



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。



氏名・(本籍)	おお つか こう た ろう 大 塚 耕 太 郎	(富山県)
学位の種類	農 学 博 士	
学位記番号	農博ろ第11号	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当	
学位授与の日付	平成2年9月28日	
学位論文題目	微生物によるガラクトオリゴ糖の生産とその機能性	
審 査 委 員	主査 教授 新 家 龍	
	教授 名 武 昌 人	教授 藤 井 聰
	教授 岩 崎 照 雄	

論 文 内 容 の 要 旨

近年、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、心疾患など患わ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。

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、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かにされ始めた。これら生理活性物質としてはペプチド、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。

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、近年になり整腸作用や抗う蝕性、低カロリーなどの特性を有することが明らかになってきた。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。

オリゴ糖は植物や動物など自然界に広く分布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った。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行われている。また、ガラクトオリゴ糖は、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報告されてきた。

本論文では、ラクトースからのガラクトオリゴ糖生産を目的に、ガラクトース転移作用の強い β -ガラクトシダーゼを有する微生物のスクリーニング、微生物を利用したガラクトオリゴ糖大量生産の検討および、動物試験や臨床試験でその機能の有用性を検討した。

第2章では、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成することを目的に、このような特徴を有する微生物を新たに土壤中よりスクリーニングした。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を著量に生成することを見い出した。

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、第3章では、*Cryptococcus laurentii* OKN-4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構造の決定を行った。その結果このガラクトオリゴ糖は、O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose(4'-ガラクトシルラクトース、4'-GLと略記)の構造を持つガラクトオリゴ糖であることが明かになった。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生成したと考えられた。

第4章では、*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、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。

Cryptococcus laurentii OKN-4株の β -ガラクトシダーゼを、菌体の細胞壁画分から可溶化後、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、反応至適pH、温度はそれぞれpH4.3、60°Cであった。酵素は、Hg²⁺、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章では、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株による4'-GLの発酵生産条件の検討を行った。その結果、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ことが明かになった。これらの諸条件を検討した結果、pH6.0の10%ラクトース培地を用い30°Cで4日間培養したとき、添加したラクトースに対して47%の収率で4'-GLが生成することが可能になった。

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。そこで第6章では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*

in vitro における4'-GLの加水分解ならびに、ラットに¹⁴C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。

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ってほとんど分解されず、6週間ラットに4'-GLを摂取させても4'-GL分解酵素の誘導は認められなかった。

¹⁴Cでラベルした4'-GLを通常ラット、抗生物質投与ラット、無菌ラットにそれぞれ経口投与しその代謝と排泄を調べたところ、呼気中に排出される¹⁴CO₂の経時変化と総量の結果や、血清、肝臓、カーカス中への¹⁴Cの分布並びに糞や尿への¹⁴C排泄の結果から、¹⁴C-4'-GLの代謝には腸内細菌が大きく関与していることが示唆された。

また、ラットが4'-GLを摂取した場合の成長や生体に及ぼす影響について検討を行った結果、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、糞量が4'-GL群において有意に増加し、盲腸、結腸重量や内容物量も有意に増加した。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。

これらの結果から、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、エネルギー源として利用され難い性質を有することが明らかになった。

ガラクトオリゴ糖はヒトが摂取した場合、整腸作用やビフィズス菌の増殖作用が期待される。そこで第7章では、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。

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 の菌によっ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。4'-GL摂取によるラット盲腸内フローラに及ぼす影響を検索した結果、*Lactobacillus* と *Enterobacteriaceae* の減少が認められた。一方 *Bifidobacterium* は4'-GL摂取群において増加の傾向が認められた。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、ヒトにおいて有用腸内細菌とされる *Bifidobacterium* だけが有意に増加し、増加の好ましくない *Bacteroidaceae* は減少の傾向を示した。このように4'-GLは腸内フローラ改善効果を有することから、血清脂質改善効果、便秘改善効果、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。

論文審査の結果の要旨

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、近年になり整腸作用や抗うつ性、低カロリーなどの特性を有することが明らかになってきた。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。

本論文の第1章では、最近の新しい機能性を有する食品素材の開発動向を紹介し、これまでのガラクトオリゴ糖研究の流れと、ラクトースからのガラクトオリゴ糖生産の意義と目的について述べている。

第2章では、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成することを目的に、このような特徴を有する微生物を新たに土壌中よりスクリーニングした。土壌中より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を著量に生成することを見出した。*Cryptococcus laurentii* によるガラクトオリゴ糖の生成は本研究が初めてである。

第3章では、*Cryptococcus laurentii* OKN-4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 $^1\text{H-NMR}$ などの機器分析によりその構造決定を行った。その結果このガラクトオリゴ糖は、 $0\text{-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-0-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-glucopyranose}$ (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であ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生成したものと推論している。

第4章では、*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、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。*Cryptococcus laurentii* OKN-4株の β -ガラクトシダーゼを、菌体の細胞壁画分から可溶化後、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。酵素の分子量をベル濾過法、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、反応至適pH、温度はそれぞれpH4.3、60°C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することなどを明らかにしている。

第5章では、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株による4'-GLの発酵生産条件の検討を行った。その結果、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ことが明らかになった。これらの諸条件を検討した結果、pH6.0の10%ラクトース培地を用いて30°Cで4日間培養したとき、添加したラクトースに対して47%の収率で4'-GLが生成することが可能になった。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。

第6章では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。まず、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ってほとんど分解されず、6週間ラットに4'-GLを摂取させても4'-GL分解酵素の誘導は認められなかった。

¹⁴Cでラベルした4'-GLを通常ラット、抗生物質投与ラット、無菌ラットにそれぞれ経口投与しその代謝と排泄を調べたところ、呼気中に排出される¹⁴CO₂の経時変化と総量の結果や、血清、肝臓、カーカス中への¹⁴Cの分布並びに糞や尿への¹⁴C排泄の結果から、¹⁴C-4'-GLの代謝には腸内細菌が大きく関与していることが示唆された。また、ラットが4'-GLを摂取した場合の成長や生体に及ぼす影響について検討を行った結果、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、糞量が4'-GL群において有意に増加し、盲腸、結腸重量や内容物量も有意に増加した。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章では、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。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 の菌によっ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。4'-GL摂取によるラット盲腸内フローラに及ぼす影響を検索した結果、*Lactobacillus* と *Enterobacteriaceae* の減少が認められた。一方 *Bifidobacterium* は4'-GL摂取群において増加の傾向が認められた。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、ヒトにおいて有用腸内細菌とされる *Bifidobacterium* だけが有意に増加し、増加の好ましくない *Bacteroidaceae* は減少の傾向を示した。このように4'-GLは腸内フローラ改善効果を有することから、血清脂質改善効果、便秘改善効果、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。

以上のように、本研究は、微生物の生産するガラクトオリゴ糖とその機能性について貴重な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者 大塚耕太郎は農学博士の学位を得る資格があると認める。