PL(協和メデックス社)を用い酵素法で、中性脂肪はトリグリセライドテスト・ワコー(和光純薬工業㈱)を用い定量した。肝臓コレステロール量とリ

Table 6-4. Composition of diets

| | Control | 5% 4'-GL | 10% 4'-GL | 10% Lactose | 10% Lactulose |
|-------------------------------------|---------|----------|-----------|-------------|---------------|
| α-Corn starch | 65.0 | 60.0 | 55.0 | 55.0 | 55.0 |
| 4'-GL | — | 5.0 | 10.0 | — | — |
| Lactose | — | — | — | 10.0 | — |
| Lactulose | — | — | — | — | 10.0 |
| Cellulose | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| Casein | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 | 22.0 |
| DL-Methionine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Corn oil | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Salt mixture ^a | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mixture ^a | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Total digestible nutrients (kcal/g) | 3.61 | 3.43 | 3.25 | 3.65 | 3.25 |

The energy values of 4'-GL and lactulose were taken 0 kcal/g. Other nutrients were quoted from Standard Table of Food Composition in Japan (IV ed.).

^a AIN-76 TM (Oriental Yeast Co., Tokyo)

ン脂質量はクロロホルム-メタノール混液で抽出後、 辻らの方法(60)を用い上記酵素法で定量した。

4 - 2. 実験結果

4'-GL摂取の生体に及ぼす影響 4'-GLは *in vitro*

の実験において消化酵素によって加水分解されないことが明らかになったので、 4'-GL摂取の生体に及ぼす影響を検討した。 AIN-76を基本飼料とし、 4'-GL 5%、 10%を含んだ飼料で3週齢のラット(体重約50g)を6週間飼育し、 体重増加、 各臓器重量の変化ならびに血清および肝臓脂質に対する影響を調べた。 また、 4'-GL摂取による4'-GL加水分解酵素の誘導についても調べた。 同時に4'-GLの構成糖であるラクトースやラクチュロースを10%含む飼料で同様にラットを飼育し、 4'-GL群と比較した。

1) 体重増加、 飼料摂取量、 糞便量 Fig.6-7に各群の体重増加を示した。 4'-GL投与群は投与開始3週間ごろから対照群に比べ若干の体重増加が認められ、 日時の経過とともに差異が少しずつ大きくなった。 6週間後では10% 4'-GL群は対照群に比べ体重増加に有意差が認められた。

各群の投与6週間後における体重、 飼料摂取量、 糞便量をTable 6-5に示した。 4'-GL群は対照群と比べ飼料摂取量が多く、 5%および10% 4'-GL群では有意差($P <$

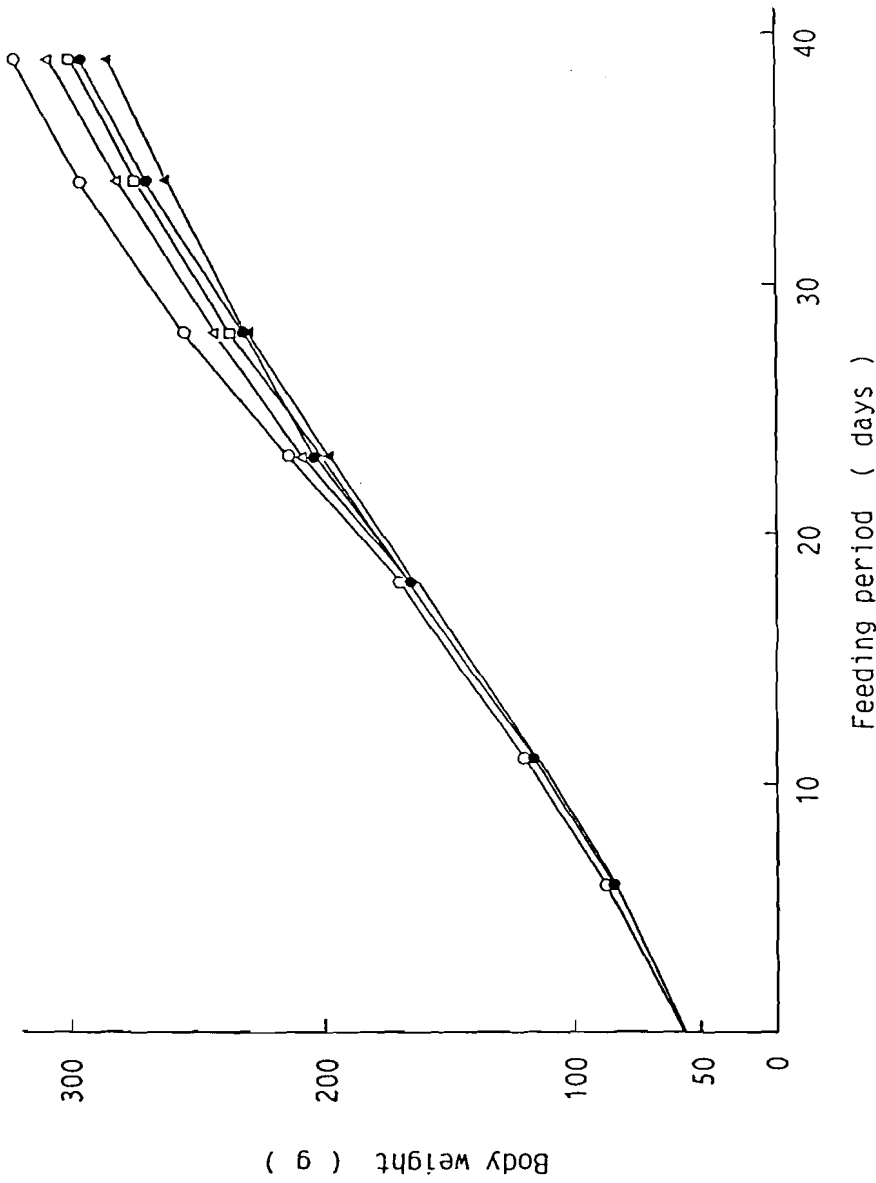


Fig.6-7. The increase of body weight of rats.
 Male SD rats(3 Weeks of age) were given experimental diets supplemented with 5% 4'-GL, 10% 4'-GL, 10% lactose or 10% lactulose for 6 weeks.
 Six rats in each group were kept in a cage at room temperature. Food and water were given ad libitum.
 ●: control diet group, △: 5% 4'-GL diet group, ○: 10% 4'-GL diet group, ▲: 10% lactose diet group, □: 10% lactulose diet group.

Table 6-5. Effect of 4'-GL feeding on body weight and fecal weight in rats.

| | Control | 5% 4'-GL | 10% 4'-GL | 10% Lactose | 10% Lactulose |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------|
| Net body weight gain ^a | | | | | |
| (g/39days) | 239.4 ± 7.7 | 248.4 ± 10.6 | 267.1 ± 7.9* ^b | 223.9 ± 6.9 | 238.3 ± 8.8 |
| Food intake | | | | | |
| (g/39days) | 616.3 ± 14.4 | 666.3 ± 15.0* | 673.5 ± 12.9* | 620.2 ± 13.3 | 634.8 ± 20.9 |
| Feed conversion ratio | | | | | |
| (food/gain) | 2.58 ± 0.03 | 2.69 ± 0.06 | 2.57 ± 0.08 | 2.77 ± 0.04** | 2.67 ± 0.02 |
| (kcal/gain) ^c | 9.31 ± 0.12 | 9.24 ± 0.21 | 8.35 ± 0.27** | 10.14 ± 0.17** | 8.66 ± 0.08** |
| Fecal weight | | | | | |
| (dried g/day) | 1.19 ± 0.08 | 1.48 ± 0.11* | 1.66 ± 0.07** | 1.30 ± 0.07 | 1.61 ± 0.08** |

Each value represents as the mean ± S.E. of 6 rats.

^a Net body weight gain was taken by subtraction of initial body weight and final gastrointestinal contents from final body weight.

^b Significant difference from the control group :*, p < 0.05; **, p < 0.01.

^c The values (kcal) were calculated using the values of total digestible nutrients in

Table 6-4.

0.05)が認められた。しかしながら、飼料効率はほとんど同じ値を示した。

また、1日当りの糞便量は5%および10% 4'-GL群どちらにおいても有意(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)に増加した。10%ラクチュロース群の糞便量も10% 4'-GLと同様に有意($P < 0.01$)に増加したが、10%ラクトース群には有意差は認められなかった。10% 4'-GL群および10%ラクチュロース群では投与初期において下痢が観察されたが、2週間後には回復した。

2) 消化管、各臓器重量および盲腸内容物重量

飼育6週間後の各群の消化管とその他の臓器重量をTable 6-6に示した。5%および10% 4'-GL群とも盲腸重量が対照群に比べ有意($P < 0.01$)に増大し、特に10% 4'-GL群の盲腸の肥大は顕著で対照群の約3倍であった。

結腸重量の増大も5%および10% 4'-GL群、10%ラクトース群、10%ラクチュロース群で有意差($P < 0.05$)が認められたが、肥大の程度は盲腸と比べ小さかった。

一方、胃や小腸などの消化管や、肝臓、心臓、腎臓、脾臓などその他の臓器重量には有意な変化はなかった。

Fig. 6-8に各群の盲腸重量、盲腸内容物重量、糞便量を示した。4'-GL群の盲腸内容物重量は盲腸重量や糞便量の増加と同様に、対照群と比べ有意($P < 0.01$)に増加した。10%ラクトース、10%ラクチュロース群においても盲腸内容物重量が有意に増加した。

3) 血清脂質および肝臓脂質の変化 以上のこと

Table 6-6. Effect of 4'-GL feeding on the wet weight of various organs in rats.

| | Control | 5% 4'-GL | 10% 4'-GL | 10% Lactose | 10% Lactulose |
|-----------------|-----------|--------------------|-------------|-------------|---------------|
| | | (% of body weight) | | | |
| Stomach | 0.45±0.02 | 0.46±0.02 | 0.47±0.05 | 0.56±0.04** | 0.50±0.03 |
| Small intestine | 2.18±0.07 | 2.32±0.11 | 2.25±0.10 | 2.22±0.11 | 2.35±0.08 |
| Cecum | 0.26±0.02 | 0.50±0.01** | 0.95±0.11** | 0.35±0.14 | 0.54±0.03** |
| Colon | 0.27±0.02 | 0.33±0.01* | 0.34±0.01* | 0.30±0.01* | 0.32±0.01* |
| Liver | 2.77±0.05 | 2.91±0.04 | 2.83±0.06 | 2.76±0.02 | 2.95±0.02 |
| Heart | 0.33±0.01 | 0.35±0.01 | 0.32±0.01 | 0.34±0.01 | 0.34±0.01 |
| Kidney | 0.81±0.02 | 0.79±0.01 | 0.79±0.02 | 0.82±0.01 | 0.80±0.03 |
| Spleen | 0.22±0.01 | 0.20±0.01 | 0.20±0.01 | 0.22±0.01 | 0.22±0.01 |

Each value represents as the mean ±S.E. of 6 rats.

* Significant difference from control group ;*,P<0.05;**,P<0.01.

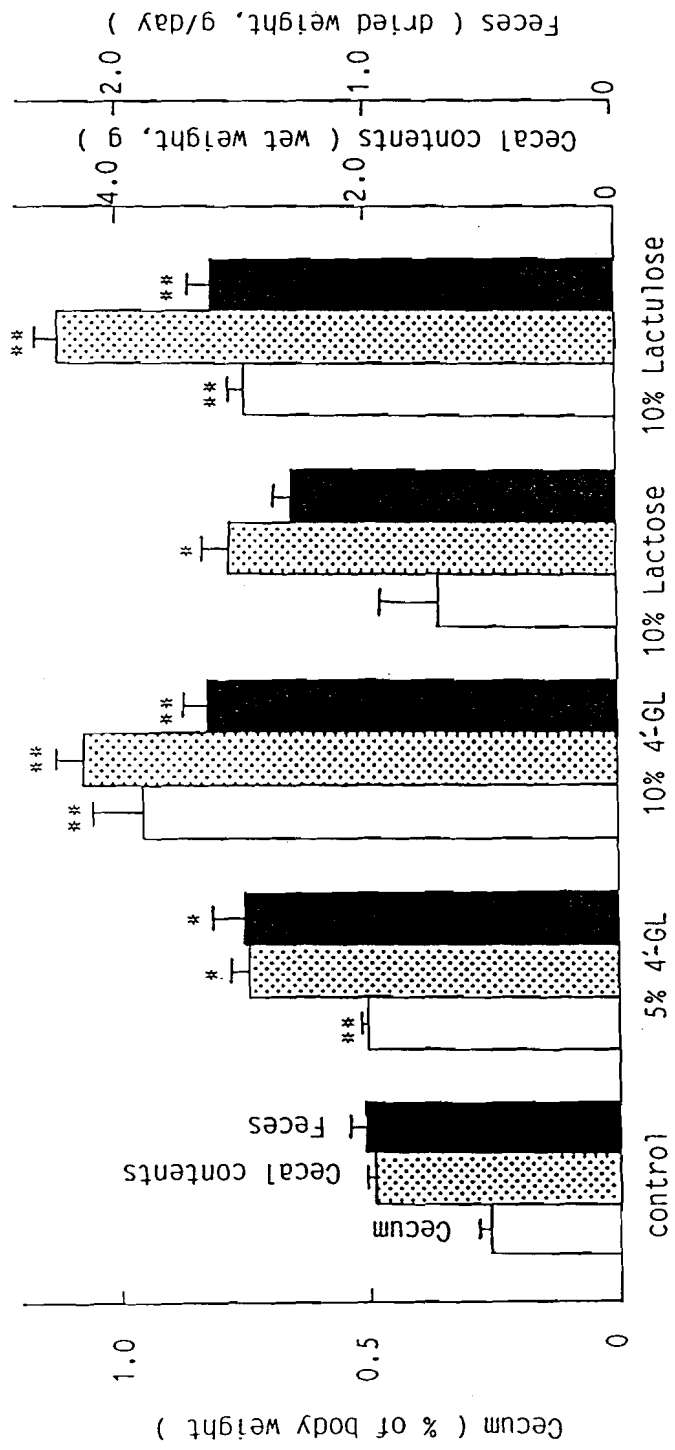


Fig.6-8. Effect of 4'-GL intake on the weight of cecum, cecal contents and feces.

Male SD rats(3 Weeks of age) were given experimental diets supplemented with 5% 4'-GL, 10% 4'-GL, 10% lactose or 10% lactulose for 6 weeks.

Six rats in each group were kept in a cage at room temperature. Food and water were given ad libitum.

*, **, Significant difference from control group at $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively.

から、4'-GLは生体内において食物繊維とよく似た挙動を示すことが明かになったので、4'-GL摂取によるコレステロール代謝の影響について検討するために、血清脂質および肝臓脂質の変化を調べた。4'-GLおよび比較のためのラクトース、ラクチュロースを6週間摂取したときの血清脂質と肝臓脂質の変化をTable 6-7に示した。4'-GL群における投与6週間後の血清コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪濃度は、対照群に比べ若干の増加が認められたが有意差はなかった。しかし、10%ラクチュロース群において血清コレステロール、中性脂肪、リン脂質が有意($P < 0.05$)に減少した。

また、肝臓のコレステロール、中性脂肪、リン脂質も、4'-GL群と対照群のあいだには有意差が認められず4'-GL投与による肝臓脂質への影響はなかった。

4) 4'-GL摂取による4'-GL加水分解酵素の誘導

4'-GLを長期間摂取した場合の小腸における4'-GL加水分解酵素の誘導を検討するために5% 4'-GLおよび10% 4'-GL、を含む飼料で6週間飼育した上記ラットの腸粘膜酵素による4'-GLおよびマルトース、シュークロース、ラクトースの加水分解を調べた。十二指腸、空腸、回腸部位の小腸粘膜酵素を用いて4'-GLの加水分解を調べた結果をTable 6-8に示した。4'-GL摂取群は対照群とほぼ同じ値を示し4'-GL摂取による4'-GL加水分解酵素の誘導は認められなかった。また、4'-GL摂取による小腸粘膜酵素のマルトース、シュークロース、

Table 6-7. Effect of 4'-GL feeding on serum and liver lipid levels.

| | Control | 5% 4'-GL | 10% 4'-GL | 10% Lactose | 10% Lactulose |
|---------------------|-----------|-----------|------------|-------------|-----------------------|
| Serum lipid (mg/dl) | | | | | |
| Cholesterol | 86.8±4.7 | 84.4±7.3 | 92.6±13.7 | 82.1±3.9 | 69.8±5.0 ^a |
| HDL-cholesterol | 60.0±3.1 | 64.0±5.5 | 65.6±7.4 | 61.1±3.5 | 53.2±3.7 |
| Triglyceride | 89.6±10.1 | 91.9±13.4 | 91.9±9.5 | 62.8±7.7 | 60.7±7.3* |
| Phospholipid | 166.2±8.3 | 157.8±9.2 | 165.9±17.0 | 146.1±7.1 | 123.3±8.0* |
| Liver lipid (mg/g) | | | | | |
| Cholesterol | 3.19±0.07 | 3.39±0.15 | 3.33±0.20 | 3.23±0.20 | 3.35±0.19 |
| Triglyceride | 24.4±3.56 | 26.6±4.45 | 26.1±5.41 | 20.0±2.61 | 15.8±2.65 |
| Phospholipid | 23.9±0.44 | 23.3±0.40 | 22.5±0.85 | 21.7±0.51** | 21.6±0.85* |

Each value represents as the mean ±S.E. of 6 rats.

^a Significant difference from control group :*,P<0.05;**,P<0.01.

Table 6-8. Effect of long-term ingestion of 4'-GL on saccharide-degrading activities of small intestine mucosa.

| | Control | 5% 4'-GL | 10% 4'-GL | 10% Lactose | 10% Lactulose |
|---|--------------|--------------|--------------------------|--------------|----------------|
| (nmoles substrate hydrolyzed / mg protein·hr) | | | | | |
| 4'-GL | | | | | |
| Duodenum | 12.2 ± 1.2 | 11.6 ± 1.3 | 11.7 ± 1.6 | 11.9 ± 1.0 | 3.9 ± 0.8** |
| Jejunum | 23.2 ± 2.6 | 28.1 ± 1.6 | 25.5 ± 1.9 | 29.0 ± 2.1 | 16.5 ± 1.7* |
| Ileum | 10.7 ± 0.8 | 13.5 ± 1.4* | 13.5 ± 1.6* | 10.4 ± 1.2 | 10.1 ± 0.9 |
| Maltose | | | | | |
| Duodenum | 12810 ± 680 | 11980 ± 770 | 10110 ± 860 ^a | 9100 ± 640** | 4360 ± 650** |
| Jejunum | 30240 ± 1140 | 30760 ± 1970 | 28150 ± 2190 | 29750 ± 2150 | 20400 ± 1220** |
| Ileum | 21440 ± 710 | 22260 ± 1410 | 19760 ± 1490 | 17530 ± 1280 | 16480 ± 930** |
| Sucrose | | | | | |
| Duodenum | 3940 ± 240 | 3260 ± 150* | 2810 ± 170** | 2440 ± 90** | 1340 ± 70** |
| Jejunum | 5950 ± 230 | 6320 ± 440 | 5500 ± 490 | 6180 ± 310 | 4460 ± 220** |
| Ileum | 2400 ± 150 | 3270 ± 310 | 2310 ± 170 | 3110 ± 160 | 2750 ± 230 |
| Lactose | | | | | |
| Duodenum | 577 ± 53 | 520 ± 20 | 490 ± 40 | 440 ± 20* | 280 ± 50** |
| Jejunum | 2100 ± 210 | 2160 ± 180 | 2200 ± 180 | 1870 ± 180 | 1530 ± 100* |
| Ileum | 1200 ± 140 | 1740 ± 130** | 1470 ± 160 | 1510 ± 140 | 1170 ± 80 |

Rats were raised on a control diet, 5% 4'-GL diet, 10% 4'-GL diet, 10% lactose diet or 10% lactulose diet for 6 weeks.

Each value represents as the mean ± S.E. of 6 rats.

^a Significant difference from control group :*, P < 0.05; **, P < 0.01.

ラクトースの加水分解に与える影響もなかった。

同様に10%ラクチュロースを摂取した群の小腸各部位の粘膜酵素によるマルトース、シュークロース、ラクトースに対する加水分解活性を調べたところ、酵素活性が有意 ($P < 0.01$) に低下していた。

5. 考察

糖質の生体利用に関する研究は、グルコースやフラクトースなど易消化性糖質では、 ^{14}C -グルコース、 ^{13}C -グルコース、 ^{14}C -フラクトースなどを用い、ヒトやラットにおける代謝機構の解明が行われてきた(61~63)。一方、セルロースなど難消化性糖質に関しても、 ^{14}C -セルロースを用い、腸内細菌による分解とその代謝産物である、短鎖脂肪酸について研究が行われている(64,65)。辻ら(66)はこれまで個々の糖質について行われてきたエネルギー評価を比較検討するため、 ^{14}C でラベルした各種易消化性糖質や、セルロース、イヌリンなどをラットに投与し、生体における代謝の様子を検討している。

近年、ラクチュロースやマルチトール、パラチノース、フラクトオリゴ糖など付加価値を有する各種オリゴ糖が開発され、それらの生体利用に関する研究が進んでいる(67~76)。

4'-GLはヒトが摂取した場合、便秘の改善(53)など食物繊維様作用が認められることから、小腸などで消化及吸収されずに大腸に到達したと推察される。しかしながら、生体内でどのように利用され、また生体にどのような影響を及ぼすか明かではなかった。

4'-GLの生体における消化吸収を検討するためにヒト唾液アミラーゼ、ブタ膵液アミラーゼやラットの小腸

粘膜酵素を用い *in vitro* における 4'-GL の加水分解を調べたところ、これらの消化酵素ではほとんど加水分解されないことが明らかになった。4'-GL は *Cryptococcus laurentii* OKN-4 株の β -ガラクトシダーゼの転移反応によってラクトースから生成されたオリゴ糖であるので、小腸粘膜に局在する β -ガラクトシダーゼによって加水分解される可能性が考えられた。しかし、Table 6-1 に示したように 4'-GL はラクトースの加水分解の約 85 分の 1 と非常に低い値であった。この値は、パラチノースやマルチトールのラット小腸粘膜酵素による加水分解 (77) と比べ相当低い値であり、フラクトオリゴ糖同様ほとんど加水分解されなかった (73)。また、10% 4'-GL を含む飼料で 6 週間飼育したラットにおいても 4'-GL を加水分解する酵素の誘導は認められず、4'-GL は消化酵素によって分解され難い糖質であることが明らかになった。

Nilsson ら (78) は、ヒトの胃液を用い シュークロースやフラクタンの加水分解を行ったところ、pH 2.2、37°C 60 分間反応では加水分解されないことを報告している。今回の実験において胃内での 4'-GL 加水分解の検討を人工胃液を用いて行ったところ、4'-GL は pH 1.0、37°C において 6 時間保持してもまったく加水分解されないことから、胃内においても加水分解を受けないと考えられる。

次に、4'-GL の生体内での挙動を明かにするために、

^{14}C でラベルした4'-GLをラットに経口投与しその代謝と排泄を調べた。通常ラットに ^{14}C -4'-GLを経口投与し呼気中に排出される $^{14}\text{CO}_2$ を測定したところ、対照として用いた ^{14}C -ラクトース投与群に比べ $^{14}\text{CO}_2$ 排出に約5時間の遅れが認められたが、投与後24時間内に排出された総 $^{14}\text{CO}_2$ 量は ^{14}C -ラクトース投与群より数%増加した。ラクトースはラットの小腸粘膜酵素で加水分解されることから ^{14}C -ラクトースからの $^{14}\text{CO}_2$ 排出は、生体によって代謝された結果と考えられる。しかしながら、4'-GLは in vitroにおいて小腸粘膜酵素で加水分解されないことや、 ^{14}C -グルコースをラットに経口投与するよりも、経盲腸投与するほうが呼気中への $^{14}\text{CO}_2$ 排出が多くなるというBondら(61)の報告から考え、 ^{14}C -4'-GLからの $^{14}\text{CO}_2$ 排出には腸内細菌が関与していると推察された。

そこで、次に抗生物質を与え腸内細菌を減少させたラットや無菌ラットを用い同様の実験を行った。抗生物質処理ラットに ^{14}C -4'-GLを投与した場合 $^{14}\text{CO}_2$ の排出が一層遅れ、24時間内の総排出量も減少した。この傾向は無菌ラットを用いた場合さらに顕著で、 ^{14}C -4'-GLからの $^{14}\text{CO}_2$ の排出量は ^{14}C -ラクトースからの排出量の39%に減少した。また、投与した ^{14}C -4'-GLの58%が腸内容物中に残存し、肝臓や血清、カーカス中に分布した ^{14}C はわずかであったことなどから、4'-GLの生体による利用はラクトースと比べ相当低いと考えられる。

完全無菌状態で無菌ラットを用いた場合、 $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ から $^{14}\text{CO}_2$ は排出されないと予想されるが、本研究で $^{14}\text{CO}_2$ が少ないながらも排出されたのは、実験開始後より菌の感染がすみやかに始まり無菌状態が維持できなくなった結果、細菌が増殖し $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ が代謝されたためと考えられる。

4'-GLを摂取した場合の腸内フローラの変動による4'-GLの代謝の影響を調べるために5% 4'-GLを含む飼料で2週間飼育したラットに $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ を投与し $^{14}\text{CO}_2$ の排出を測定した。ラットに4'-GLを飼料と共に摂取させるとBifidobacteriumが増加し、EnterobacteriaceaeやLactobacillusが減少するなど腸内フローラの変動が生じる(79)。このようなラットに $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ を投与すると4'-GL無添加の飼料で飼育したラットに比べ $^{14}\text{CO}_2$ の排出量が多くなった。これは4'-GLを摂取したことによりBifidobacteriumなど4'-GLを利用できる腸内細菌が増えたためと考えられる。

以上の結果から、 $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ をラットに投与した場合 ^{14}C -ラクトースと同様に $^{14}\text{CO}_2$ が排出されたが、 $^{14}\text{C}-4'-\text{GL}$ からの $^{14}\text{CO}_2$ の生成には生体による代謝よりも腸内細菌が大きく関与していることが明らかになった。

最後に、ラットに4'-GLを6週間投与した時のラットの成長や生体に及ぼす影響を調べた。

4'-GL群の真の体重増加量は5%添加群では対照群と比べ若干増加の傾向を示し10%添加群では有意に増加した。

4'-GL群の飼料摂取量が対照群に比べ増加していたので、飼料効率を求めたところ両群間に差は認められなかった。これらの結果から4'-GL群の体重増加は飼料摂取量の増加によるものと考えられるが、なぜ飼料摂取量が増加したかは現時点では明かではない。

一方、4'-GLは消化酵素では加水分解されないことから、生体内において食物繊維とよく似た挙動を示すことが考えられたので、4'-GL摂取による消化管および血清脂質、肝臓脂質の変化を調べた。

4'-GLを摂取したラットの消化管の重量を測定したところ盲腸と結腸の重量が対照群に比べ有意 ($P < 0.01$) に増大していた。グルコマンナンやペクチン、グアガム、セルロースなど難消化性多糖をラットに摂取させると未消化物が増大し、盲腸や結腸が肥大することが報告されている(80~82)。今回4'-GLをラットに摂取させた場合も盲腸内容物や糞量の増加など同様な現象を示していることから、4'-GLはグルコマンナンのように生体では消化吸収されにくい糖質であると考えられる。

辻ら(59,83,84)はラットにコンニャクマンナンやアルギン酸ナトリウムなど一連の水溶性食物繊維を摂取させた場合のコレステロール代謝について報告している。また、Hayashi(85)らは、ヒトの血清脂質代謝に及ぼす4'-GLの影響について報告している。今回の実験では、4'-GL摂取による血清脂質および肝臓脂質の変化は認められなかったが、高コレステロールの飼料を

4'-GLといっしょに摂取させた場合、食物繊維同様コレステロールの吸収が対照群に比べ低下する可能性が考えられる。

一連の実験から、4'-GLは小腸では消化吸収されず、生体によって利用され難い糖質であることが明らかになった。しかしながら、4'-GLは大腸において Bifidobacterium などの腸内細菌によって利用されるため(6)、腸内細菌の代謝物である短鎖脂肪酸が大腸から吸収されエネルギー源となる可能性がある。

Johnsonら(65)は ^{14}C でラベルしたタバコとソイビーンのセルロースをラットに経口投与した後、呼気 $^{14}\text{CO}_2$ 量、糞と尿中に排泄された ^{14}C 量、カーカスに残存している ^{14}C 量を測定し利用率を求めたところ、セルロースの約31%がラットによって利用されたと報告している。セルロースはグルコースなど易消化性糖類と異なり小腸ではほとんど消化吸収されず、盲腸において腸内細菌によって分解されることが知られている(86, 87)。それで排出された $^{14}\text{CO}_2$ は、腸内細菌によってセルロースから直接生成されたものと、代謝産物の短鎖脂肪酸などが大腸から吸収され(61, 88)、生体によって利用された後 $^{14}\text{CO}_2$ として排出されたものがあると考えられる。

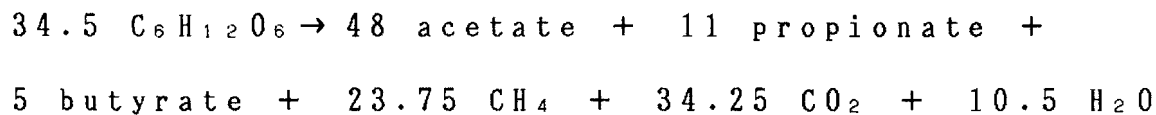
Hosoyaら(75)は ^{14}C -フラクトオリゴ糖を用い、ヒト糞便と in vitro で嫌氣的に反応させた場合、腸内細菌によってフラクトオリゴ糖の48%が酢酸やプロピオン酸、

酪酸などの有機酸に代謝されていることを報告している。その結果からフラクトオリゴ糖のエネルギー値を1.5kcal/gと計算している。

4'-GLは消化酵素ではほとんど分解を受けない難消化性の糖質であり、また今回の実験において4'-GLをラットに摂取させてもまったく糞中に排泄されないことから、摂取した4'-GLのほとんど100%が大腸において腸内細菌により発酵を受けたと考えられる。

4'-GLは腸内細菌によって利用されたときフラクトオリゴ糖同様有機酸の生成が生じるため(6)、生成した有機酸が大腸において吸収されエネルギーとして利用される可能性が考えられる。

ヒトの腸内細菌の発酵による糖と生成物の量比はWolinら(89)によって次式のように報告されている。



このうち生体内でエネルギー源として利用される酢酸、プロピオン酸、酪酸の保有エネルギーはそれぞれ209.0、370.4、528.7kcal/molである(90)。この値を上式に代入し計算した場合、エネルギー値は2.70kcal/gとなる。よって4'-GLのような難消化性糖質1gを摂取した場合そのすべてが発酵を受けたとすると、そのとき生成される有機酸が保有している総エネルギー量は2.70kcal/gとなる。

生体における有機酸のエネルギー利用効率 は現在の

ところ不明であるが、Blackら(91)の報告によれば、ヒツジにおける酢酸のエネルギー利用効率を50~70%としている。また、四訂日本食品標準成分表(1982)では酢酸のエネルギー換算係数は2.40kcal/gとなっている。酢酸の保有エネルギー量は3.48kcal/gであるので、この差からエネルギー利用効率を計算すると69%($2.40 \div 3.48 \times 100 = 69$)となる。プロピオン酸、酪酸のエネルギー利用効率は酢酸とは異なると考えられるが現在のところ報告されていないので、酢酸のそれと同一であると見なし69%とした。この値を用い4'-GL 1gが発酵を受けたときの有効エネルギーを計算すると1.86kcal/g ($2.70 \times 0.69 = 1.86$)となった。

この値は有機酸生成比率やエネルギー利用効率などいくつかの仮定の上になりたっているので、この点に関してはさらに詳細な検討が必要であるが、4'-GLのエネルギー値が1.5~2.0kcal/gである可能性が示唆される。

6. 要約

Cryptococcus laurentii OKN-4株によりラクトースから生成される $\text{O}-\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-O}-\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-glucopyranose}$ (4'-GL)の生体における消化吸収を検討するために、人工胃液、ヒト唾液アミラーゼ、ブタ膵液アミラーゼ、ラット小腸粘膜酵素を用い、in vitroにおける4'-GLの加水分解を調べた。4'-GLはこれらの消化酵素によつてはほとんど分解されなかつた。また、6週間ラットに4'-GL摂取させても4'-GL分解酵素の誘導も認められなかつた。

4'-GLの生体による利用を検討するために ^{14}C -4'-GLをラットに投与し、その代謝と排泄を調べた。 ^{14}C -ラクトース 1.1×10^7 Bqから Cryptococcus laurentiiを用い培養によつて 2.3×10^6 Bqの ^{14}C -4'-GLを生成した。通常ラット、抗生物質処理ラット、無菌ラットにそれぞれ ^{14}C -4'-GL、 ^{14}C -ラクトースを37 kBq経口投与し呼吸中に排出される $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 量を測定したところ、通常ラットの ^{14}C -4'-GL投与群の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 排出が ^{14}C -ラクトース投与群より5時間以上の遅れが認められた。この傾向は抗生物質処理ラット、無菌ラットで顕著であつた。また、無菌ラットにおいては ^{14}C -4'-GL投与群の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 総排出量が著しく減少し、 ^{14}C -ラクトース投与群の約3分の1になつた。 ^{14}C -4'-GL投与群は、 ^{14}C -ラクトース

投与群と比べ、血清、肝臓、カーカス中の ^{14}C 量が少なく、糞や尿への ^{14}C 排泄量が多かった。

ラットに6週間4'-GLを含む飼料を摂取させ、体重増加、各臓器重量、血清および肝臓脂質の変化を調べた。5%および10% 4'-GL群は対照群と比べ若干の体重増加が認められたが有意差はなかった。しかし、飼料摂取量、糞量が4'-GL群において有意($P < 0.05$)に増加した。また、盲腸、結腸が4'-GL摂取により有意($P < 0.01$)に増加し内容物量も増えていた。胃や小腸、肝臓などその他の臓器重量は変化しなかった。一方、4'-GL摂取による血清脂質および肝臓脂質に与える影響は認められなかった。

第7章 4'-ガラクトシルラクトースの腸内フローラに及ぼす影響

1. 序

ヒトの腸内フローラを構成する細菌のうち Bifidobacterium が生体に対して種々の有用な生理的役割を演じていることが Mitsuoka (92) によって報告されている。

Bifidobacterium は乳児には多く見られるが加齢とともに減少していくため (93)、最近 Bifidobacterium を増加させるために数々の Bifidobacterium 含有製剤 (94) やそれを含む乳製品が開発されている。しかしながら、Bifidobacterium の菌体を経口的に摂取しても一般的には定着しにくいとされている。

一方、Bifidobacterium の腸内増殖因子に関する研究は Gyorgy ら (95~99) のヒト乳中の N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖の研究に始まり、Tamura らがニンジン中の微量物質の効果について検討を行っている (100~102)。近年では、Yazawa ら (103, 104) により各種オリゴ糖の効果について報告されている。また、Hidaka ら (5) は Aspergillus niger のフラクトシルトランスフェラーゼをシュークロースに作用させて生成したフラクトオリゴ糖が Bifidobacterium の増殖物質として有効であることを報告している。

4'-GL は第6章で述べたように、小腸などで消化吸収

されず生体にとって利用され難い糖質であることが明らかになった。また、通常ラットと無菌ラットに ^{14}C -4'-GLを投与した場合の $^{14}\text{CO}_2$ 排出量の結果から、4'-GLの代謝に腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

そこで、ヒトの腸内フローラを構成する細菌による in vitro における4'-GLの資化性と、ラットおよびヒトが4'-GLを摂取した時の腸内フローラに及ぼす影響について検討した。

2. ヒト腸内フローラ構成菌による4'-GLの資化性

2-1. 実験方法

4'-GLの調製 ラクトースを含む培地で

Cryptococcus laurentii OKN-4株を30℃、4日間培養を行い4'-GLを蓄積させた。培養液をカーボン・セライトカラムを用いて分画し、凍結乾燥後エタノールにより結晶化させ4'-GLの結晶を得た。

in vitro における各種糖質の腸内菌による資化性

1) 供試菌株 供試菌株としてヒトの腸内構成菌群である Bifidobacterium 属 5菌種 26株、
Lactobacillus 属 4菌種 7株、 Bacteroides 属 5菌種 17株、
Clostridium 属 8菌種 12株、 Eubacterium 属 3菌種 10株、

Peptostreptococcus属 5菌種5株、Veillonella属 2菌種2株、Enterococcus属 4菌種7株、Escherichia属 1菌種6株、その他 9株の合計101株を使用した。

2) 供試糖質 糖質としては、4'-GL、ラクトース(純正化学工業㈱)、ラクチュロース(Merck社)、ラフィノース(和光純薬工業㈱)を用い、対照としてグルコース(純正化学工業㈱)を使用した。

3) 培養 Peptone-Yeast-Fildes solution(PYF)培地(105)(トリプチケース(BBL)10g、酵母エキス(Difco)10g、L-システイン塩酸塩 0.5g、消化血液40ml、塩類溶液40ml、蒸留水920ml、pH7.6)に各種糖質が0.5%になるよう添加した滅菌培地 5mlを調製し、あらかじめ前培養しておいた供試菌体液0.05mlを加え、嫌気条件下37℃、48時間スチールウール法(106)で培養を行った。

4) 資化性の判定 各種糖質の資化性は、菌体増殖を660nmにおける吸光度で調べ、判定は対照として用いたグルコースに対して吸光度が80%以上のものを*、40~80%を+、40%以下を-として表示した。

2-2. 実験結果

各種腸内菌による4'-GLなどの糖資化性試験結果をTable 7-1に示した。

4'-GLは、Bifidobacterium adolescentis、

B.bifidum, B.breve, B.infantis, B.longum 等ヒト由来の Bifidobacterium 属によく利用され、

Lactobacillus acidophilusを除く Lactobacillus属、Eubacterium属、Clostridium属、Peptostreptococcus属、Veillonella属、Enterococcus属、Escherichia属にはほとんど利用されなかった。しかし、Bacteroides属のうち Bacteroides fragilis, B.distasonis, B.vulgatus 等にはラクチュロースやラフィノースと同様に利用された。

ラクチュロースは、Bacteroides属、Lactobacillus属、Eubacterium属、Clostridium属、Enterococcus属、Escherichia属など、Bifidobacterium属以外の多くの腸内菌によく利用された。

以上の結果から、4'-GLは Bifidobacteriumに資化されやすく、有害菌とされる Clostridium perfringens, Clostridium paraputrificum, Clostridium difficileをはじめ他の腸内菌に利用されにくい Bifidobacteriumに選択的なオリゴ糖であることが明らかになった。

Table 7-1. Availability of 4'GL by various intestinal bacteria.

| Bacterial species | No. of strains | Glucose | 4'GL | Lactose | Lactulose | Raffinose | Bacterial species | No. of strains | Glucose | 4'GL | Lactose | Lactulose | Raffinose |
|-------------------------------------|----------------|---------|------|---------|-----------|-----------|---|----------------|---------|------|---------|-----------|-----------|
| <u>Bifidobacterium adolescentis</u> | 7 | * | * | * | * | * | <u>Clostridium innocuum</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Bifidobacterium bifidum</u> | 6 | * | * | * | * | - | <u>Clostridium perfringens</u> | 3 | * | - | * | * | - |
| <u>Bifidobacterium breve</u> | 3 | * | * | * | * | * | <u>Clostridium ramosum</u> | 2 | * | - | * | * | + |
| <u>Bifidobacterium infantis</u> | 2 | * | * | * | * | * | <u>Eubacterium aerofaciens</u> | 6 | * | - | * | * | - |
| <u>Bifidobacterium longum</u> | 8 | * | * | * | * | * | <u>Eubacterium lentum</u> | 2 | - | - | - | - | - |
| <u>Lactobacillus acidophilus</u> | 2 | * | + | * | * | - | <u>Eubacterium limosum</u> | 2 | * | - | - | - | - |
| <u>Lactobacillus casei</u> | 2 | * | - | + | * | - | <u>Peptostreptococcus anaerobius</u> | 1 | * | - | * | * | - |
| <u>Lactobacillus gasseri</u> | 1 | * | - | * | * | + | <u>Peptostreptococcus asaccharolyticus</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Lactobacillus salivarius</u> | 2 | * | - | * | * | * | <u>Peptostreptococcus parvulus</u> | 1 | - | - | - | - | - |
| <u>Bacteroides distasonis</u> | 5 | * | * | * | * | * | <u>Peptostreptococcus prevotii</u> | 1 | * | - | - | - | * |
| <u>Bacteroides fragilis</u> | 2 | * | * | * | * | + | <u>Peptostreptococcus productus</u> | 1 | * | - | * | * | * |
| <u>Bacteroides ovatus</u> | 1 | * | - | * | * | * | <u>Propionibacterium acnes</u> | 1 | * | - | + | - | - |
| <u>Bacteroides uniformis</u> | 1 | * | - | * | * | - | <u>Fusobacterium necrophorum</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Bacteroides vulgatus</u> | 8 | * | * | * | * | + | <u>Fusobacterium varium</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Mitsuokella multiacidus</u> | 3 | * | - | * | * | * | <u>Veillonella alcalescens ss. dispar</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Rikenella microfusum</u> | 1 | * | - | + | - | - | <u>Veillonella parvula ss. parvula</u> | 1 | - | - | - | - | - |
| <u>Megasphaera hypermegas</u> | 1 | * | * | * | * | * | <u>Megasphaera elsdenii</u> | 1 | * | - | - | - | - |
| <u>Clostridium bifermentans</u> | 2 | * | - | * | * | * | <u>Enterococcus faecalis ss. faecalis</u> | 3 | * | - | - | + | + |
| <u>Clostridium butyricum</u> | 1 | * | - | + | + | + | <u>Enterococcus faecalis ss. liquifaciens</u> | 1 | * | - | - | * | * |
| <u>Clostridium clostridioforme</u> | 1 | - | - | - | - | - | <u>Enterococcus faecalis ss. zymogenes</u> | 1 | * | - | - | * | * |
| <u>Clostridium coccoides</u> | 1 | * | - | + | + | + | <u>Enterococcus faecium</u> | 2 | * | - | - | + | + |
| <u>Clostridium difficile</u> | 1 | * | - | - | - | - | <u>Escherichia coli</u> | 6 | * | - | + | - | - |

Judgment of bacterial growth : *, same level of growth compared to glucose; +, weaker growth compared to glucose; -, no growth.

3. ラットの腸内フローラに及ぼす影響

3 - 1. 実験方法

4'-GL経口投与試験

1) 実験動物 実験動物として6週齢のSD系雄ラット（静岡実験動物）30匹を用いて実験開始までNM粉末飼料（オリエンタル酵母㈱）で飼育した。

2) 4'-GLの投与スケジュール 7週齢のラット（体重約250g）を1群15匹とし、4'-GL群、対照群の2群に分けた。4'-GL群は実験開始時より連続20日間4'-GLを10%含むNM粉末飼料を摂取させ、最後の10日間は4'-GLの投与を中止した。対照群には、飼料としてNM粉末を摂取させた。なお、飼料および水は自由に摂取させた。実験開始10日毎にそれぞれ各群5匹ずつ麻酔で屠殺後、盲腸内容物を取り出し各菌群の検索及びpH測定に供した。

3) 盲腸フローラの測定 盲腸内の各菌群の測定は、Mitsuokaらの方法(107,108)に従って行った。分離用培地は、3種類の非選択培地と6種類の選択培地を併用した。盲腸内容物0.5gを嫌気状希釈液(108)4.5mlに加え、それを 10^{-1} 希釈液とし順次10倍希釈を行い 10^{-1} ～ 10^{-7} 希釈液を調製した。EG、BL、Trypticase soy (BBL) blood寒天培地には 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 希釈液を、また、BS、NBGT、LBS、DHL、TATAC、PEES寒天培地には、

10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 希釈液の各々 0.05mlを滴下し、コンラージ棒で一様に塗抹して嫌気条件下37℃、48時間スチールウール法(106)で培養を行った。

4) 盲腸内容物pHの測定 盲腸内容物のpHはpHメーターの電極を直接内容物に差込み測定した。

3 - 2. 実験結果

4'-GL投与の盲腸内フローラに与える影響

ラットが4'-GLを摂取した時の盲腸内の Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Micrococcaceae などの菌群の変動について検討した。

ラットに4'-GLを20日間摂取させたときの摂取10日目、20日目、摂取中止10日目の各菌群の総菌数に占める割合をTable 7-2に示した。各菌群の割合は、ラット5匹の総菌数の平均から算出した。なお、対照として4'-GLを含まない飼料で飼育した群を設け、4'-GL摂取群と比較した。4'-GL摂取中、Lactobacillus、Enterobacteriaceaeの減少が認められた。 Lactobacillusは4'-GL摂取10日目までは対照群と同じ割合を占めていたが、摂取20日目において対照群の70.8%に対し、43.0%と約3分の2まで減少した。しかし、摂取中止10日後には対照群と同じ割合までもどった。一方、Enterobacteriaceaeの減少は著しく4'-GL摂取10日目に

Table 7-2. The percentage of cecal flora of rats by 4'-GL intake.

| Cecal microflora | Day 10 | | Day 20 | | Day 30 | |
|---------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|--------------------------|
| | control group | 4'-GL group | control group | 4'-GL group | control group | 4'-GL group ^a |
| <u>Bifidobacterium</u> | 0.21 | 7.2 | 0.16 | 0.64 | 0.04 | 0.08 |
| <u>Lactobacillus</u> | 77.7 | 73.9 | 70.8 | 43.0 | 64.0 | 54.6 |
| Enterobacteriaceae | 0.38 | 0.04 | 0.45 | 0.05 | 0.90 | 0.30 |
| Streptococcaceae | 0.10 | 0.30 | 0.37 | 1.87 | 0.34 | 0.49 |
| Micrococcaceae | 0.16 | 0.49 | 0.35 | 0.49 | 0.12 | 0.12 |
| Total counts ^b | 9.8±0.2 | 9.6±0.1 | 9.6±0.1 | 9.3±0.2 | 9.4±0.1 | 9.3±0.3 |

Male SD rats (7 week of age) were given experimental diets supplemented with 10% 4'-GL.

Five rats in each group were kept in a cage at room temperature.

^a 10-day after discontinuing intake of 4'-GL.

^b Bacterial counts expressed as mean±SD of log No. per gram of wet cecum contents.

においてすでに対照群の0.38%に対し0.04%と約10分の1まで減少した。この現象は摂取20日目も同様であったが、4'-GLの摂取を中止すると増加の傾向を示した。ラットは Bifidobacterium の菌数が少ないため(92)、4'-GLを摂取した場合の Bifidobacterium 増加は個体差が大きかったが、4'-GL摂取10日目には Bifidobacterium の割合が総菌数の7.2%を占めるまで増加し、対照群の約35倍であった。4'-GL摂取20日目では0.64%に減少したが、まだ対照群の4倍であった。

4'-GL摂取による盲腸内容物のpHの変化を調べた結果をFig.7-1に示した。対照群は試験期間を通しほぼ一定の値を示したが、4'-GL群は摂取期間中pH5.4まで低下し有意差 ($p < 0.01$) が認められた。摂取中止10日目にはpHが上昇し、摂取前の値に戻る傾向を示した。

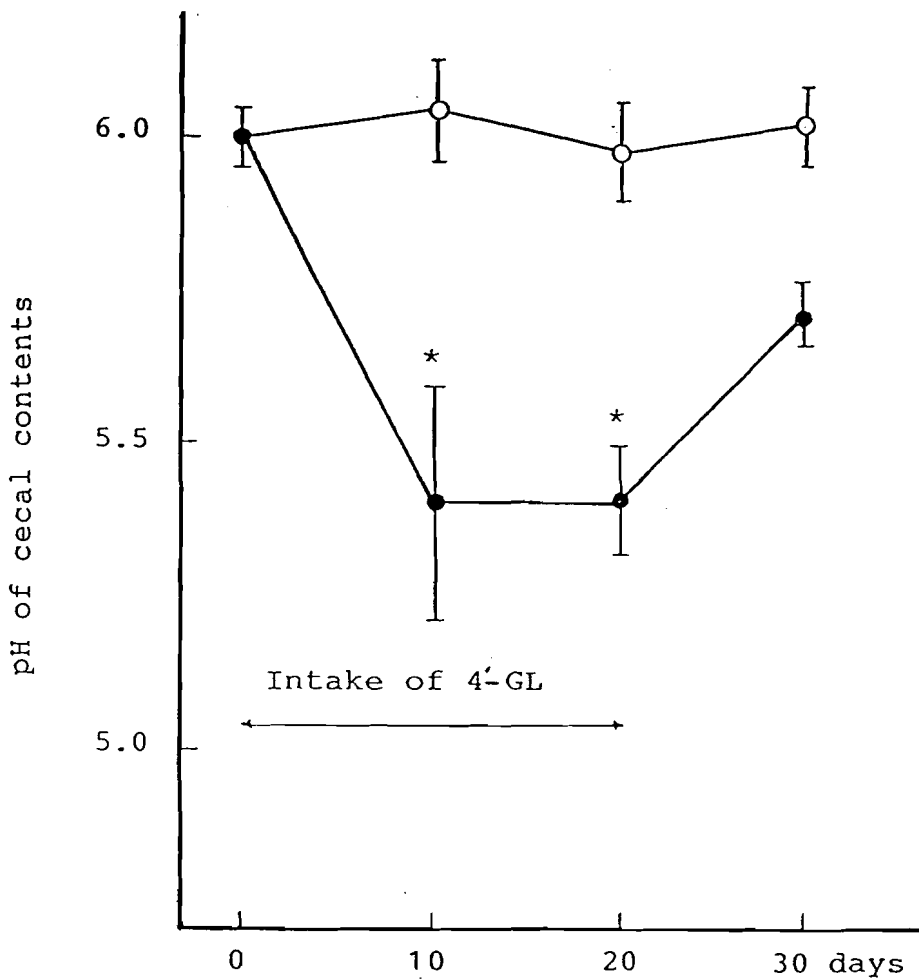


Fig.7-1. Effect of 4'-GL intake on pH of cecal contents in rats.
 Male SD rats (7 week of age) were given experimental diets supplemented with 10% 4'-GL for 20 days.
 Five rats in each group were kept in a cage at room temperature.
 ●: 4'-GL diet group, ○: control diet group.
 *, Significant difference from control group. ($p < 0.01$)

4. ヒトの腸内フローラに及ぼす影響

4-1. 実験方法

4'-GL経口摂取試験

- 1) 4'-GLの摂取スケジュール 健康成人10名
(25~50歳)を対象として行った。被験者は本試験開始3週間前から試験期間中を通じ、薬物の投与や生菌剤、乳製品の摂取を受けていない。試験スケジュールは4'-GL 8gを1日1回コーヒー等飲料に溶かし連続20日間摂取させ、摂取前2回、摂取中10日目、20日目の2回、摂取中止20日後と27日後の2回糞便を採取し、直ちに氷冷して5時間以内に糞便フローラとpHの測定に供した。
- 2) 糞便フローラの測定 Mitsuokaらの方法
(107,108)に従って行った。分離用培地は、Table 7-3に示す3種類の非選択培地と10種類の選択培地を併用した。糞便1gを希釈液(108)9mlに加え、それを 10^{-1} 希釈液とし順次10倍希釈を行い 10^{-1} ~ 10^{-8} 希釈液を調製した。EG、BL寒天には 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 希釈液を、Trypticase soy blood寒天培地には 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 希釈液を、また、BS、ES、NBGT、VS、LBS、Neomycin Nagler、DHL、TATAC、PEES、Potato dextrose寒天培地には、 10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 希釈液の各々0.05mlを滴下し、コンラージ棒で一様に塗抹して嫌気条件下37℃、48時間スチールール法(106)で培養を行った。

Table 7-3. The media and cultural method for comprehensive investigation of intestinal flora.

| Medium | Organisms usually enumerated | Dilutions to be plated | Incubation time (days) |
|---------------------------|------------------------------------|---|--|
| Non-selective media | | | |
| EG agar | Anaerobes |] 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ | 3 |
| BL agar | Anaerobes | | 3 |
| Trypticase soy blood agar | Aerobes | | 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ |
| Selective media | | | |
| BS agar | Bifidobacteria |] 10 ⁻¹ , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁷ | 3 |
| ES agar | Eubacteria | | 3 |
| NBGT agar | Bacteroidaceae | | 3 |
| Neomycin | Lecithinase positive clostridia | | 3 |
| Nagler agar | Veillonellae and peptostreptococci | | |
| VS agar (modified) | Lactobacilli | | |
| LBS agar | Enterobacteriaceae | | |
| DHL agar | Streptococci | | |
| TATAC agar | Staphylococci | | |
| PEES agar | Yeasts and molds | | |
| Potato dextrose agar | | | 2 |

3) 糞便 pH の測定 糞便の pH は pH メーターの電極を直接糞便に差込み測定した。

4 - 2. 実験結果

4'-GL 摂取の腸内フローラに与える影響

in vitro の結果をもとに、ヒトが 4'-GL を摂取した場合の腸内フローラに与える影響について調べた。

健康成人 10 名 (25 ~ 50 歳) に 4'-GL 8g を 1 日 1 回連続 20 日間摂取させ、摂取前 2 回、摂取中 2 回、摂取中止後 2 回糞便を採取して糞便フローラの測定を行った結果を Table 7-4 に示した。

試験期間中を通し、総菌数および Eubacterium、Clostridium-others、Peptostreptococcus、Enterobacteriaceae の菌数および検出率に著しい変動は認められなかった。一方、Bifidobacterium だけが有意 ($P < 0.01$) に増加し、腸内フローラの最優勢菌群となった。すなわち、4'-GL 摂取前糞便 1g あたり $10^{9.8}$ であったのが、摂取 10 日目においてすでに約 2.6 倍の $10^{10.2}$ にまで増加した。さらに摂取中止後は、すみやかに摂取前と同じ菌数にもどることが明らかにされた。

その他の腸内菌の変化として、Bacteroidaceae は、4'-GL 摂取前糞便 1g あたり $10^{10.5}$ あったのが、摂取 20 日目において $10^{9.5}$ に減少した。しかし、個体差が大きく有意差は認められなかった。Lactobacillus と

Table 7-4. The effects of 4'-GL intake on the human fecal microflora.

| Fecal microflora | Before the 4'-GL intake | | During the 4'-GL intake | | After the 4'-GL intake | |
|----------------------------|--|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------|
| | 10 days | 5 days | 10 days | 20 days | 20 days | 27 days |
| Total counts | 10.7±0.2 ^a (10/10) ^b | 10.8±0.2 (10/10) | 10.8±0.2 (10/10) | 10.6±0.3 (10/10) | 10.7±0.3 (10/10) | 10.7±0.2 (10/10) |
| Bacteroidaceae | 10.4±0.2 (10/10) | 10.6±0.2 (10/10) | 10.3±0.4 (10/10) | 9.5±1.2 (10/10) | 10.5±0.3 (10/10) | 10.4±0.2 (10/10) |
| <u>Bifidobacterium</u> | 9.9±0.2 (10/10) | 9.7±0.5 (10/10) | 10.2±0.3 ^{c,d,e,f} (10/10) | 10.2±0.2 ^{c,d,e,f} (10/10) | 9.8±0.3 (10/10) | 9.7±0.4 (10/10) |
| <u>Eubacterium</u> | 10.0±0.3 (10/10) | 9.9±0.3 (10/10) | 9.8±0.5 (10/10) | 9.8±0.4 (10/10) | 10.1±0.4 (10/10) | 9.8±0.4 (10/10) |
| <u>Peptostreptococcus</u> | 9.6±0.5 (7/10) | 9.3±0.5 (6/10) | 9.4±0.4 (7/10) | 8.9±0.6 (7/10) | 9.5±0.3 (6/10) | 9.2±0.5 (7/10) |
| <u>Veillonella</u> | 6.4±0.8 (4/10) | 5.8±2.7 (7/10) | 6.5±1.6 (6/10) | 6.6±1.6 (4/10) | 5.1±2.0 (6/10) | 5.3±2.4 (8/10) |
| <u>Megasphaera</u> | 8.4±0.8 (3/10) | 7.6±2.6 (2/10) | 8.4±0.2 (4/10) | 8.8±0.4 (6/10) | 8.2±0.5 (4/10) | 7.7±0.8 (4/10) |
| <u>Cl.perfringens</u> | | 5.2 (1/10) | 6.3 (1/10) | 5.1 (1/10) | | 4.3 (1/10) |
| <u>Clostridium</u> -others | 9.2±0.6 (10/10) | 9.2±0.6 (9/10) | 9.2±0.6 (7/10) | 9.2±0.4 (7/10) | 9.2±0.4 (10/10) | 8.9±0.8 (8/10) |
| <u>Lactobacillus</u> | 5.7±2.3 (10/10) | 6.3±1.7 (9/10) | 5.6±2.1 (9/10) | 6.7±2.3 (9/10) | 5.1±2.1 (10/10) | 4.9±2.7 (6/10) |
| <u>Enterobacteriaceae</u> | 7.1±0.7 (10/10) | 7.2±1.0 (10/10) | 6.7±1.0 (10/10) | 6.8±0.7 (10/10) | 7.1±1.0 (10/10) | 6.7±1.1 (10/10) |
| <u>Streptococcaceae</u> | 7.5±1.3 (10/10) | 6.7±1.6 (10/10) | 6.7±1.0 (10/10) | 6.9±1.7 (9/10) | 6.7±1.2 (10/10) | 5.2±1.9 (10/10) |
| <u>Micrococcaceae</u> | 3.1±0.7 (8/10) | 3.5±1.1 (5/10) | 4.1±1.6 (5/10) | 3.1±1.0 (3/10) | 4.3±1.7 (6/10) | 4.2±2.0 (5/10) |
| <u>Yeast</u> | 2.9±0.7 (4/10) | 3.6±0.9 (6/10) | 3.5±1.2 (4/10) | 3.2±0.1 (4/10) | 2.8±0.7 (4/10) | 2.8±0.7 (6/10) |

a Bacterial counts expressed as mean±SD of log₁₀ per gram of wet feces.

b Frequency of occurrence expressed as numerator=No. of subjects yielding the organism/denominator=No. of subjects examined.

c Statistically significant at the p<0.01 level when compared with the numbers obtained before 10 days of the 4'-GL intake.

d Statistically significant at the p<0.01 level when compared with the numbers obtained before 5 days of the 4'-GL intake.

e Statistically significant at the p<0.01 level when compared with the numbers obtained after 20 days of the 4'-GL intake.

f Statistically significant at the p<0.01 level when compared with the numbers obtained after 27 days of the 4'-GL intake.

Megasphaeraはどちらも増加の傾向を示した。

4'-GLを摂取したときの個々の被検者別の Bifidobacteriumと Bacteroidaceaeの総菌数に占める菌数の割合の変化をプロットしたのが Fig.7-2 である。ほとんどの被検者において、4'-GL摂取により Bifidobacteriumが顕著に増加し10名中8名までが総菌数における Bifidobacteriumの割合が50%前後まで増加した。残り2名もわずかではあるが増加の傾向が認められた。特に顕著な増加が認められた被検者の1例は、Bifidobacteriumが76%を占めるまで増加した。4'-GL摂取を中止すると、Bifidobacteriumは減少し摂取前と同じ値にもどった。一方、Bacteroidaseaeは4'-GL摂取中2例を除く8例までが減少の傾向を示した。

Fig.7-3 は4'-GL摂取による被検者10名の糞便 pHの変化を示したものである。被検者10名中9名までが4'-GL摂取により pHが低下した。摂取前の被検者の糞便 pHの平均は6.5であったが、4'-GL摂取により6.0に低下した。

4'-GL摂取によって Bifidobacteriumが76%まで増加した被検者の糞便 pHは、4.4まで低下した。摂取中止後は、再び摂取前と同じ値になった。

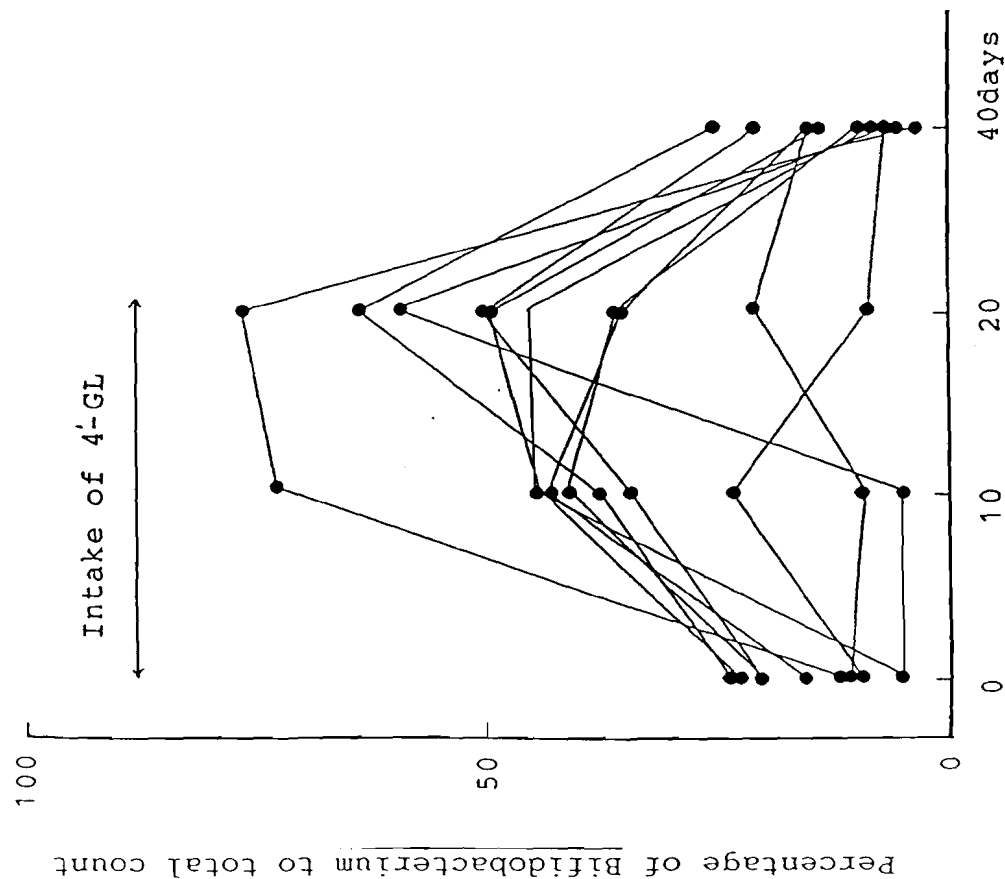
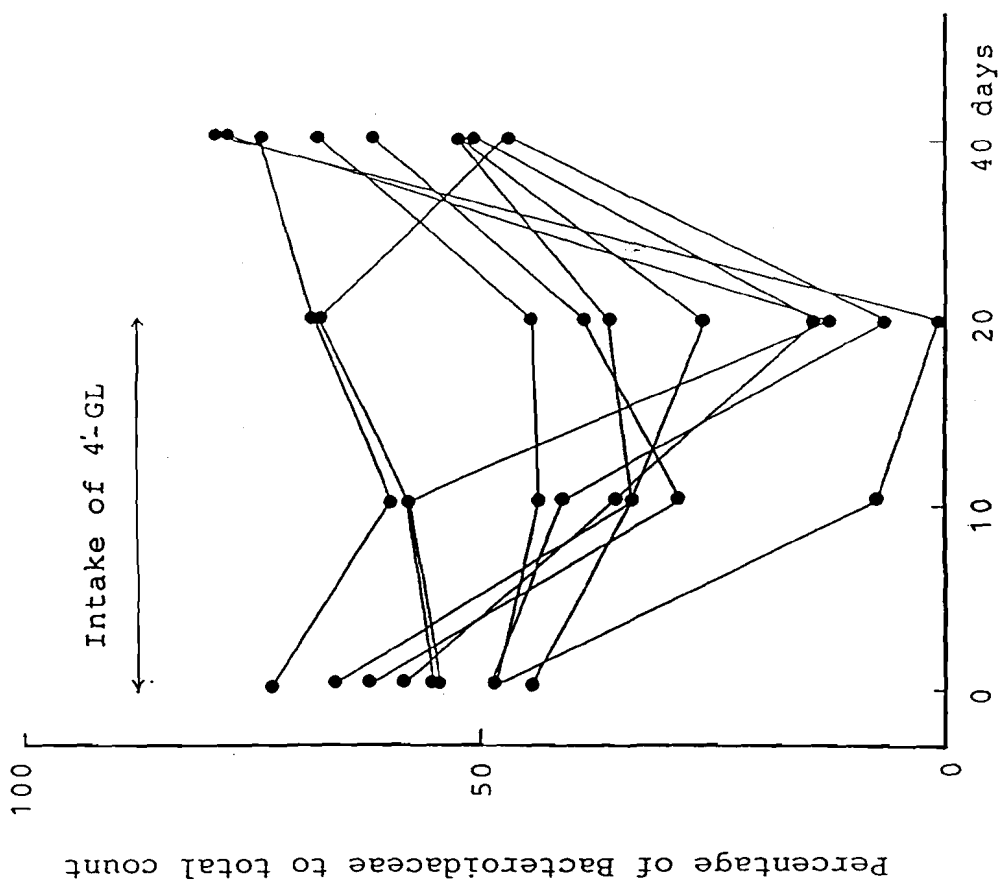


Fig.7-2. Percentage of *Bifidobacterium* and *Bacteroidaceae* to the total count of bacteria during intake of 4'-GL. The volunteers studied consisted of ten healthy adults ranging in age from 25 to 50 years old. Total consumption of 4'-GL was 8g per day. The duration of the intake was 20 days.

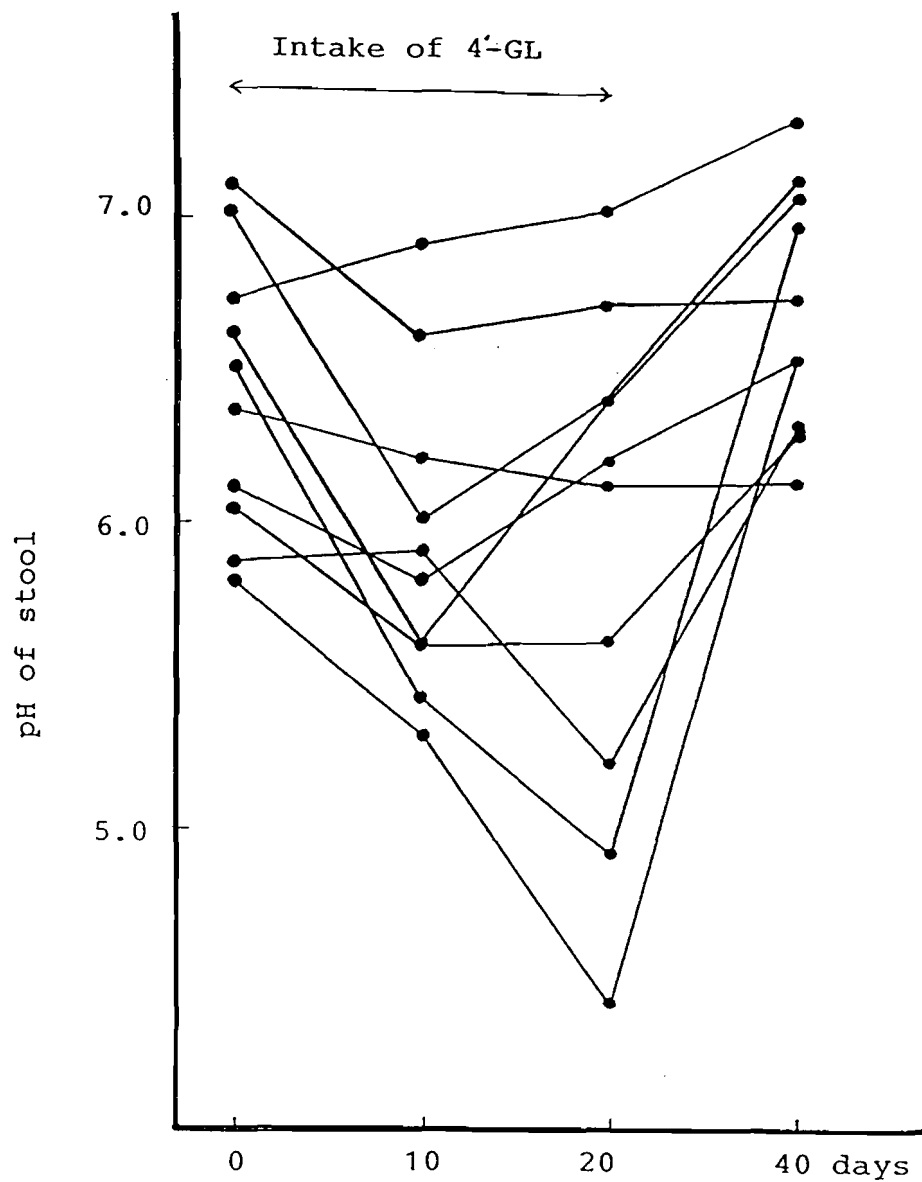


Fig.7-3. Changes of pH of stool during intake of 4'-GL.
 The volunteers studied consisted of ten healthy adults ranging in age from 25 to 50 years old. Total consumption of 4'-GL was 8g per day. The duration of the intake was 20 days.

5. 考察

ヒトの腸内には100種類100兆個の細菌が棲息して腸内フローラを構成し、互いに関係を持ちながら摂取された食物を栄養源として絶えず増殖しては排泄されている。腸内フローラは健康なヒトでは安定しているが、宿主の生活、食べ物、ストレス、疾病などによって変動する(109~111)。

最近、加齢による Bifidobacterium 減少など腸内フローラの変化と健康との関係が明らかになり(92)、種々の Bifidobacterium 増殖促進物質の開発が行われてきている(5,7,8,112~115)。ガラクトオリゴ糖である4'-GLが、Bifidobacterium 増殖のために有効な物質であるかを検討するため、まず最初に Bifidobacterium 5菌種26株を含む腸内代表菌101株を用い、in vitro による各菌の生育試験を行った。また、ラットおよびヒトが4'-GLを摂取した場合の腸内フローラに与える影響について調べた。

in vitro の試験において4'-GLは今回用いたヒト由来の Bifidobacterium すべてによく利用され、その他の菌にはほとんど利用されなかった。これまで Bifidobacterium 増殖物質といわれてきたラクチュロース(116,117)は、Bifidobacterium 属の菌以外に、Clostridium 属や Eubacterium 属、Enterococcus 属など多くの菌に利用され4'-GLと比べ Bifidobacterium 属の

菌に対する選択性が低かった。また、4'-GLはラフィノースやフラクトオリゴ糖(5)と比べても Clostridium 属、Peptostreptococcus 属、Enterococcus 属に利用されない点で優れていた。さらに、ラフィノースやフラクトオリゴ糖を利用できない B.bifidum にもよく利用されたことが大きな特徴であった。しかし、一方で、4'-GLはラクチュロースやラフィノース、フラクトオリゴ糖と同様に B.fragilis や B.distasonis、B.vulgatus 等の菌にもよく利用された。

4'-GLは in vitro における Bifidobacterium の利用が他の糖質に比べ選択性が高いことから、次に4'-GL摂取によるラットの腸内フローラに与える影響について調べた。ラットは Bifidobacterium の腸内フローラに占める割合が非常に少なく1%にも満たない(92)が、今回4'-GL摂取により10日目に6.3%、6.8%、22.9%まで増加した個体が5例中3例に認められた。さらに、Streptococcaceae および Micrococcaceae は4'-GL摂取により総菌数に対する割合が増加する傾向を示す一方、Enterobacteriaceae など好ましくない菌群の減少が認められた。

また、4'-GL摂取中の盲腸内容物のpHの低下は、Bifidobacterium の増加など盲腸内フローラの変動に伴うものと考えられる。

今回の結果から、ラットに4'-GLを摂取させた場合その初期において Bifidobacterium が増加し、その後摂取

を続けると Lactobacillus や Enterobacteriaceae が減少することが明らかになった。これはヒトの腸内菌叢を構成する菌種による in vitro における 4'-GL の資化性試験において、4'-GL は Bifidobacterium によって資化されるが、Lactobacillus や大腸菌などにはほとんど利用されなかった結果と一致している。

ラットによる 4'-GL 摂取試験において Bifidobacterium が増加し Enterobacteriaceae が減少するなど腸内フローラ改善に期待される結果を得たので、ヒトが 4'-GL を摂取した場合の腸内フローラに及ぼす影響について調べた。

ヒトが 4'-GL を摂取した場合試験期間を通じ 4'-GL 摂取中、Bifidobacterium のみが有意 ($P < 0.01$) に増加し腸内最優勢菌となることが明らかになった。一方、Bacteroidaceae は in vitro の資化性試験では Bifidobacterium 同様 4'-GL をよく利用したが、ヒトの腸内では 4'-GL 摂取期間中は逆に減少した。各種オリゴ糖摂取の腸内フローラに及ぼす影響については、Benno ら (112) がラフィノース、Hidaka ら (5) がフラクトオリゴ糖、Tanaka ら (7) がガラクトオリゴ糖 (6'-ガラクトシルラクトース)、Kohmoto ら (8) がイソマルトオリゴ糖、Kashimura ら (113) がパラチノース縮合物、Suzuki ら (115) がラクチュロース摂取の結果を報告しているが、これらのオリゴ糖を摂取した場合も同様な結果が報告されている。4'-GL 摂取により糞便の pH の低下

が認められていることから、4'-GLを Bifidobacterium が利用し、酢酸や乳酸を生成した結果 pH が下がり Bacteroidaceae の生育を抑制したものと考えられる。

以上、4'-GL はヒトが摂取した場合腸内有用菌とされている Bifidobacterium が増加し、Bacteroidaceae など好ましくない菌の生育を抑制するなど腸内フローラ改善に有効なオリゴ糖であることが明らかになった。さらに腸内フローラ改善に伴うコレステロール代謝の改善にも効果が期待されると思われる。

6. 要約

4'-GLのヒト腸内フローラ構成菌種による資化性を調べたところ、4'-GLは Bifidobacterium 属と Bacteroides fragilis group によつて選択的に利用されたが、その他の菌群にはほとんど利用されなかった。さらにラクチュロースと比べ Bifidobacterium 属に対して選択性の高い糖質であつた。

ラット盲腸内 Lactobacillus、Bifidobacterium、Enterobacteriaceaeなどの菌群に及ぼす影響を検索するため、7週齢のSD系雄ラット（体重約250g, 30匹）に4'-GLを10%含む飼料を連続20日間摂取させた。盲腸内の各菌群の総菌数に占める割合の変動を調べた結果、Lactobacillusと Enterobacteriaceaeの減少が認められた。特に Enterobacteriaceaeの減少は著しく、4'-GL摂取10日目の対照群の約10分の1であつた。一方、Bifidobacteriumは4'-GL摂取群においては10日目には増加の傾向が認められた。4'-GL摂取中、盲腸内容物のpHの低下が認められた。

4'-GL摂取のヒト腸内フローラに及ぼす影響を検索したところ、Bifidobacteriumだけが有意 ($P < 0.01$) に増加し、Bacteroidaceaeは減少の傾向を示した。また、4'-GL摂取中、糞便のpHの低下が認められた。

第 8 章 総括

オリゴ糖は食物繊維とならび、新しい機能性を有する食品素材として注目されはじめている。食物繊維は自然界に広く多量に分布しているため古くから摂取され、また、近年食品中から分離されその生理作用が研究されてきた。現在食物繊維の生理作用として、便秘(118)、腸炎(119)、大腸ガン(120)、糖尿病(121)などの改善効果が報告されている。それにより、ポリデキストロースなど低カロリー水溶性食物繊維(122,123)など新しい素材も開発された。

一方、オリゴ糖も植物界、動物界に広く分布していることが知られていたが、微量であるため大量に調製することができずその生理作用は不明な点が多かった。

本研究では、微生物の酵素を利用しガラクトオリゴ糖を大量に生産することを目的に、微生物のスクリーニングを行い Cryptococcus laurentii OKN-4株を得た。Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼは高温下、酸性域でも安定であったため、ガラクトオリゴ糖の工業生産に適した酵素であった。

微生物の β -ガラクトシダーゼをラクトースに反応させガラクトオリゴ糖を生成する研究は数多く行われてきたが、微生物の培養によってラクトースから一種類のガラクトオリゴ糖のみを大量に生成させることは本研究が初めてである。これは、1%の低濃度のラクトース

スからも4'-GLを生成することができる Cryptococcus laurentii OKN-4株のβ-ガラクトシダーゼの特性によるところが大きい。

この特性を利用して、Cryptococcus laurentii OKN-4株をアルギン酸カルシウムに固定化し4'-GLを大量に生産する方法(124,125)を確立した。Cryptococcus laurentii OKN-4株のβ-ガラクトシダーゼは膜画分に強く結合し、菌体自体が天然の固定化担体のようになっている。そのため、高温下でも安定に繰り返し反応が可能になり4'-GL生産を工業化することができた。このように4'-GLの大量生産が可能となり、その生理作用も明らかになってきた。

最初に、4'-GLはヒトが摂取した場合、腸内有用細菌である Bifidobacterium (ビフィズス菌) を増殖させる効果を有することが本研究において明らかになった。このような効果を有するオリゴ糖としてはフラクトオリゴ糖(5)やイソマルトオリゴ糖(8)などが開発されているが、フラクトオリゴ糖は低pHや高温下では不安定であるため、食品素材として用いる場合その利用範囲が限定される。また、イソマルトオリゴ糖は小腸においてその一部が消化吸収されるため、ビフィズス菌増殖の効果を期待するには多量の摂取が必要となる。

ガラクトオリゴ糖である4'-GLは、物性的に非常に安定であるため食品素材としての利用範囲が広く、ビフィズス菌増殖も少量で効果がある。

4'-GLを食品素材として利用する場合、そのエネルギー評価が重要になってくる。本研究において、4'-GLは消化酵素では分解されにくい難消化性の糖質であり、食物繊維と類似した性質を有することが明らかになった。しかし、食物繊維と異なりその大部分がビフィズス菌など腸内細菌によって利用されるため、4'-GLからの代謝産物である有機酸が大腸から吸収され、その一部がエネルギー源となる可能性が残された。現在そのカロリーを約2kcalと考えている。

4'-GLは血清脂質改善(85)、便秘改善効果(53)を有し、また、高血圧抑制作用も期待される。それで、今後新しい食品素材としてますますその利用範囲が広がり、また新しい生理機能も研究されていくと思われる。

最近、糖タンパクや糖脂質など複合糖質が、発生や分化、免疫など生体内で重要な役割を演じていることが明らかになってきている。これら、複合糖質は糖鎖にガラクトース残基を含むため、今後 Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼの転移反応を利用して、新しい複合糖質の開発を進めたいと考えている。

英文要約

Production of galactooligosaccharide by microorganism and its body modulated function

To obtain the galactooligosaccharide producing microorganisms, 1019 strains were isolated from soil by enrichment culture. Some microorganisms, such as bacteria, yeasts, fungi and actinomycetes produced galactooligosaccharides from lactose. A strain identified as Cryptococcus laurentii OKN-4 was found to abundantly produce galactooligosaccharide (GO-1) from lactose. This galactooligosaccharide is proved to be $\text{O-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-O-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-glucopyranose}$ (designated with 4'-GL) by HPLC, GC-MS and $^1\text{H-NMR}$ analyses.

β -Galactosidase from Cryptococcus laurentii OKN-4 was solubilized from cell wall preparations by Zymolyase-20T, and purified by column chromatographies on DEAE-Sephadex A-50, TSKgel Toyo Pearl HW-55S and TSKgel DEAE-5PW. The purified β -galactosidase was homogeneous on polyacrylamide disk gel electrophoresis, and its molecular weight was estimated to be about 200,000 by gel filtration on Toyo Pearl HW-55S and about 100,000 by sodium dodesylsulfate gel electrophoresis. The enzyme showed the optimum pH of 4.3 and stable at pH's between 2.8 and 9.3. The optimum temperature was 60°C, and stable at temperatures below 57.5°C for 10 min incubation. The Michaelis constants were 18.2 and 11.4mM, and the maximum velocities were 76.9 and 5.3 $\mu\text{mol/min/mg}$ protein for $\text{O-nitrophenyl-}\beta\text{-D-galactoside}$ and lactose, respectively. The enzyme was inhibited by Hg^{2+} , Ag^+ , 2-mercaptoethanol, glucose, maltose and maltotriose. The enzyme produced the 4'-GL in the yield of 28.8% from 2.5% lactose solution by trans galactosylation.

Cultural conditions for production of 4'-GL were investigated, and the optimum cultural conditions were as follows ; cultural medium:

lactose 100g, NH₄Cl 2g, yeast extract 2g, Na₂HPO₄·12H₂O 24g, KH₂PO₄ 81g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, FeSO₄·7H₂O 4mg, CaCl₂ 10mg, MnCl₂·4H₂O 1mg and 1 l of water, at 30°C, pH6.0. Under these conditions, the maximum yield of 4'-GL was 47% of the added lactose for 4-day culture.

The digestion of 4'-GL was investigated in vitro by using the artificial gastric juice, human saliva α -amylase, hog pancreas α -amylase and the intestinal mucosa of rat. 4'-GL was not hydrolyzed by these enzymes. Long-term ingestion of 4'-GL did not cause induction of 4'-GL-hydrolyzing enzyme in the small intestine.

Absorption and excretion of 4'-GL in rats were examined using a radioisotope technique. 2.3×10^6 Bq of ¹⁴C-4'-GL was synthesized from 1.1×10^7 Bq of lactose (lactose-U-¹⁴C) by Cryptococcus laurentiiOKN-4. The ¹⁴CO₂ excretion from ¹⁴C-4'-GL and ¹⁴C-lactose was studied after oral administration in conventional rats, antibiotics-treated rats and germfree rats. Respiratory ¹⁴CO₂ excretion from ¹⁴C-4'-GL was slower than those from ¹⁴C-lactose in conventional rats. In germfree rats, ¹⁴CO₂ excretion from ¹⁴C-4'-GL decreased compared with those in conventional rats, and total ¹⁴CO₂ excretion after oral administration during 24 hours was about one third. Accumulation of ¹⁴C to serum, liver and carcass in ¹⁴C-4'-GL oral administration group was lower compared with those of the ¹⁴C-lactose oral administration group. However, excretion of ¹⁴C to feces and urine was higher.

The influence of chronic intake of 4'-GL on body weight gain, organ weights, serum lipids and liver lipids was investigated in rats. The body weight gains of the 5% and 10% 4'-GL diet group were slightly higher compared with that of the control group. However, no significant increase in body weight gain was observed. Food intake and fecal dry weight were significantly increased ($P < 0.05$) by 4'-GL feeding compared with those of the control group. The feeding of 4'-GL diet produced a significant increase ($P < 0.01$) in both wet weights

of cecum and colon. However, no significant increase in the weight of stomach, small intestine, liver and other organs was observed. The effect of 4'-GL on serum and liver lipids level was not observed under these experimental conditions.

Some isolates from human intestine, in particular, Bifidobacterium spp. and the Bacteroides fragilis group were able to utilize 4'-GL. Utilization of 4'-GL by Bifidobacterium spp. was superior to that of lactulose. The ratio of cecal microflora to the total bacteria during 4'-GL intake was studied in rats. Male rats of the Sprague Dawley strain at the age of seven weeks (weighing about 250g) were given experimental diets supplemented with 10% 4'-GL for 20 days. The percentage of Lactobacillus spp. and Enterobacteriaceae were decreased during the 4'-GL intake, whereas the percentage of Bifidobacterium spp was increased by 10 days of the feeding. The pH values of cecal contents during feeding were lower than those of the control group.

The effect of 4'-GL intake on the fecal microflora was studied using healthy human volunteers. A significant increase of Bifidobacterium spp. ($P < 0.01$) was observed during the 4'-GL intake, whereas Bacteroidaceae was decreased during the intake. The fecal pH values during feeding were lower than those before and after the intake.

文献

- 1) 荒井綜一 (1989): 機能性食品、その概念と研究の現状, バイオサイエンスとインダストリー, 47, 291-306.
- 2) 日高秀昌、栄田利章、足立堯、斉藤安弘 (1987): フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発, 日本農芸化学会誌, 61, 915-923.
- 3) 機能性糖質としての甘味料の市場動向, 月刊フードケミカル, 10, 19-42, (1989)
- 4) 細谷憲政、福場博保 : 転移糖と栄養; 新しく開発された糖とその作用, 第一出版, (1984).
- 5) Hidaka,H., Eida.T., Takizawa,T., Tokunaga,T., and Tashiro,Y. (1986): Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora, 5, 37-50.
- 6) Ohtsuka,K., Benno,Y., Endo,K., Ozawa,O., Ueda,H., Uchida,T., and Mitsuoka,T. (1989): Effects of 4'galactosyllactose intake on human fecal microflora. Bifidus (in Japanese), 2, 143-149.
- 7) Tanaka,R., Takayama,H., Morotomi,M., Kuroshima,T., Ueyama,S., Matsumoto,K., Kuroda,A., and Mutai,M. (1983). Effect of administration of TOS and Bifidobacterium breve 4006 on the human fecal flora. Bifidobacteria Microflora, 2, 17-24.
- 8) Kohmoto,T., Fukui,F., Takaku,H., Machida,Y., Arai,M., and Mitsuoka,T.(1988): Effect of isomalto-oligosaccharides on human fecal flora. Bifidobacteria Microflora, 7, 61-69.
- 9) Maki,Y., Ohta,K. Takazoe,I., Matsukubo, Y., Topitsoglou,V., and Frostell,G. (1983): Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspensions of human dental plaque. Caries Res., 17, 335-339.
- 10) Ooshima,T., Izumitani,A., Sobue, S., Okahashi,N., and Hamada,S. (1983): Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. Infect.Immun., 39, 43-49.

- 11) Ikeda, T., Shiota, T., McGhee, J.R., Otake, S., Michalek, S.M., Ochiai, K., Hirasawa, M., and Sugimoto, K. (1978): Virulence of Streptococcus mutans; Comparison of the effects of a coupling sugar and sucrose on certain metabolic activities and cariogenicity. Infect. Immun., 19, 447-480.
- 12) 池田正 : カップリングシュガーの基質としてのう蝕原性 / カップリングシュガーと虫歯, 140-165, 光琳書院, (1981).
- 13) 佐々木堯、小田恒郎、貝沼圭二 (1988): 発酵法による新甘味料エリスリトール生産技術の開発. バイオサイエンスとインダストリー, 46, 3295-3298.
- 14) 小田恒郎、日下部正裕、佐々木堯 (1989): エリスリトールの製法と食品工業への応用. 食品工業, 28, 41-48.
- 15) 古関正意、鶴見膠一: 生化学実験講座4, 糖質の化学(上), 55-56, (社団法人 日本生化学会 編), 東京化学同人 (1976).
- 16) 中村道徳 監修: アミラーゼ, 生物工学へのアプローチ (大西正健, 坂野好章, 谷口肇 編), 学会出版センター, (1986).
- 17) Yamamoto, T.: Handbook of Amylase and Related Enzymes. (The Amylase Research Society of Japan), Pergamon Press, Oxford, New York and Tokyo, (1988).
- 18) Kamini, N.R., and Gunasekaran, P. (1989): Ethanol production from lactose by coculture of Kluyveromyces fragilis and Zymomonas mobilis. J. Ferment. Bioeng., 68, 305-309.
- 19) Yamashita, K., and Kobata, A. (1974): Oligosaccharides of human milk V. Isolation and characterization of a new trisaccharide. 6'-galactosyllactose. Arch. Biochem. Biophys., 161, 164-170.
- 20) Danald, A.S.R., and Feeney, J. (1988): Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-N-neo-di fucohexaose II and 3'-galactosyllactose from this source. Carbohydrate Research, 178, 79-91.
- 21) Wallenfels, K. (1951): Transgalaktosylierung. Naturwissenschaften,

38, 306-307.

- 22) Pazur, J.H. (1953): The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides. J.Biol.Chem., 208, 439-444.
- 23) Roberts, H.R., and Pettinati, J.D. (1957): Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. Agric.Food Chem., 5, 130-134.
- 24) Burvall, A., Asp, N.G., and Dahlqvist, A. (1979): Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with Saccharomyces lactis lactase ; Part 1 Quantitative aspects. Fd.Chem., 4, 243-250.
- 25) Asp, N.G., Burvall, A., Dahlqvist, A., Hallgren, P., and Lundblad, A. (1980): Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with Saccharomyces lactis lactase ; Part 2 Oligosaccharide structures. Fd.Chem., 5, 147-153.
- 26) Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T., and Phaff, H.J. (1964): The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by Sporobolomyces singularis. Can.J.Chem., 42, 1341-1344.
- 27) Ballio, A., and Russi, S. (1960): The structure of galactosyl-lactose, A trisaccharide produced from lactose by Penicillium chrysogenum THOM. Tetrahedron, 9, 125-129.
- 28) Rodrigues, L.M. : The Yeasts a Taxonomic Study, 3rd ed (N.J.W.Kreger-van Rij) pp.845-872, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1984).
- 29) 後藤昭二：微生物の分類と同定〈上〉（長谷川武治 編著），153-196，学会出版センター，東京（1984）。
- 30) Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R., and Kamikubo, T. (1984): Purification and properties of β -galactosidase from Bacillus circlans, Agr.Biol.Chem., 48, 3053-3061.
- 31) Aronson, M. (1952): Transgalactosidation during lactose hydrolysis. Arch.Biochem.Biophys., 39, 370-378.

- 32) Toba, T., and Adachi, S. (1978): Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidases; Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucose. J.Dairy sci., 61, 33-38.
- 33) Kuhn, R. (1958): Les oligosaccharides du lait. Bull.Soc.Chem.Biol., 40, 297-314.
- 34) Montreuil, J. (1960): Les glucides du lait. Bull.Soc.Chem.Biol., 42, 1399-1427.
- 35) Gorin, P.A.J., Haskins, R.H., and Westlake, D.W.S. (1966): A new galactobiosyl glucose formed from lactose by Chaetomium globosum. Can.J.Chem., 44, 2083-2086.
- 36) 須山淳三、戸羽隆宏、足立達：土壌から分離したラクトース資化性真菌による培地中への6'ガラクトシルラクトースの蓄積，日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集，p.614（1985）。
- 37) Conrad, H.E.: Methods in Carbohyd.Chem. (Whistler, R.L., BeMiller, J. N.) Vol. VI, pp.362-363, Academic Press, New York and London (1972).
- 38) 福井作蔵：生物化学実験法 還元糖の定量法，10-12，東京大学出版会，東京（1973）
- 39) Hakomori, S. (1952): A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem. (Tokyo), 55, 205-208.
- 40) Hu, A.S.L., Wolfe, R.G., and Reithel, F.J. (1959): The preparation and purification of β -galactosidase from Escherichia coli, ML308. Arch.Biochem.Biophys., 81, 500-507.
- 41) Craven, G.R., Steer, Jr.E., and Anfinsen, C.B. (1965): Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase of Escherichia coli K12. J.Biol.Chem., 240, 2468-2477.
- 42) Ogushi, S., Yoshimoto, T., and Tsuru, D. (1980): Purification and comparison of two types of β -galactosidase from Aspergillus oryzae. J.Ferment.Technol., 58, 115-122.

- 43) Mahoney, R.R., and Whitake, J.R. (1978): Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis. J. Food Sci., 43, 584-591.
- 44) Borglum, G.B., and Sternberg, M.Z. (1972): Properties of a fungal lactase. J. Food Sci., 37, 619-623.
- 45) Messer, M. (1966): A one step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem., 14, 376-392.
- 46) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Rondall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 47) Ornstein, L. (1964): Disk electrophoresis I. Background and theory Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349.
- 48) Davis, B.J. (1964): Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 49) Uwajima, T., Yagi, H., and Terada, O. (1972): Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from Saccharomyces fragilis. Agr. Biol. Chem., 36, 570-557.
- 50) 中村道徳 (1983): アミラーゼ研究上のいくつかの問題点. 化学と生物, 21, 45-52.
- 51) Pazur, J.H., Tipton, C.L., Budovich, T., and March. (1958): Structural characterization of products of enzymatic disproportion of lactose. J. Am. Chem. Soc., 80, 119-121.
- 52) Toba, T., and Adachi, S. (1977): Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucose. J. Dairy Sci., 61, 33-38.
- 53) Shitara, A. (1988): Effect of 4'-galactosyllactose on constipated old patients and intestinal bacteria. Medical and Biology (in Japanese), 117, 371-373.
- 54) Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. J. Biol. Chem.,

- 195, 19-23.
- 55) Nelson, N. (1944): A photomeric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, 375-380.
- 56) 石館守三 監修: 日本薬局方解説書 (第十一改正), B349-358, 日本公定書協会, 広川書店 (1986)
- 57) Bernt, E., and Bergmeyer, H. U. (1974): Methods of Enzymatic Analysis, 2nd. ed. Vol. 3, (Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press Inc, New York and London) pp. 1180-1184, 1279-1282.
- 58) Dahlqvist, A. (1964): Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem., 7, 18-25.
- 59) Tsuji, K., Horie, Y., Tsuji, E., and Suzuki, S. (1974): Effect of a konjac flour diet on the endogenous cholesterol metabolism in rats. J. Jap. Soc. food and Nutr., 27, 405-411.
- 60) Tsuji, K., Seki, T., and Iwao, H. (1979): Cholesterol lowering effects of taurine and sulfur-containing amino acids in serum and liver of rats. Sulfur-containing Amino Acids (in Japanese), 2, 143-154.
- 61) Bond, J. H. Jr., and Levitt, M. D. (1976): Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. J. Clin. Invest., 57, 1158-1164.
- 62) Jackson, R. A., Roshania, R. D., Hawa, M. I., Sim, B. M., and Disilvio L. (1986): Impact of glucose ingestion on hepatic and peripheral glucose metabolism in man; An analysis based on simultaneous use of the forearm and double isotope techniques. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63, 541-549.
- 63) Massicotte, D., Peronnet, F., Allah, C., Hillaire-Marcel, C., Ledoux, M., and Brisson, G. (1986): Metabolic response to [¹³C] glucose and [¹³C] fructose ingestion during exercise. J. Appl. Physiol., 61, 1180-1184.
- 64) Conrad, H. E., Watts, W. R., Iacono, J. M., Kraybill, H. F., and Friedemann, T. E. (1958): Digestibility of uniformly labeled carbon-

- 14 soybean cellulose in the rats. Science, 127, 1293.
- 65) Johnson,R.B., Peterson,D.A., and Tolbert,B.M. (1960): Cellulose metabolism in the rat. J.Nutr., 72, 353-356.
- 66) Tsuji,K., Ichikawa,T., and Ohtsuka,K. Metabolism of cellulose and inulin in rat. Abstracts of Papers, the Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Nagoya, April, 1988, p.86.
- 67) Inoue,Y., Kumakura,T., and Aikawa,K.(1973): Absorption, distribution, excretion and degradation of lactulose in rats. Yakuzaigaku, 33, 79-86.
- 68) Carulli,N., Salvioli,G.F., and Manenti,F. (1972): Absorption of lactulose in man. Digestion, 6, 139-145.
- 69) Inoue,Y., Moriuchi,S., and Hosoya,N. (1970): Effect of maltitol administration on the development of rats. J.Jap.Food and Nutr., 23, 625-629.
- 70) Oku,T., Inoue,Y., and Hosoya,N. (1971): Absorption and excretion of maltitol-U-¹⁴C in rat. J.Jap.Soc.Nutr.Food Sci., 24, 399-404.
- 71) Rennhard,H.H., and Bianchine,J.R. (1976): Metabolism and caloric utilization of orally administered maltitol-¹⁴C in rat,dog,and man . J.Agric.Food Chem., 24, 287-291.
- 72) Goda,T., and Hosoya,N. (1983): Hydrolysis of palatinose by rat intestinal sucrose-isomaltose complex. J.Jpn.Soc.Nutr.Food Sci., 36, 169-176.
- 73) Oku,T., Tokunaga,T., and Hosoya,N. (1984): Nondigestibility of a new sweetener "Neosugar" in the rat. J.Nutr., 114, 1574-1581.
- 74) Tokunaga,T., Oku,T., and Hosoya,N. (1986): Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rats. J.Nutr.Sci.Vitaminol., 32, 111-121.
- 75) Hosoya,N., Dhorrantina,B., and Hidaka,H. (1988): Utilization of [U-¹⁴C] fructooligosaccharides in man as energy resources. J.Clin.Biochem.Nutr., 5, 67-74.

- 76) Tokunaga,T., Oku,T., and Hosoya,N.(1989): Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharide(Neosugar),in rats. J.Nutr., 119, 553-559.
- 77) Tsuji,Y., Yamada,K., Hosoya,N., and Moriuchi,S. (1986): Digestion and absorption of sugars and sugar substitutes in rat small intestine. J.Nutr.Sci.Vitaminol. ,32, 93-100.
- 78) Nilsson,U., Oste,R., Jagerstad,M., and Birkhed,D. (1988): Cereal fructans, In vitro and in vivo studies on availability in rats and humans. J.Nutr., 118, 1325-1330.
- 79) Ohtsuka,K., Benno,Y., Endo,K., Ozawa,O., Ueda,H., Uchida,T., and Mitsuoka,T.(1990): Effect of 4'galactosyllactose intake on Lactobacillus and Bifidobacterium in cecum of rats. Bifidus (in Japanese), 3, 163-165.
- 80) Johnson,I.T., and Gee,M.Jennifer (1986): Gastrointestinal adaptation in response to soluble non-available polysaccharide in the rats. British Journal of Nutrition, 55, 497-505.
- 81) Oku,T., Konishi,F., and Hosoya,N. (1981): Effect of various unavailable carbohydrates and administrating periods on several physiological function of rats. J.Jpn.Soc.Nutr.Food Sci., 34, 437-443.
- 82) Oku,T., Konishi,F.,and Hosoya,N. (1982): Biochemical and morphological change of gastrointestinal tract by dietary fiber in rats. Nutr.Rep.Int., 26, 247-253.
- 83) Tsuji,K., Oshima,S., Matsuzaki,E., Nakamura,A., Innami,S., Tezuka, T., and Suzuki,S. (1968): Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism(Part 1) Jap.J.Nutr.(in Japanese), 26,113-122.
- 84) Tsuji,E., Tsuji,K., and Suzuki,S. (1975): Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism(Part 6). Jap.J.Nutr.(in Japanese), 33, 273-281.
- 85) Hayashi,M., and Shitara,A. (1989): Effect of 4'-Galactosyl-lactose

- on lipids in human serum. Medicine and Biology, 119, 15-18.
- 86) Elsdon, S.R., and Phillipson, A.T. (1948): Ruminant digestion. Ann.Rev.Biochem., 17, 705-726.
- 87) Huffman, C.F. (1953): Ruminant nutrition. Ann.Rev.Biochem., 22, 399-422.
- 88) Hoverstad, T., Bohmer, T., and Fausa, O. (1982): Absorption of short-chain fatty acids from the human colon measured by the $^{14}\text{CO}_2$ breath test. Scand.J.Gastroenterol, 17, 373-378.
- 89) Wolin, M.J., and Miller, T.L. : Carbohydrate fermentation, ed. Hentage, D.J., Human intestinal microflora in health and disease, p.147-165 (1983).
- 90) Dean, J.A. ed : Lange's handbook of chemistry, 11th edition. McGraw-Hill (1973).
- 91) Black, J.L., Gill, M., Beever, D.E., Thornley, J.H.M., and Oldham, J.D. (1987): Simulation of the metabolism of absorbed energy-yielding nutrients in young sheep :Efficiency of utilization of acetate. J.Nutr., 117, 105-115.
- 92) Mitsuoka, T. (1982): Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria Microflora, 1, 3-24.
- 93) Haenel, H. (1963): Uber die Mikrokologie alter Menschen. Zbl.Bakt. I.Abt.Orig., 188, 219-230.
- 94) Tohyama, K., Tanaka, R., Kobayashi, Y., and Mutai, M. (1982): Relationship between the metabolic regulation of intestinal microflora by feeding Bifidobacterium and host hepatic function. Bifidobacteria Microflora, 1, 45-50.
- 95) Gyorgy, P., Norris, R.K., and Rose, C.S. (1954): Bifidus factor I. A variant of Lactobacillus bifidus requiring a special growth factor. Arch.Biochem.Biophys. 48, 193-201.
- 96) Gyorgy, P., Kuhn, R., and Zilliken, F. (1954): Bifidus factor. II. Its occurrence in milk from different species and in other natural

- products. Arch.Biochem. Biophys., 48, 202-208.
- 97) Gyorgy,P., Hoover,J.R.E., Kuhn,R., and Rose,C.S. (1954): Bifidus factor III.The rate of dialysis. Arch.Biochem.Biophys. 48, 209-213.
- 98) Gauhe,A., Gyorgy,P., Hoover,J.R.E., Kuhn,R., Rose,C.S., Ruelius, H.W., and Zilliken F. (1954): Bifidus factor IV.Preparations obtained from human milk. Arch.Biochem.Biophys. 48, 214-224.
- 99) Gyorgy,P., and Rose,C.S. (1955): Microbiological studies on growth factor for L.bifidus var.pennsylvanicus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 219-223.
- 100)Yoshioka,M., Yoshioka,S., Tamura.Z., and Ohta,K. (1968): Growth responses of Bifidobacterium bifidum to Coenzyme A its precursors and carrot extract. Japan J.Microbiol., 12, 395-402.
- 101)Samejima,K., Yoshioka,M., and Tamura.Z. (1971): Bifidus factors in carrot. I. Purification and some properties. Chem.Pharm.Bull., 19, 166-177.
- 102)Tamura,Z. (1983): Nutriology of Bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora, 2, 3-16.
- 103)Yazawa,K., Imai,K., and Tamura,Z. (1978): Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilization by Bifidobacteria. Chem. Pharm.Bull.(tokyo), 26, 3306-3311.
- 104)Yazawa,K., and Tamura,Z. (1982): Search for sugar sources for selective increase of Bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora, 1, 39-44.
- 105)Holdeman,L.V., E.P.Cato, and W.E.C. Moore. (1977): Anaerobic laboratory manual,4th ed. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University,Blacksburg.
- 106)Parker,C.A. (1955): Anaerobiosis with iron wool. Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 33, 33-37.
- 107)Mitsuoka,T., Ohno,K., Benno,Y., Suzuki,K., and Nanba,K. (1976): Die Faekalflora bei Menschen. Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt. Orig., A234,

219-233.

- 108) Mitsuoka, T., T. Segawa, and S. Yamamoto. (1965): Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig., A195: 455-469.
- 109) Benno, Y., Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, W.R., and Mitsuoka, T. (1986): Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. Micobiol.Immunol., 30, 521-532.
- 110) Benno, Y., Endo, K., Mizutani, T., Namba, Y., Komori, T., and Mitsuoka, T. (1989): Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. Appl.Environ.Microbiol., 55, 1100-1105.
- 111) Beerens, H., Romond, C., and Neut, C. (1980): Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. Am.J.Clin.Nutr., 33, 2434-2439.
- 112) Benno, Y., Endo, K., Shiragami, N., Sayama, K., and Mitsuoka, T. (1987): Effect of raffinose on human fecal microflora. Bifidobacteria Microflora, 6, 59-63.
- 113) Kashimura, J., Nakajima, Y., Benno, Y., Endo, K. and Mitsuoka, T. (1989): Effect of palatinose and its condensate intake on human fecal microflora. Bifidobacteria Microflora, 8, 45-50.
- 114) Sugawara, M., Takeuchi, M., Nakakuki, T., and Mitsuoka, T. (1989): Effect of maltotetraose-rich corn syrup on human intestinal microflora. J.Jpn.Soc.Nutr.Fod Sci.(in Japanese), 42, 123-127.
- 115) Suzuki, K., Endo, Y., Uehara, M., Yamada, H., Goto, S., Imamura, M., and Shiozu, S. (1985): Effect of lactose, lactulose and sorbitol on mineral utilization and intestinal flora. J.Jpn.Soc.Nutr.Food Sci.(in Japanese), 38, 39-42.
- 116) Gedek, B. (1969): Bakteriologische Faecesanalysen bei mit Milchaustauschern ernährten Kalbern. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.,

A209, 244-261.

- 117) Sahota, S.S., Bramley, P.M., and Menzies, I.S. (1982): The fermentation of lactulose by colonic bacteria. J.Gen.Microbiol., 128, 319-325.
- 118) Comming, J.H., and Stephen, A.M. (1980): The role of dietary fibre in the human colon. Can.Med.Assoc.J., 123, 1109-1114.
- 119) Thornton, J.R., Emmet, P.M., and Heaton, K.W. (1979): Diet and crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. Br.Med.J., 2, 762-764.
- 120) Comming, J.H. (1981): Dietary fibre and large bowel cancer. Proc.Nutr.Soc., 40, 7-14.
- 121) Simpson, H.C.R., Lousley, S., Geekie, M., Hockaday, T.D.R., and Mann, J.I. (1981): Lancet, 1, 1-5.
- 122) Figdor, S.K., and Rennhard H.H. (1981): Caloric utilization and disposition of [¹⁴C] polydextrose in the rat. J.Agric.Food Chem. 29, 1181-1189.
- 123) Figdor, S.K., and Bianchine, J.R. (1983): Caloric utilization and disposition of [¹⁴C] polydextrose in man. J.Agric.Food Chem., 31, 389-393.
- 124) Ozawa, O., Ohtsuka, K., and Uchida, T. (1989): Production of 4'-galactosyllactose by intact and immobilized cells of Cryptococcus laurentii OKN-4. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, (in Japanese), 36, 325-328.
- 125) Ozawa, O., Ohtsuka, K., and Uchida, T. (1989): Production of 4'-galactosyllactose by mixed cells of Cryptococcus laurentii OKN-4 and baker's yeast. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, (in Japanese), 36, 898-902.

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました神戸大学農学部新家龍教授、名武昌人教授、藤井聰教授に心からの感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御指導をいただきました東京大学農学部光岡知足教授、国立健康栄養研究所の辻啓介博士、市川富夫博士、理化学研究所辨野義己博士、早稲田大学理工学部宇佐美昭次教授に深く感謝致します。

また、本研究の機会を与えて頂いた日新製糖株式会社取締役内田隆次氏、研究部長兼松正氏、ならびに上田弘嗣氏に厚くお礼申し上げます。さらに、実験に御協力下さった日新製糖株式会社の小沢修氏、大木修一氏、田納晃氏をはじめ研究部の諸氏、ならびに理化学研究所動物細胞システム、国立健康栄養研究所応用食品部の研究員の皆様に深く感謝致します。