

学 位 論 文 題 名

糸状菌 β -グルコシダーゼの縮合・糖転移反応を用いた
苦味 β -グルコオリゴ糖の生産に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、食品素材としての糖質には、期待される機能として栄養学的機能（第一次機能）、物理化学的機能（第二次機能）に加え、生体調節機能としての第三次機能が求められるようになってきた。この第三次機能を発揮する糖質として様々なオリゴ糖が開発され、市販されている。これらの糖質の多くは、糖質関連酵素の糖転移反応を利用して製造されており、1970年代より盛んに基礎および応用研究がなされてきた。

本研究で、三次機能に加え、これまでの糖質の二次機能に新たなカテゴリーを与える糖質を開発することを目的とし、 β -glucosidaseに着目して新規なオリゴ糖の製造について検討を行った。

1. *Aspergillus niger*起源の β -glucosidase市販標品から、比較的簡便な三ステップのカラムクロマトグラフィーを順次行うことにより β -glucosidaseを高度に精製し、その酵素化学的諸性質について検討を加えた。本 β -glucosidaseの示す反応至適温度、温度安定性、反応至適pH、pH安定性は、それぞれ65℃、60℃、pH4.5、pH3.1~8.5であり、工業的規模で用いる酵素としては十分利用可能な性質を有していた。また、これまで多くの β -glucosidaseで報告されてきた β -galactosidase活性を併有するという結果は得られず、本 β -glucosidaseは基質の非還元性末端グルコースのC-4位水酸基の立体配置を厳密に認識していることが示唆された。他の様々な起源の β -glucosidaseにおいて β -glucosidase活性と β -galactosidase活性を併有するのか否かについては、高度に純化された酵素を用いて基質特異性の解析や活性解離基近傍の構造、基質と酵素との結合状態などの解析が必要であることを指摘した。

2. β -glucosidaseは、縮合・糖転移反応をも触媒することが知られているが、本 β -glucosidaseについても縮合・糖転移反応についての解析を行った。本 β -glucosidaseは縮合反応の際には、水解反応の反応生成糖である β -グルコースのみを基質として利用することが確認された。また、糖転移反応においては β -グルコ二糖類（ソホロース、ラミナリビオース、セロビオース、ゲンチオビオース）を基質とし、これらの二糖類の非還元性末端グルコースのC-6位に β -1, 6-グルコシド結合でグルコース残基が結合したオリゴ糖が主転移反応生成糖であることを確認した。これは、C-6位が一級アルコールでピラノ

ース環から離れているために、糖転移反応が行われやすいこと、C-6位にグルコース残基が結合したオリゴ糖の水解速度が速くないことなどの条件が重なったためであると推定される。縮合反応と糖転移反応を用いることにより、高濃度グルコースからオリゴ糖の酵素合成を行うことが可能となり、最終的に54%のオリゴ糖を含有する反応液を得ることができた。この結果から、本 β -glucosidase の縮合・糖転移反応を用いることにより、オリゴ糖の工業的生産の可能性が開けた。

3. 以上の結果をもとに高濃度グルコースを基質として、縮合・糖転移反応を利用した β -グルコオリゴ糖含有シラップの工業的な製造条件について検討した。その結果、グルコース濃度65%(W/W)、65℃、グルコース1gあたり1.5 unitsの酵素量という、これまでの澱粉糖やオリゴ糖の製造条件とはきわめて異なる条件を用いることにより、約45%のオリゴ糖を含有する β -グルコオリゴ糖含有シラップの工業的な製造法を確立した。さらにカラムクロマト分画とスプレードライヤーによる高純度化、粉末化を行うことにより約80%のオリゴ糖を含有する β -グルコオリゴ糖含有シラップ・粉末の製造法も確立した。

4. 従来、ゲンチオオリゴ糖をはじめとする β -グルコオリゴ糖について、食品用途として用いられた例はほとんどなく、その諸特性も明らかにされていない。得られた β -グルコオリゴ糖含有のシラップの諸特性について検討し、これらのシラップがゲンチオオリゴ糖に起因するまろやかな苦味を呈すること、きわめて高い吸・保湿性を有することを明らかにした。これらの特性は食品の加工上、苦味の付与や呈味改善、食品の日持ち向上などの効果が期待できる。また、粘度特性、浸透圧、水分活性などの諸特性において、ショ糖に比較的近い特性を示すので、食品素材として用いる際にも扱いやすいものと推測された。

5. 生体調節機能としての第三次機能、特に β -グルコオリゴ糖のヒト腸内細菌叢に与える影響について検討した結果、 β -グルコオリゴ糖は *in vitro* において *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* の増殖効果が認められ、さらに *in vivo* においても4g/日の摂取で *Bifidobacteria* の占有率の増加が認められた。このことは、 β -グルコオリゴ糖がビフィズス菌増殖効果を有するオリゴ糖として有効であることを示している。また、近年ではペットの餌にも同様の効果が期待されている。これは、ペットを室内で飼育する飼い主が増えたことにより、ペットの糞便の臭いの改善が期待されていることや、ペットがヒトと同様な食生活をするようになったことで、肥満などのヒトで言われる生活習慣病にかかる例が増加したためであると言われている。一般にイヌやネコの腸内細菌叢では、乳酸菌として *Bifidobacterium* はほとんど検出されず、*Lactobacillus* が優勢菌である。これまでに開発されてきたビフィズス菌増殖活性を有するオリゴ糖の多くは、*Bifidobacterium* における資化性は高いが、*Lactobacillus* においてはほとんど資化されない。 β -グルコオリゴ糖では *Lactobacillus* における資化性も高いので、ヒトの食品のみならずペットの餌などの用途にも利用可能であると考えられた。

6. 以上のように、微生物起源の β -glucosidase を高濃度のグルコース溶液に作用させ

て、縮合・糖転移反応により β -グルコオリゴ糖含有シラップの工業的な製造が可能となった。この β -グルコオリゴ糖含有シラップは特有の苦味を有しているので、苦味の付与を含めた呈味改善に利用されているが、さらに、苦味を感じない程度の添加量で野菜などのエグ味除去などの効果を有することなども明らかになっているが、このメカニズムは不明である。今後さらに新たな β -グルコオリゴ糖の機能性の探求、食品用途への利用の拡大・普及が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 本 間 守
副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

糸状菌 β -グルコシダーゼの縮合・糖転移反応を用いた 苦味 β -グルコオリゴ糖の生産に関する研究

本論文は、和文129頁、図70、表19、7章からなり、他に参考論文8篇が付されている。

近年、食品素材としての糖質には、期待される機能として栄養学的機能（第一次機能）、物理化学的機能（第二次機能）に加え、生体調節機能としての第三次機能が求められるようになってきている。この第三次機能を発揮する糖質として様々なオリゴ糖が開発され、市販されている。これらの糖質の多くは、糖質加水分解あるいは合成酵素の糖転移反応を利用して製造されており、1970年代より活発に基礎的および応用的研究がなされてきた。

本研究は、糖質の第三次機能に加え、その第二次機能に新たなカテゴリーを与える糖質を開発することを意図して、新規なオリゴ糖の製造について検討を行ったものであり、研究の結果は、以下のように要約される。

1. *Aspergillus niger* β -glucosidaseの市販標品から、 β -glucosidaseを比較的簡便な三段階のカラムクロマトグラフィー(DEAE-Toyopearl, Butyl-Toyopearl, Toyopearl-HW)を行うことにより均一なタンパク質にまで精製し(収量82%)、その酵素化学的諸性質について検討した。精製酵素の示す加水分解反応における温度安定性(60℃まで)、反応至適pH(pH4.5)、pH安定性(pH3.1~8.5)は、工業的規模で用いられる酵素としては十分利用可能な性質を有していることが判明した。また、本酵素にはこれまで多くの β -glucosidaseで報告されている β -galactosidase活性は認められず、基質の非還元性末端グルコースのC-4位水酸基の立体配置を厳密に認識していることが示唆された。

2. β -glucosidaseは、縮合反応(水解の逆反応)および糖転移反応を触媒することが知られているが、本酵素についても縮合・糖転移反応についての解析を行った。その結果、縮合反応の際には、水解反応の反応生成糖である β -グルコースのみを基質として利

用することが確認された。また、糖転移反応において各種 β -グルコ二糖類（ソホロース、ラミナリピオース、セロピオース、ゲンチオピオース）を基質とした場合、これらの非還元性末端グルコースC-6位にグルコース残基が転移され、 β -1, 6-グルコシド結合をもつオリゴ糖が主反応生成糖（三糖類）であることが明らかとなった。さらに、縮合反応と糖転移反応を用いることにより、高濃度グルコースからオリゴ糖の酵素合成を行うことにより、最終的にゲンチオオリゴ糖（ β -1, 6-グルコシド結合）を主成分とする54%のオリゴ糖を含有する反応液を得た。

3. 以上の結果をもとに、高濃度グルコース（65%, w/w）を基質として、縮合・糖転移反応を利用した β -グルコオリゴ糖含有シラップの工業的な製造条件について検討し、約45%のオリゴ糖を含有する β -グルコオリゴ糖含有シラップおよび粉末の工業的な製造法を確立した。さらにカラムクロマト分画とスプレードライヤーによる高純度化、粉末化を行うことにより約80%の β -グルコオリゴ糖を含有するシラップおよび粉末の製造法を確立した。

4. 従来、ゲンチオオリゴ糖をはじめとする β -グルコオリゴ糖について、食品用途として用いられた例はほとんどなく、その諸性質も明らかにされていない。得られた β -グルコオリゴ糖含有シラップの諸特性について検討し、これらのシラップがゲンチオオリゴ糖に起因するまろやかな苦味を呈すること、非常に高い吸・保湿性を有することを明らかにした。これらの特性は食品の加工上、苦味の付与や呈味改善、食品の日持ち向上などの効果が期待できることを示した。また、粘度特性、浸透圧、水分活性などの諸特性において、ショ糖に比較的近い特性をもつことを明らかにした。

5. 生体調節機能としての第三次機能、特に β -グルコオリゴ糖のヒト腸内細菌叢に与える影響について検討した。その結果、 β -グルコオリゴ糖は *in vitro* において *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* の増殖効果が認められ、さらに *in vivo* においても 4 g/日の摂取で *Bifidobacteria* の占有率の増加が認められた。

以上のように、本研究は微生物起源 β -glucosidase の縮合・糖転移反応により β -グルコオリゴ糖の工業的製造を可能とし、特有の苦味を呈する β -グルコオリゴ糖を食品の新しい素材として利用への途を開いた。その成果は、学術的のみならず産業上の応用面においても寄与するところ大きいと評価される。

よって審査員一同は、海野剛裕が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。