

宮 崎 大 学 大 学 院  
博 士 学 位 論 文

糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産

2018 年 9 月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科  
生物機能応用科学専攻

田 代 佳 也

## 目次

第 1 章 序論 .....	1
第 1 節 酵素の産業利用 .....	1
第 2 節 機能性オリゴ糖 .....	6
第 3 節 フラクトオリゴ糖 .....	19
第 4 節 ゲンチオオリゴ糖 .....	23
第 5 節 本研究の目的と構成 .....	26
引用文献 .....	28
第 2 章 <i>Penicillium citrinum</i> 由来の酵素による機能性イヌリン型オリ ゴ糖の生産 .....	32
第 1 節 緒言 .....	32
第 2 節 実験方法 .....	33
2.1 培養と酵素調製 .....	33
2.2 酵素活性測定 .....	33
2.3 酵素反応 .....	34
第 3 節 結果 .....	34
3.1 反応条件 .....	34
3.2 酵素反応を用いたフラクトオリゴ糖生産 .....	40
第 4 節 考察 .....	42
引用文献 .....	44
第 3 章 水熱処理 <i>Aureobasidium pullulans</i> 由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンから のゲンチオビースの生産 .....	47
第 1 節 緒言 .....	47
第 2 節 実験方法 .....	48
2.1 水熱処理 <i>A. pullulans</i> 由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの調製 .....	48

2.2	酵素加水分解 .....	48
2.3	糖測定 .....	49
第3節	結果 .....	49
3.1	各反応 pH におけるゲンチオビオース生産 .....	49
3.2	各酵素濃度におけるゲンチオビオース生産 .....	53
3.3	各基質濃度におけるゲンチオビオース生産 .....	56
3.4	異なる由来の $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの酵素加水分解 .....	59
3.5	酵素反応による生産物の HPLC 分析 .....	61
第4節	考察 .....	63
	引用文献 .....	65
第4章	総括 .....	67
謝	辞 .....	71

## 第 1 章 序論

### 第 1 節 酵素の産業利用

酵素は、酵素と認知される前から古代の人々の知恵として使用されてきた。代表的なものは酒、いわゆるアルコール発酵である。ヨーロッパで古くから作られているチーズ、日本の伝統的な食品の味噌も酵素を利用して作られている。酵素の存在を認知し、微生物の培養から酵素の生産を始めて実用化したのは、高峰譲吉である。日本で酒や味噌の醸造に利用されてきた黄コウジ菌 *Aspergillus oryzae* の個体培養法によりジアスターゼ(アミラーゼ)を単離し、1894年にその製法を特許出願した。本酵素はタカジアスターゼと命名され、今日まで消化薬として利用されている[1]。

現在、酵素の利用は、食品、洗剤、繊維、医薬品、バイオエタノールなど幅広く行われている。産業用酵素として利用されている例を表 1-1 にまとめる[2]。糖質関連酵素は、澱粉の糖化や液化、異性化糖の製造、様々なオリゴ糖、配糖体の製造に用いられている。しかし、自然界に存在する酵素そのものでは、工業的生産に適さないこともあり、日々、安全性を確保した上、酵素の性能向上の研究が行われている。代表的な酵素  $\alpha$ -アミラーゼは、105℃に耐え且つ pH 5.5 以下でも活性を保つものが開発されている[3]。その他にも、糖質関連酵素は、繊維業で生地の手抜きや柔軟性向上、エネルギー業でバイオエタノール生産等にも用いられている。タンパク質関連酵素は、食品では食肉加工や調味料の製造に使用されている。また、タンパク質を分解できることから、脂質関連酵素と組み合わせて洗剤としても利用されている。医療の世界でも診断薬、検査薬として

酸化還元酵素が利用されており、酵素自体が医薬品として医療に使用されるものもある[4]。このように、酵素は食品だけにとどまらず、広く用いられている。

表 1-1 主な産業用酵素

分類	例
糖質関連酵素	α-アミラーゼ、β-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ、ラクターゼ、グルコースイソメラーゼ、β-ガラクトシダーゼなど
タンパク質関連酵素	微生物由来プロテアーゼ、パパイン、トリプシン、レンネット、トランスグルタミナーゼなど
脂質分解酵素	リパーゼ、ホスホリパーゼなど
核酸分解酵素	エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなど
酸化還元酵素	ペルオキシターゼ、カタラーゼ、ラッカーゼ、グルコースオキシターゼなど
その他	ペニシリンアミダーゼ、シアリターゼ、アルカリホスファターゼなど

糖質に関する酵素の利用は、麦芽水飴や酵素糖化水飴の製造に使用されたのを始めとし、 $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼによるブドウ糖の工業的生産（1959年）、グルコースイソメラーゼによる異性化液糖の工業的生産（1965年）が、いずれも世界に先駆けて開始された。その後、シクロデキストリン、イソマルトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖など種々の転移酵素を用いる製造も順次始まっていった。酵素を用いて製造される主な糖類を表 1-2 に示す[5]。酵素は、一般の化学触媒と異なり、比較的温和な条件において、極めて高い活性を示すことができる。また、基質特異性により、高い選択性も合わせ持っており、工業的に生産することに適している。現在も種々の酵素が研究されており、さらに酵素を利用した工業的生産は糖類、食品のみならず、幅広い分野で拡大していくであろう。

表 1-2 食品用酵素を用いて製造される主な糖類

酵素作用	原料	生成糖	使用酵素
加水分解	液化澱粉	水飴 マルトース マルトオリゴ糖 グルコース	$\beta$ -アミラーゼ 枝切り酵素、 $\beta$ -アミラーゼ マルトオリゴ糖生成アミラーゼ 枝切り酵素、グルコアミラーゼ
	キシラン セルロース	キシロオリゴ糖 セロオリゴ糖	$\beta$ -キシラナーゼ セルラーゼ
異性化	グルコース ラクトース フラクトース	異性化糖液 ラクチュロース ブシコース	グルコースイソメラーゼ アルカリ異性化(非酵素反応) アルカリ異性化(非酵素反応)
分子間転移	液化澱粉	イソマルトオリゴ糖	$\beta$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ
	液化澱粉	ニグロオリゴ糖	$\beta$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ
	スクロース	フラクトオリゴ糖	$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ
	スクロース+ラクトース	ラクトスクロース	$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ
	ラクトース ラクトース+液化澱粉	ガラクトオリゴ糖 カップリングシュガー (グリコシルスクロース)	$\beta$ -ガラクトシダーゼ CGTase*
分子内転移	液化澱粉 スクロース	シクロデキストリン バラチノース	CGTase* スクロースグルコシルムターゼ
分子内転移 ⇒加水分解	液化澱粉	トレハロース	マルトオリゴシルトレハロース生成 酵素 ⇒トレハロース遊離酵素
縮合	グルコース シクロデキストリン+マルトース	ゲンチオオリゴ糖 分岐シクロデキストリン	$\beta$ -グルコシダーゼ プルラナーゼ

\*CGTase：シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ

## 第2節 機能性オリゴ糖

糖とは、ポリヒドロキシアルデヒドおよびポリヒドロキシケトン  
を最小単位とし、それらが単体または重合した物質の総称である。  
糖類は、糖類の最小構成単位である単糖、単糖が 2-10 程度繋がっ  
たオリゴ糖(少糖)、多数の単糖が繋がった多糖の大きく 3 つの区分  
に大別される。

単糖は、一般的に分子式  $C_n(H_2O)_y$  ( $n = 3$  以上)で表され、炭素数、  
立体的な構造異性体によって多数の種類が存在する(図 1-1,1-2)。ま  
た、ヒドロキシアセトンを除く、全ての糖は 1 個以上の不斉炭素を  
持ち、鏡像異性体を持つ。加えて、環状構造をとることによって旋  
光性が異なる  $\alpha$  型と  $\beta$  型の二種類の異性体に分けられる。旋光性の  
異性体  $\alpha$  および  $\beta$  型は、水中ではどちらか一方のみが存在するの  
ではなく、糖種、pH、温度などの影響を受け、それぞれの割合で平衡  
状態として存在する [6]。

オリゴ糖(少糖)は、加水分解で得られる単糖の数によって分けら  
れ、とりわけ構成単糖の数が少ないものは、二糖、三糖、四糖とも  
呼ばれる。単糖の種類もさることながら、オリゴ糖は同組成であっ  
ても、結合位置によっても物性・性質が変化し、非常に数多くの種  
が存在する。代表的なオリゴ糖を表 1-3 にまとめる。私たちに馴染  
み深い砂糖(スクロース)もオリゴ糖または二糖に分類される糖の 1  
つである。

多糖類は、構成糖 1 つ 1 つの違いで区分けするのは困難であり、  
主たる構成糖と構造・分岐などによる構造で命名されている(表 1-4)。  
アミロースとアミロペクチンを例にあげると、両者ともグルコース  
が多数結合した多糖であるが、アミロースは  $\alpha$ 1-4 結合のみからなる

直鎖分子に対し、アミロペクチンは主鎖の  $\alpha$ 1-4 結合鎖に加え、 $\alpha$ 1-6 結合の分岐を持つ(図 1-3)。分岐だけが異なるだけでなく、アミロペクチンの長鎖分子は、アミロースの重合度とは異なる [7]。

糖類は私たち生物の生命活動に必要な物質の 1 つである。オリゴ糖、多糖類は、有用性の高い機能を有することから、数多くの報告がなされている [8-10]。中でも比較的低分子のオリゴ糖は、私たちの健康維持に効果的な作用をもたらすことから、機能性オリゴ糖としてすでに食品として多く使用されている [11]。

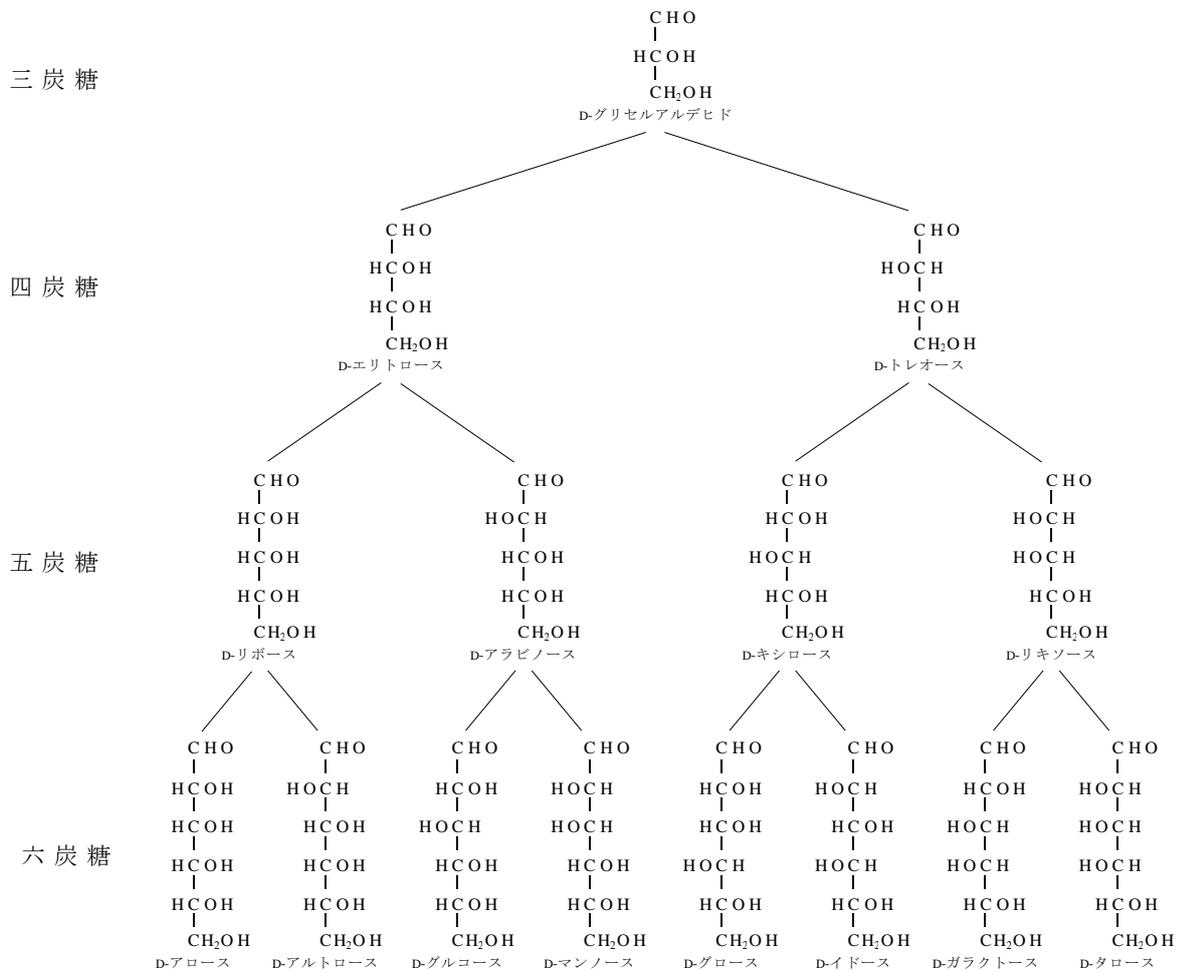


図 1-1 アルドースの構造

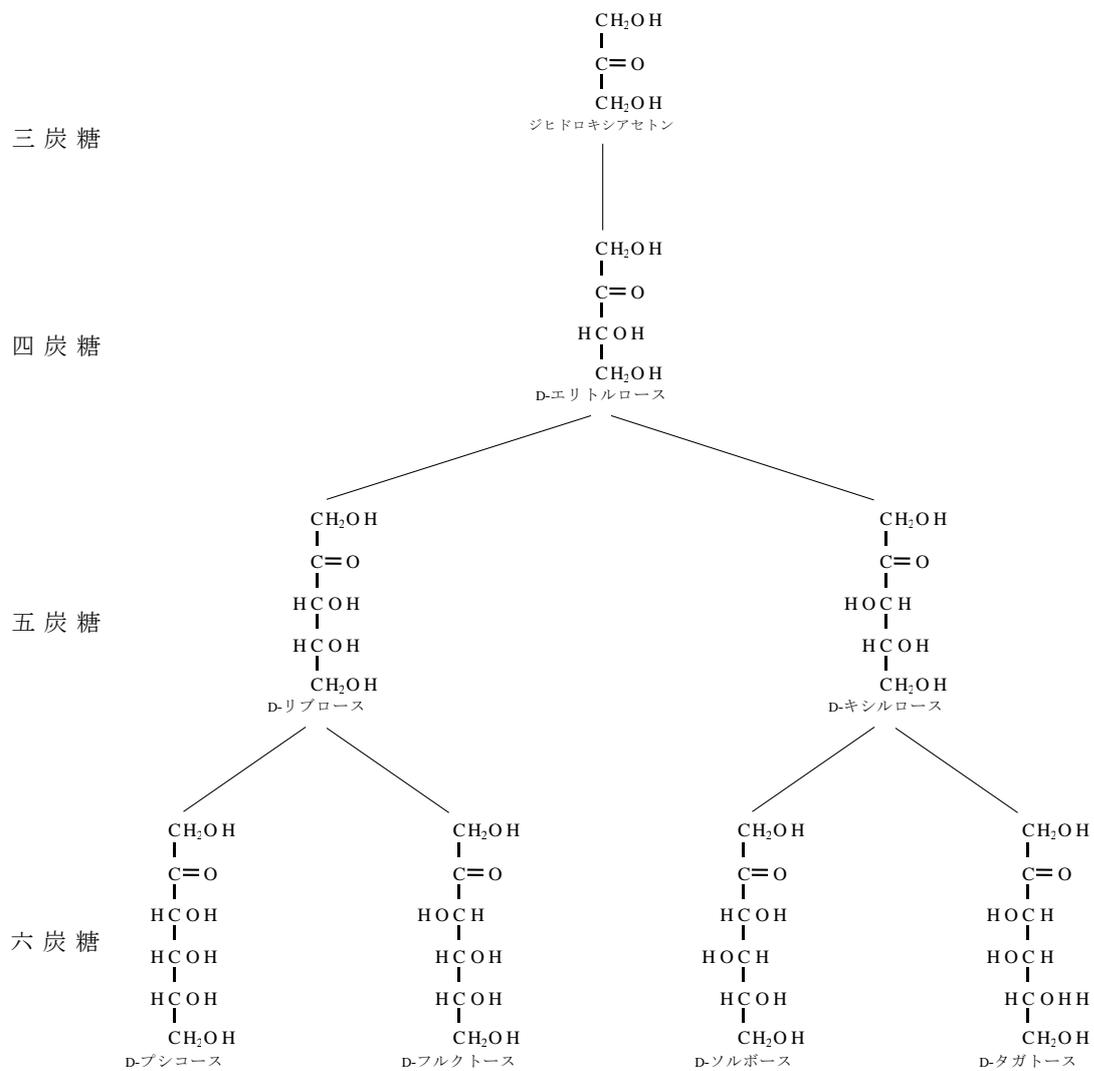


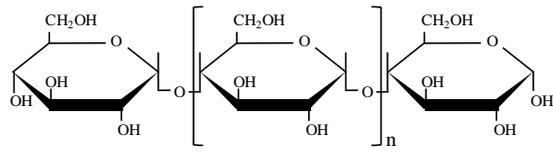
図 1-2 ケトースの構造

表 1-3 代表的なオリゴ糖

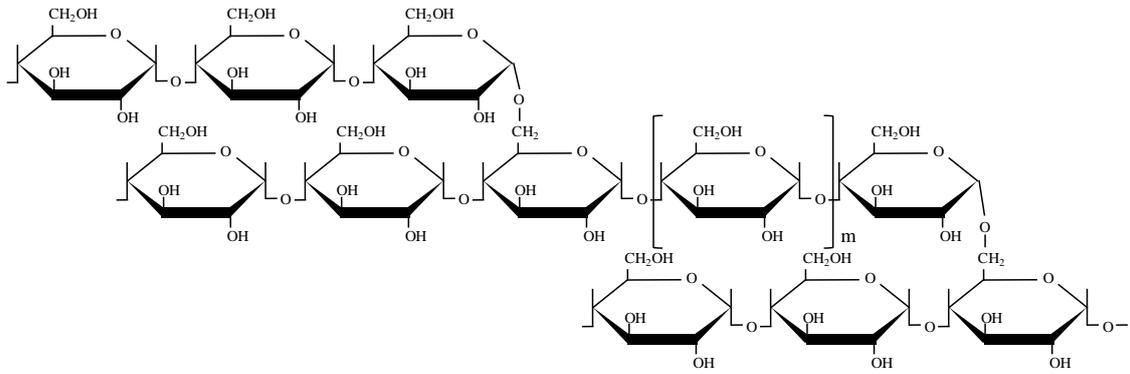
二糖	スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、セロビオース、ゲンチオビオース、ニゲロース、ラクツロース、ラミナリビオースなど
三糖	マルトトリオース、ラフィノース、キシロトリオース、ケストース、ニゲロトリオースなど
四糖	ニストース、スタキオースなど

表 1-4 代表的な多糖類とその構成糖

構成糖	多糖	結合
グルコース	アミロース	$\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合
	アミロペクチン	$\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で分岐
	デキストリン	$\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で分岐
	セルロース	$\beta 1 \rightarrow 4$ 結合
	カードラン	$\beta 1 \rightarrow 3$ 結合
フルクトース	レバン	$\beta 2 \rightarrow 6$ 結合
ガラクトース	アガロース	$\beta 1 \rightarrow 3$ 結合(ガラクトース) $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合(3,6-アンヒドロ- $\alpha$ -L-ガラクトース)の繰り返し ほとんど硫酸基は持たない
	カラギーナン	$\beta 1 \rightarrow 3$ 結合(ガラクトース) $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合(3,6-アンヒドロ- $\alpha$ -D-ガラクトース)の繰り返し 硫酸基を有する
キシロース	キシラン	$\beta 1 \rightarrow 4$ 結合
グルコース フルクトース	イヌリン	$\beta 2 \rightarrow 1$ 結合、 末端に $\alpha(1 \rightarrow 2)\beta$ 結合でグルコース
グルコース マンノース	グルコマンナン	おおよそグルコースとマンナンが2 : 3で $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合
グルコース マンノース グルクロン酸	キサントガム	主鎖に $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合のグルコース 側鎖にマンノース-グルクロン酸-マンノース 末端のマンノースはピルビン酸と結合していることもある



アミロース



アミロペクチン

図 1-3 アミロースとアミロペクチンの構造

食品に利用されている機能性オリゴ糖には、主に砂糖を原料に合成されるフラクトオリゴ糖、主に澱粉を原料に生産されるイソマルトオリゴ糖、ニゲロオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、主に乳糖を原料に生産されるガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖などがあげられる。

糖類の機能性は、栄養源としての一次機能はもちろん、嗜好性に関する二次機能、生体調節機能に関する三次機能がある。一次機能に関わる生理作用としては、消化、吸収、代謝がある。消化は、多糖やオリゴ糖が単糖にまで加水分解され、腸管から吸収可能な形に変換することである。澱粉とその分解物、スクロース、マルトースなどはこの消化の過程の後、体内に小腸上皮細胞の輸送系によって吸収され、細胞内にとりこまれる。吸収されたグルコースは、解糖系、クエン酸回路、酸化的リン酸経路を経て、エネルギーを生み出す。過剰な栄養源としてのグルコースは、体内にグリコーゲンとして貯蔵されることとなる。なかには、消化・吸収されない、もしくはされにくい糖質もある。これらは難消化性糖質と呼ばれ、食物繊維、難消化性澱粉、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、マルチトール、エリスリトールなどがある。難消化性糖質は、人体の消化酵素によって消化されず、腸まで届き、腸内細菌に良い影響を与え、腸内環境の改善に役立つ[12]。

二次機能の効果として、食品が単にエネルギー源を得るためだけに食べられるのではなく、その食品の摂取を促進すること、食生活に潤い・楽しみを持たせることがある。糖の二次機能としてもっとも利用されているのは、甘味である。糖類は甘味を持つものが多く存在しているが、その強さは、種によって大きく異なる。単糖、オリゴ糖は甘味を示すが、高分子になるにつれて甘味は弱くなる。甘味料としてもっとも利用されているスクロース(砂糖)を 100 とした

時の相対甘味度を表 1-5 に示す[13]。市販されているオリゴ糖は 30-60 程度の甘さとなっている。食品の三次機能に分類される生体調節機能は、近年の健康志向の高まりにより、重要性・必要性が増してきている。糖の生体調節機能としては、整腸作用、血圧調節、血糖値調節、高吸収性ミネラル、低カロリー、抗う蝕性、ビフィズス菌増殖活性、便性改善など、多くの機能が報告されている[8,9,14-16]。そのため、我が国ではこれらの糖類が含まれる食品は、特定保健用食品として表示され、販売されている(表 1-6)[11]。

表 1-5 スクロースを 100 としたときの相対甘味度

二糖 (オリゴ糖)	スクロース	100	
単糖	α-フルクトース	60	
	β-フルクトース	173-180	
	α-グルコース	74	
	β-グルコース	82	
	α-ガラクトース	32	
	β-ガラクトース	21	
	α-マンノース	32	
	β-マンノース	苦味	
	キシロース	40	
オリゴ糖	マルトース	32-40	
	ラフィノース	20-32	
	ラクトース	16	
	フルクトオリゴ糖	30-60	
	ガラクトオリゴ糖	25-35	
	キシロオリゴ糖	40-50	
ゲンチオオリゴ糖	40		
配糖体	ステビオシド	10000-12000	
人工甘味料	スクラロース	60000	(スクロース誘導体合成甘味料)
	アスパルテーム	20000	(ペプチド性合成甘味料)
	アセサルファムK	30000	(合成甘味料)
	サッカリン	30000	(合成甘味料)
	ズルチン	25000	(尿素誘導体合成甘味料)

表 1-6 特定保健用食品に使用される糖類

区分	関与成分	1日摂取目安量 (g)
Ⅰ.食物繊維	難消化性デキストリン (食物繊維として)	3-8
	ポリデキストロース (食物繊維として)	7-8
	グアーガム分解物 (食物繊維として)	5-12
Ⅱ.オリゴ糖	大豆オリゴ糖	2-6
	フラクトオリゴ糖	3-8
	乳果オリゴ糖	2-8
	ガラクトオリゴ糖	2-5
	キシロオリゴ糖	1-3
	イソマルトオリゴ糖	10

健康食品市場は、ユーザーが直接使用する顧客であることから、人々の健康志向の高まりとともに順調に市場規模が拡大し、2015年には、5000億円を超える市場規模に成長した[17]。機能性オリゴ糖は、魅力的な機能性を有するものが多く存在し、それらは健康食品に添加、または純粹なそのものを健康食品として販売されている。そのため、健康食品の市場拡大に伴って、機能性オリゴ糖の市場も年々拡大していることが予測される。近年、工業用酵素の開発や製造技術の向上によって、安定的に工業生産可能となってきたことも背中を押しており、2005年時点で機能性オリゴ糖の市場規模は200億円を突破している。国内の生産量の内訳としては、トレハロース、主に澱粉から生産されるマルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖が最も多くなっている(表 1-7)[18]。これは、原料が安価で豊富であること、加水分解及び転移酵素の知見が多く報告されていたことが要因の1つとして上げられる。2005年時点では、まだ少ない生産量のフラクトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖も有用な機能性が多く報告されており[15,16,19,20]、研究・製造技術の発展とともに、市場と生産量も拡大すると推測される。

表 1-7 2005 年の国内のオリゴ糖生産量

オリゴ糖	生産量(トン/年)
マルトオリゴ糖	15000
イソマルトオリゴ糖	15000
シクロデキストリン	4000
トレハロース	30000
パラチノース	5000
フラクトオリゴ糖	3500
ガラクトオリゴ糖	6500
グリコシルスクロース	2000
乳果オリゴ糖	2500
ゲンチオオリゴ糖	500-1000
ニゲロオリゴ糖	500-1000
その他(キシロオリゴ糖、ラフィノースなど)	1000-2000

### 第3節 フラクトオリゴ糖

フラクトオリゴ糖は、フルクトースを含むオリゴ糖であり、砂糖(スクロース)から微生物・酵素を用いて生産することができる。スクロースを原料に酵素による糖転移反応によって生産されるフラクトオリゴ糖は、1-kestose、nystose、fructosyl nystoseなどがあげられる(図 1-4)[21,22]。スクロースのフルクトース残基が鎖状に延びていく形をとり、この特徴は酵素の基質特異性によってもたらされる。

フルクトース転移に関与する酵素源として微生物、植物由来のものが知られている。酵母の生産する酵素をスクロースに作用させると反応初期には若干の転移反応が認められ 6-kestoseを主に数種のオリゴ糖が生成するが、最終的にはすべてグルコースとフルクトースに加水分解されてしまう。一般に、酵母が生産するフラクトフラノシダーゼは加水分解作用が強く、転移反応によるオリゴ糖の生成は少ない。一方で、カビ類が生産する酵素については種類も多く、転移反応の弱いものから非常に強いものまで存在する。フラクトオリゴ糖製造に使用されている酵素の由来微生物は、*Aspergillus* 属[16,23]、*Penicillium* 属[14,21]あるいは *Scopulariopsis* 属[24]が挙げられ、より効率的に生産するべく研究がなされている。

前述のようにして生産されているフラクトオリゴ糖の特性として、抗う蝕性、難消化性、整腸作用がある。スクロースの約 30%程度の甘味をもつフラクトオリゴ糖であるが、難消化性であるため、体内に吸収されず、結果、血糖値および血中インスリンのいずれも上昇しない。また、腸まで分解されずに届いたフラクトオリゴ糖は、腸内細菌の有用菌(ビフィズス菌、腸球菌)に利用され、腸内環境の

改善にも役に立つ[12]。このようにフラクトオリゴ糖は三次機能の生体調節機能にも有用性が認められている。

フラクトオリゴ糖の原料となる砂糖(スクロース)は、1973(昭和48)年には国内砂糖消費量は320万トンを記録し、一人当たりでは29.29 kgの砂糖消費量となった[25]。しかし、近年の一人当たりの砂糖消費量を見てみると、年々砂糖の消費量が減少傾向にあり、平成28年では、15.4 kgと消費量のピークであった昭和48年と比較すると半分程度である[26]。これは、異性化糖の増加も一因であるが、消費者の健康志向によるものが大きく関与している。砂糖に替わり、甘味度は少なくとも、整腸機能や抗う蝕性作用のある機能性オリゴ糖を使用した食品が多く出回るようになってきた。2018年現在、世界における砂糖消費量は、人口増加の影響もあるが年々増加している(図1-5)。砂糖の過剰摂取は、肥満の原因の一つであり、高血糖・糖尿病を引き起こし、先進国で特に問題となっている。

スクロースに替わる甘味料や機能性オリゴ糖は、世界的にも関心を集めている。スクロースは現代社会において最も使用される甘味料であり、世界中で生産され、原料としては豊富で産業的にも安価で使用しやすい。スクロースから、機能性オリゴ糖を生産することは、スクロースの有効利用とともに付加価値を高めることにもなる。

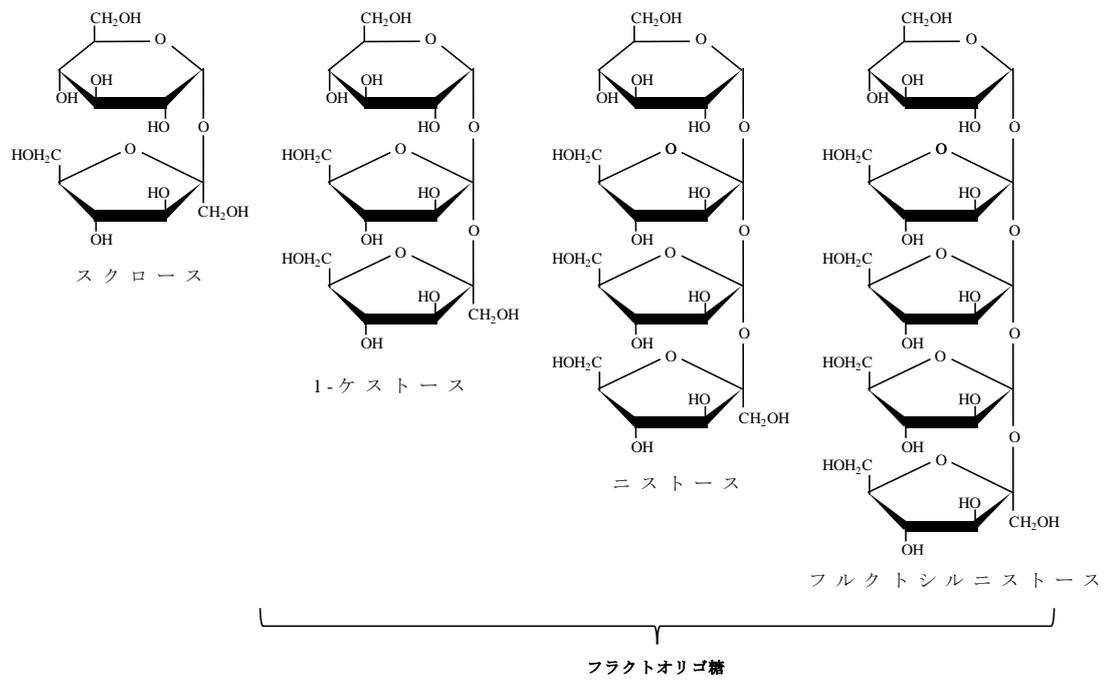


図 1-4 フラクトオリゴ糖の構造

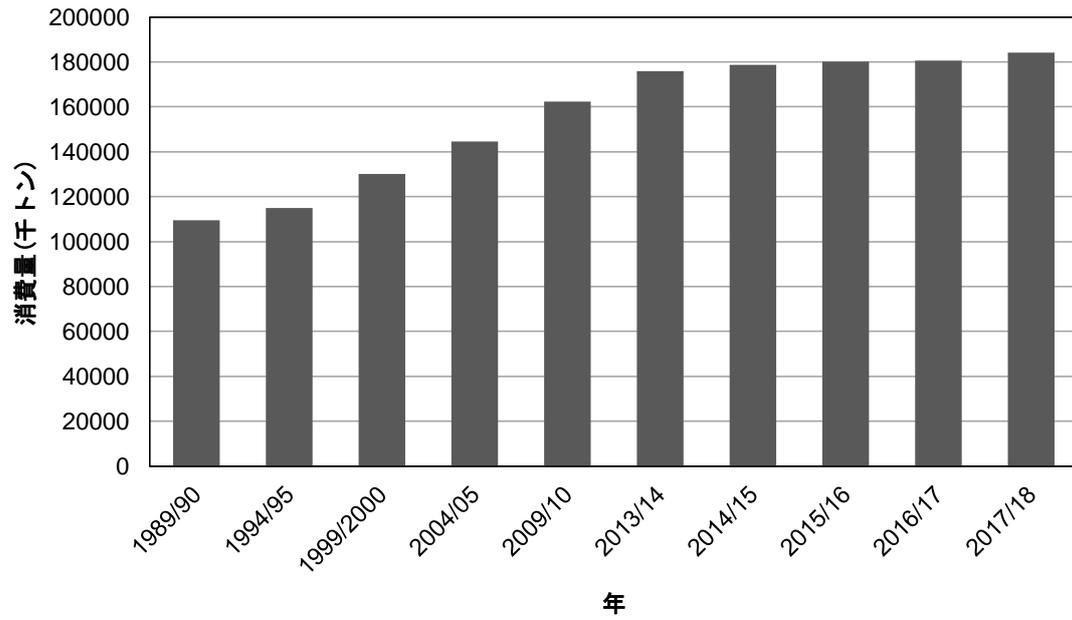


図 1-5 世界の砂糖消費量の推移

#### 第4節 ゲンチオオリゴ糖

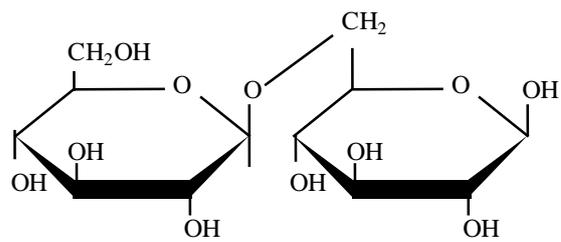
ゲンチオオリゴ糖は、グルコースが  $\beta 1 \rightarrow 6$  結合してできているゲンチオビオース、ゲンチオトリオース、ゲンチオテトラオースなどからなる(図 1-6)。機能性としては、善玉菌の増殖やミネラル吸収促進を有し、また二次機能の嗜好性の面でも、多くのオリゴ糖が甘味を示すのに対し、ゲンチオオリゴ糖は苦味を示す特徴をもつ[13,20]。そのため、ココアやコーヒーによく利用されている。

ゲンチオオリゴ糖の製造方法は、澱粉をグルコースにまで分解したのち、グルコースに  $\beta$ -グルコシダーゼを作用させる転移反応または縮合反応によって生産されている。工業的に生産されている報告はないが、グルコースを構成糖とし、 $\beta 1 \rightarrow 6$  結合を有する  $\beta$  グルカンの加水分解によっても生産することは、理論上可能である。ここで、 $\beta$  グルカンについて、概説する。

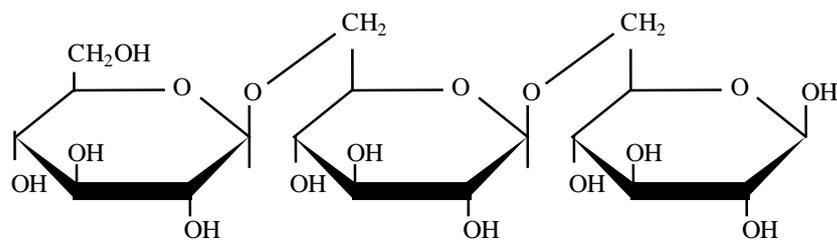
$\beta$ -グルカンの定義としては、 $\beta$  配位したグルコピラノースを主構成糖とする多糖類のことであり、種々の結合様式を包括した広い範囲を含む。最もよく知られている  $\beta$  グルカンの 1 つに  $\beta 1 \rightarrow 4$  結合したセルロースがある。しかし、セルロースは固有名詞としての存在感が強くあるため、 $\beta$  グルカンと呼ぶと、一般に  $\beta 1,3$ -および  $\beta 1,6$ -グルカンを指して使用されることが多い。

$\beta$  グルカンは、真菌、細菌、植物など自然界に広く分布している。キノコ(担子菌の子実体)に多く含まれる成分であり、それらの  $\beta$  グルカンには抗腫瘍活性があることが知られており、抗癌剤として医薬品に使用されている[27,28]。キノコ由来以外の  $\beta$  グルカンとしては、酵母や糸状菌由来の  $\beta 1,3$ -および  $\beta 1,6$ -グルカンがあり、キノコ由来と同様に抗腫瘍活性を有することが報告されている[13]。酵母

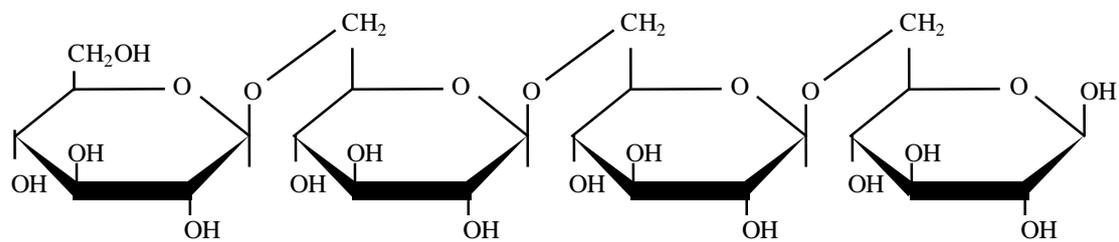
や真菌類の  $\beta$  グルカンは、細胞壁の 1 成分として存在しており、他の多糖やタンパク質と結合し、頑丈な細胞壁を成している。このため、水に難様なものが多く、一般に抽出、高純度化が困難である。しかし、現在では培養液に水熱処理を実施したことで低粘性になるとの報告もなされ、その技術を利用し精製を行なった高純度で水溶性の黒酵母 (*Aureobasidium pullulans*) 由来  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンも市販されている [29]。高純度となったことにより、 $\beta$  グルカンそのものとしての利用価値の向上もさることながら、基質としての原料としても価値が見いだせ、新たなオリゴ糖生産に期待が持てる。



ゲンチオビオース



ゲンチオトリオース



ゲンチオテトラオース

図 1-6 ゲンチオオリゴ糖の構造

## 第5節 本研究の目的と構成

本論文は4章で構成する。

本論文では、微生物由来の酵素を利用した機能性オリゴ糖の効率的な生産条件、または新たな生産方法の検討を目的とした。

第1章は序論として、酵素の産業利用例と糖について紹介し、本研究の目的物質である機能性オリゴ糖の種類や効果について述べる。

第2章では、スクロースを基質として、*Penicillium citrinum* 由来の酵素によってイヌリン型の機能性オリゴ糖のみを生産することが確認された。本菌体がネオケストース ( $\text{Fru}\beta\text{2}\rightarrow\text{6Glc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f}$ ) とネオニストース ( $\text{Fru}\beta\text{2}\rightarrow\text{6Glc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f}$ ) を含むフラクトオリゴ糖を生産することは報告があるが、イヌリン型のフラクトオリゴ糖のみを生産することは知られていない。*P. citrinum* 由来の菌体内酵素を用いて pH および温度に対する特性、そしてイヌリン型機能性オリゴ糖の生産について検討し、フラクトオリゴ糖の生産効率および生産量を明らかにした。

第3章では、*Aureobasidium pullulans* が有する  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを熱水処理した水溶性  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを原料とし、キタラーゼによってゲンチオビースを効率的に生産可能であることを見出した。現在の工業的な生産方法である  $\beta$ -グルコシダーゼによる縮合反応は、二糖のゲンチオビオースの他、三糖、四糖も同時に生産してしまうが、キタラーゼによる本加水分解法はゲンチオビオースを効率よく生産することが可能であることを明らかにした。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章のまとめを行い、機能性オリゴ糖であるフラクトオリゴ糖とゲンチオビオースの効率的な生産について述べた。

## 引用文献

1. 日本酵素協会編 (2009) 日本酵素産業小史
2. 中森茂 (2009) 酵素の生産と利用技術の系統化, 国立科学博物館技術の系統化調査報告 第14集
3. Lee S, Mouri Y, Minoda M, Oneda H, Inouye K (2006) Comparison of the wild-type  $\alpha$ -amylase and its variants enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens* in activity and thermal stability, and insights into engineering the thermal stability of *Bacillus*  $\alpha$ -amylase. *Biochem* 139:1007-1015
4. 小宮山眞 (2010) 酵素利用技術体系－基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで, エヌ・ティー・エス
5. 谷口肇 (2013) 世界に誇る日本の糖質関連酵素研究. *生物工学会誌* 91:14-17
6. Conn EE, Stumpf PK, Bruening G, Doi RH (1988) コーン・スタンブ生化学, 第5版, 東京化学同人
7. Hanashiro I, Matsugasako J, Egashira T, Takeda Y (2005) Structural characterization of long unit-chains of amylopectin. *J Appl Glycosci* 52:233-237
8. Chen H, Liu L-J, Zhu J-J, Xu B, Li R (2010) Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chem* 119:1633-1636
9. Wang Y, Zeng T, Wang S-E, Wang W, Wang Q, Yu H-X (2010) Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. *Nutr* 26:305-311

10. Palanisamy S, Vinosha M, Manikandakrishnan M, Anjali R, Rajasekar P, Marudhupandi T, Manikandan R, Vaseeharan B, Prabhu NM (2018) Investigation of antioxidant and anticancer potential of fucoidan from *Sargassum polycystum*. *Int J Biol Macromol* 116:51-161
11. 消費者庁 (2014) 特定保健用食品の表示許可等について 別添 3 特定保健用食品 (規格基準型) 制度における規格基準
12. Zhu Z-Y, Cui D, Gao H, Dong FY, Liu X-C, Liu F, Chen L, Zhang Y-M (2016) Efficient synthesis and activity of beneficial intestinal flora of two lactulose-derived oligosaccharides. *Europ J Med Chem.* 114:8-13
13. 井上國世 (2005) 機能性糖質素材の開発と食品への応用, 第 1 版, シーエムシー出版
14. Dhake AB, Patil MB (2007) Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. *Braz J Microbiol* 38:194-19
15. Ganaie MA, Gupta US, Kango N (2013) Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. *J Mol Catal B* 97: 12-17
16. Hidaka H, Eida T, Adachi T, Saitoh Y (1987) Industrial production of fructo-oligosaccharides and its application for human and animals. *Nippon Nougai Kagaku Kaishi* 61: 915-923
17. 富士経済 (2017) H・B フーズマーケティング便覧 2017 No.3 機能性表示別市場分析編
18. Nakakuki T (2005) Review Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan.

J Appl Glycosci 52:267-271

19. Kothari D, Goyal A (2015) Gentio-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextransucrase as prebiotics and as a supplement for functional foods with anti-cancer properties. Food Func 6:604-611
20. Unno T, Nakakuki T, Kainuma S, Kataura K, Okada G (1994) Production of  $\beta$ -glucoooligosaccharide-containing syrup and its physicochemical properties. Oyo Toshitu Kagaku 41:327-334
21. Lim JS, Lee JH, Kang SW, Park SW, Kim SW (2007) Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. Eur Food Res Technol 225:457-462
22. Hayashi S, Yoshiyama T, Fujii N, Shinohara S (2000) Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. Biotechnol Lett 22: 1465-1469
23. Hayashi S, Matsuzaki K, Takasaki Y, Imada K (1992) Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. World J Microbiol Biotechnol 8: 276-279
24. Hatakeyama Y, Takeda H, Ooi T, Kinoshita S (1996) Kinetic parameters of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*. J Ferment Bioeng 81:518-523
25. 橋本仁, 高田明和 (2006) 砂糖の科学, 朝倉書店
26. 農林水産省(2018) 平成 29 砂糖年度における砂糖及び異性化糖の需給見通し (第 4 回)
27. Jia X, Liu Q, Zou S, Xu X, Zhang L (2015) Construction of selenium nanoparticles/ $\beta$ -glucan composites for enhancement of the

antitumor activity. Carbohydr Polym 117:434–442

28. Hirase S, Nakai S, Akatsu T, Kobayashi A, Oohara M, Matsunaga K, Fuji M, Ohmura Y (1970) Studies on antitumor activity of polysaccharide. Proc Jpn Canc Assoc 29th Annu Meet: 288
29. 林信行 (2014) 流体圧力調整機構、それを備えた連続式装置、及び、連続式装置を用いた  $\beta$  グルカン製造方法, 特開 2014-157504

## 第 2 章 *Penicillium citrinum* 由来の酵素による機能性イヌリン型オリゴ糖の生産

### 第 1 節 緒言

三糖の 1-ケストース ( $O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-}\beta\text{-D-fructofuranosyl } \alpha\text{-D-glucopyranoside}$ ) や四糖のニストース ( $O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-}\beta\text{-D-fructofuranosyl } \alpha\text{-D-glucopyranoside}$ ) などのイヌリン型のフラクトオリゴ糖は、カロリーが低く、抗う蝕性であり、ビフィズス菌の増殖を助ける興味深い特質を示すため、工業的に製造され、幅広く使用されている [1-4]。 *Aspergillus japonicus* [5], *Aspergillus niger* [3], *Aspergillus oryzae* [6], *Aureobasidium pullulans* [7], *Chrysonilia sitophila* [8], *Fusarium oxysporum* [9], *Penicillium expansum* [10] のようないくつかの微生物由来の酵素は、フルクトース転移活性を介して、スクロースをフルクトースの供与体と受容体としてフラクトオリゴ糖を生産すると同時に、グルコースを反応溶液中に遊離する。

*Penicillium citrinum* の遊離菌体 [11] または固定化菌体 [12, 13] によるフラクトオリゴ糖生産において、ネオケストース ( $\text{Fru}\beta\text{2}\rightarrow\text{6Glc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f}$ ) とネオニストース ( $\text{Fru}\beta\text{2}\rightarrow\text{6Glc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f1}\rightarrow\text{2}\beta\text{Fru}\text{f}$ ) が含まれることが、これまでに報告されている。しかし、*P. citrinum* 由来の菌体内酵素が 1-ケストースやニストースのようなイヌリン型のフラクトオリゴ糖のみを生産することは、まだ報告されていない。

本研究では、低コスト基質としてのスクロースの価値を高めるため、*P. citrinum* 由来の菌体内酵素を用いて、pH および温度に対する

特性、および機能性イヌリン型オリゴ糖の生産について検討し、フラクトオリゴ糖の生産効率および生産量を明らかにした。すなわち、*P. citrinum* から抽出した本酵素のフラクトオリゴ糖の工業的生産における有用性を確認した。

## 第 2 節 実験方法

### 2.1 培養と酵素調製

*P. citrinum* をスクロース 200 g/L、酵母エキス 20 g/L、 $K_2HPO_4$  2 g/L、NaCl 11 g/L を含む液体培地で培養した。培養は、pH 6.5、30 °C で 5 日間行った。フルクトース転移活性を示す酵素は、 $\beta$ -fructofuranosidase 活性を有さないキタラーゼ (2,000 U, endo- $\beta$ -1,3-glucanase; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 20 g を用いて、75 mmol/L McIlvaine 緩衝液 (pH 5)、40 °C、2 時間反応させ、乾燥菌体 5 g から可溶化した。遠心分離 ( $13,000 \times g$ , 15 分) によって得た上清を菌体内酵素として使用した。

### 2.2 酵素活性測定

酵素反応は、100 mmol/L McIlvaine 緩衝液 (pH 5) に溶解した 375 mg/mL スクロース溶液 0.8 mL に酵素溶液 0.2 mL を添加することで開始した。反応は、50 °C で 20 分間行い、10 分間煮沸して反応を停止させた。

生成したグルコース量が転移したフルクトース量と同じであるので、反応液中のグルコース量をグルコースオキダーゼ法 (Glucose CII-test; Wako) にて分析した。酵素活性 1U は、1 分間に 1  $\mu$ mol のフルクトース転移のために必要な酵素量と定義した。

### 2.3 酵素反応

最適反応 pH は pH 3-8 で反応を行って求めた。pH 安定性は、pH 4-8 で 3 時間放置後の残存活性を測定して求めた。

最適反応温度は、20-80 °C で反応を行って求めた。温度安定性は、20-80 °C で 15 分間放置後の残存活性を測定して求めた。

100 mmol/L McIlvaine 緩衝液 (pH 5) に溶解した 375 mg/mL スクロース溶液 8 mL と酵素溶液 (10 U) 2 mL を混合し、30 °C で 72 時間反応させた。

生成したオリゴ糖は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置 (Shimadzu LC-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)、Wakosil 5NH<sub>2</sub> カラム (4.6 × 250 mm; Wako)、カラム温度 40°C、移動相アセトニトリル/精製水 80 : 20 (v/v)、流速 1 mL/min、IR 検出器 (RID-6A, Shimadzu) によって分析した。

オリゴ糖生産効率は、反応混合液中の初発スクロース濃度に対する生成オリゴ糖濃度のパーセンテージとして示した。

## 第 3 節 結果

### 3.1 反応条件

フラクトオリゴ糖生産のための *P. citrinum* 由来酵素の pH と温度の特性について検討した結果、図 2-1 に示したように酵素の最適 pH は 5 であった。また、本酵素は pH 4.5-7 の範囲で安定であり、3 時間後でも 90% の活性を維持した (図 2-2)。

酵素の最適反応温度は、50 °C であった (図 2-3)。また、図 2-4 に示したように、本酵素は 50 °C において 15 分間安定であり、60 °C

でも 70%の活性を維持した。しかし、80 °Cにおいて本酵素は殆ど失活した。

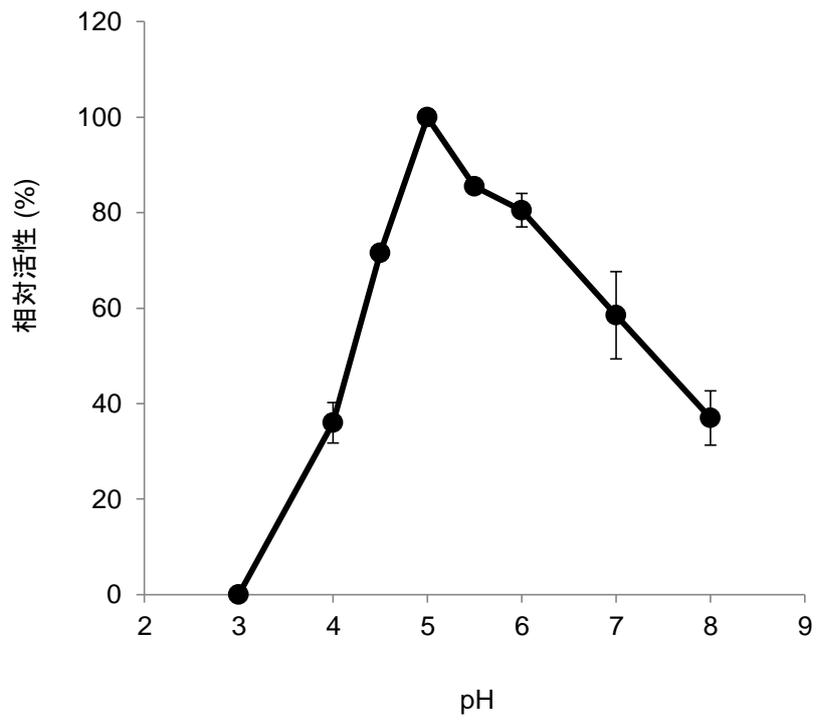


図 2-1 酵素活性におよぼす pH の影響

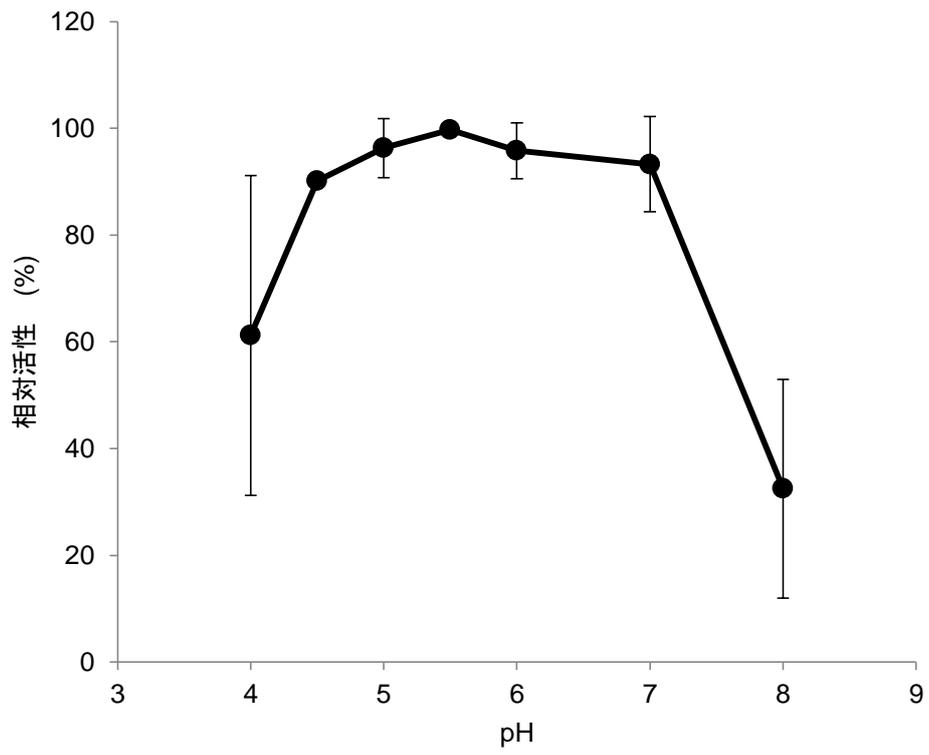


図 2-2 酵素活性の安定性におよぼす pH の影響

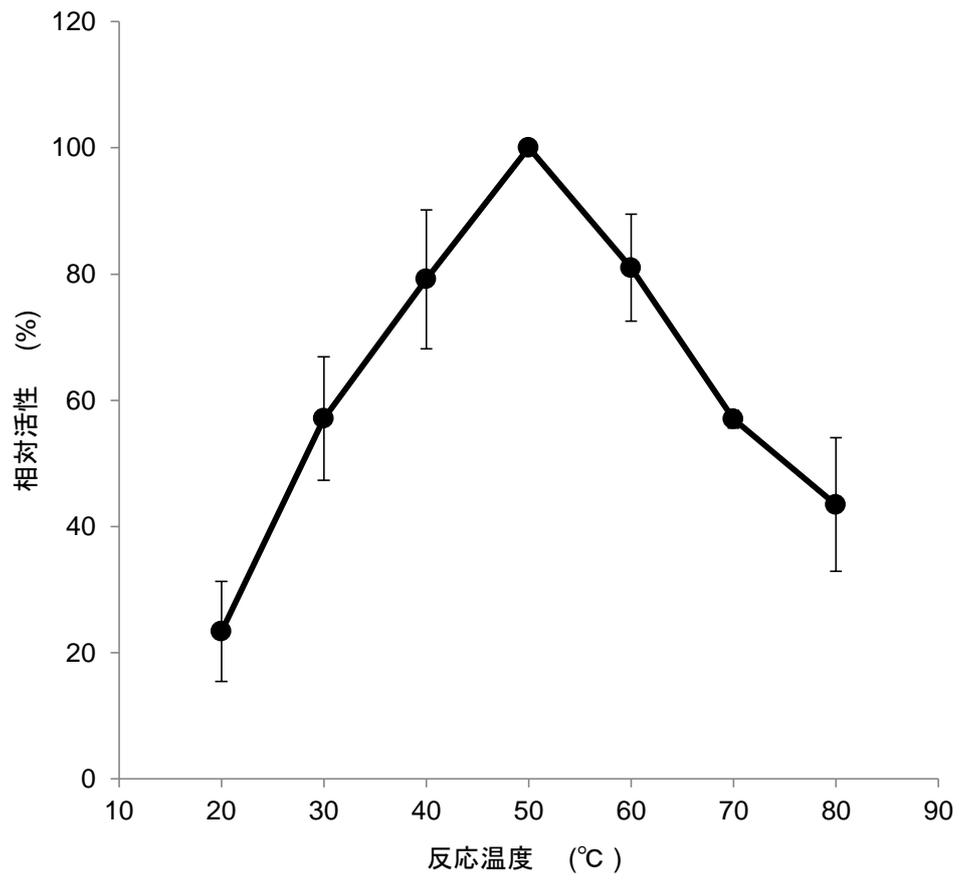


図 2-3 酵素活性におよぼす温度の影響

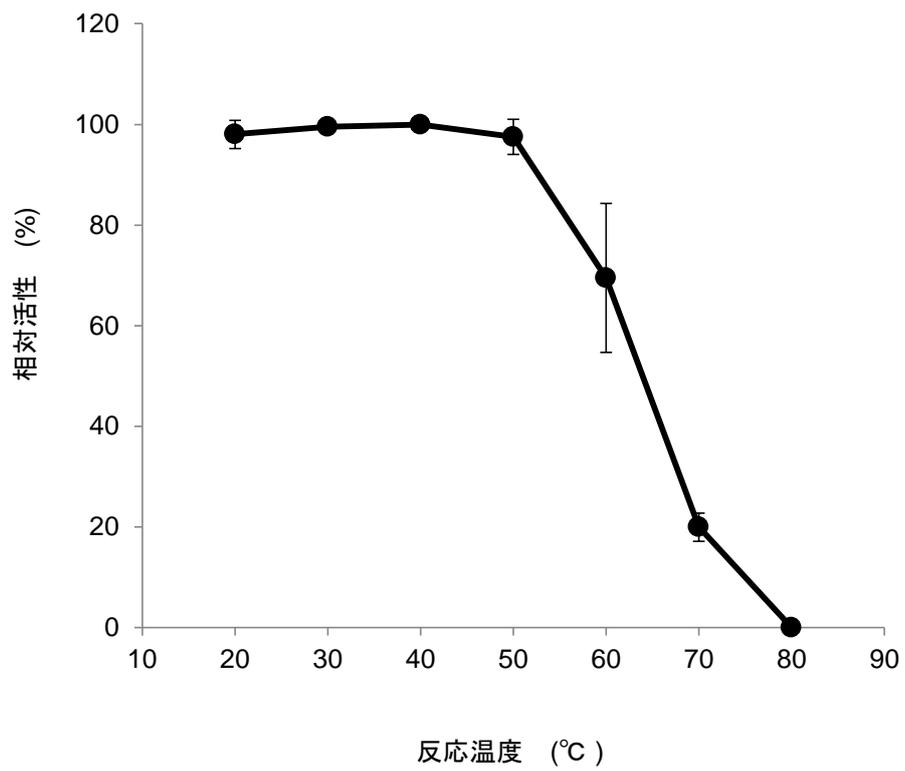


図 2-4 酵素活性の安定性におよぼす温度の影響

### 3.2 酵素反応を用いたフラクトオリゴ糖生産

*P. citrinum* 由来の酵素によって触媒される反応のタイムコースを、図 2-5 に示した。本酵素は、スクロースから 1-kestose を生成するとともに、グルコースを遊離した。フルクトースは、長時間反応後に反応液中に生成された。48 時間後の 1-kestose 濃度は、110 mg/mL であり、初発スクロース濃度 (295 mg/mL) と比較して、37.3% の転移効率を示した。1-kestose からのニストース生産は、24 時間反応後から起こり、72 時間後の値は 34.2 mg/mL であった。スクロースから生産されたフラクトオリゴ糖類 (1-kestose とニストース) の最大濃度は、72 時間後に 139 mg/mL に達し、初発スクロース濃度に対する転移効率は 47.1% であった。1-kestose が生成されるにつれて、グルコース濃度は増加したが、フルクトース濃度は、殆ど変化しなかった。

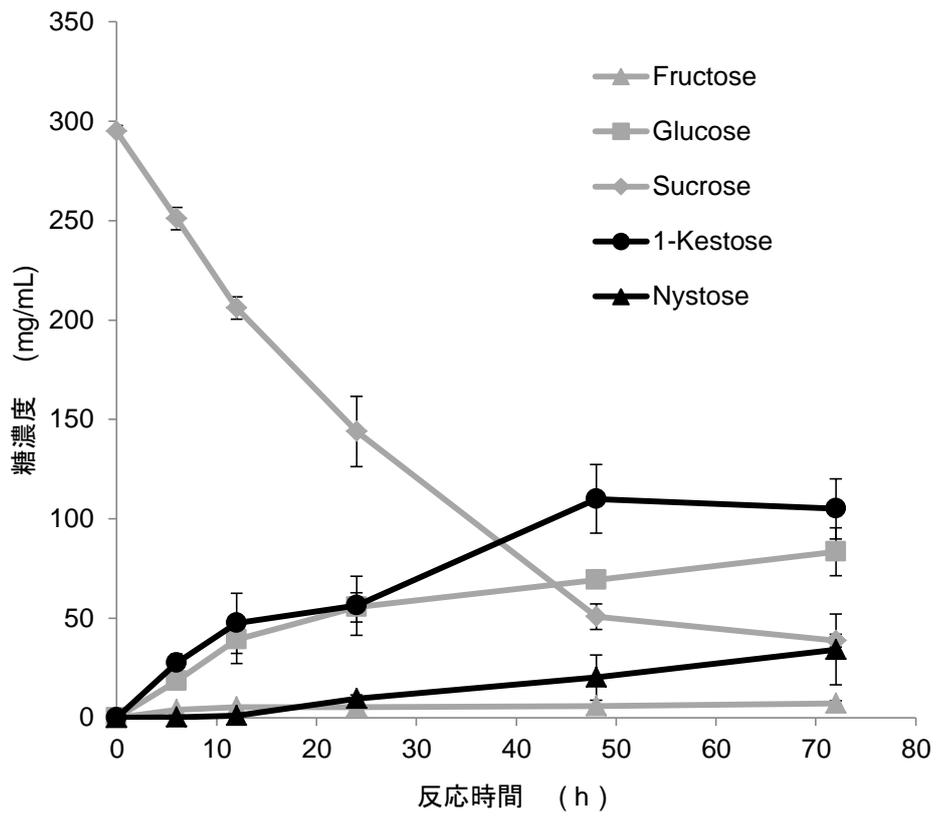


図 2-5 フラクトオリゴ糖生産の経時変化

#### 第 4 節 考察

*P. citrinum* からキタラーゼ (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) を用いて抽出した菌体内酵素は、フルクトース供与体と受容体としてスクロース基質のみを利用したフルクトシル転移活性によって、1-ケストースとニストースのようなイヌリン型のフラクトオリゴ糖のみを生産し、同時に混合液中にグルコースを遊離した。*P. citrinum* 菌体は、ネオケストースやネオニストースのようなフラクトオリゴ糖を生産することが、これまでに報告されている [11-13]。

本酵素の最適 pH (5.0) は、*Penicillium citreonigrum* [14] の最適 pH 5 および *Penicillium purpurogenum* [1] と *Penicillium oxalicum* 由来酵素 [15] の最適 pH 5.5 と類似していた。本酵素は、pH 4.5-7 の広い範囲で安定であるが、標準偏差値が大きいことから pH 4 と pH 8 付近で変性が起こり始めていると考えられた。一方で、pH 2-4 と pH 8 以上の範囲における本酵素の安定性は、*P. citreonigrum* [14] と *P. oxalicum* [15] 由来の酵素安定性より低かったが、工業的なフラクトオリゴ糖生産においては十分であると考えられた。

本酵素の最適反応温度 (50 °C) は、*P. purpurogenum* 由来酵素 [1] の最適反応温度 (55 °C) と同様であり、*P. oxalicum* 由来酵素 [15] の最適反応温度 (60 °C) よりも少し低い結果となった。本酵素の 50 °C における温度安定性は、*P. oxalicum* [15] 由来酵素と同等であり、良好であると考えられた。また、残存活性の標準偏差値が大きいことから、本酵素が 60 °C 付近で変性し始めたと考察した。これまでに報告されている *Penicillium* 由来酵素の pH と温度の特性は、それほど相違がないと考えられた。

本酵素によるイヌリン型フラクトオリゴ糖生産効率 (47.1%) は、*Penicillium chrysogenum* 由来酵素 (42.51%) と類似しており、

*Penicillium purpurogenum* と *Penicillium islandium* 由来酵素より高いことが分かった[16]。また、本酵素活性は、*Penicillium sizovae* 菌体[17]よりも高い生産効率を示した。

*P. citrinum* から得た本酵素は、これまで述べたような良好な特性を有することから、機能性イヌリン型フラクトオリゴ糖の工業的生産に非常に有用であると考えられた。本酵素は、高いフルクトース転移活性を有する  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼであると推定されるが、本酵素の精製と詳細な分析が今後必要である。

結論として、*P. citrinum* から抽出した本酵素を用いて、イヌリン型フラクトオリゴ糖をスクロースから効率的に生産することができた。フラクトオリゴ糖の工業的生産のための酵素反応のスケールアップと最適化が今後の課題である。本酵素プロセスは、スクロースの価値を高め、機能性オリゴ糖生産のために有用であると考えられた。

## 引用文献

1. Dhake AB, Patil MB (2007) Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. Braz J Microbiol 38:194-199
2. Ganaie MA, Gupta US, Kango N (2013) Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. J Mol Catal B 97: 12-17
3. Hidaka H, Eida T, Adachi T, Saitoh Y (1987) Industrial production of fructo-oligosaccharides and its application for human and animals. Nippon Nougai Kagaku Kaishi 61: 915-923
4. Yamashita K, Kawai K, Itakura M (1984) Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. Nutri Res 4: 961-966
5. Hayashi S, Matsuzaki K, Takasaki Y, Imada K (1992) Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. World J Microbiol Biotechnol 8:276-279
6. Kurakake M, Onoue T, Komaki T (1996) Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol 45:236-239
7. Hayashi S, Nonoguchi M, Takasaki Y, Ueno H, Imada K (1991) Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. J Indus Microbiol 7: 251-256
8. Patil PR, Reddy GSN, Sulochana MB (2011) Production, optimization and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Chrysonilia sitophila* PSSF84-a novel source. Indian J Biotechnol

- 10: 56-64
9. Gupta AK, Bhatia IS (1980) Glucofructan biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. *Phytochem* 19: 2557-2563
  10. Mussatto SI, Prata MB, Rodrigues LR, Teixeira JA (2012) Production of fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of *Penicillium expansum*. *Eur Food Res Technol* 235:13-22
  11. Hayashi S, Yoshiyama T, Fujii N, Shinohara S (2000) Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* 22: 1465-1469
  12. Lim JS, Lee JH, Kang SW, Park SW, Kim SW (2007) Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. *Eur Food Res Technol* 225:457-462
  13. Park MC, Lim JS, Kim JC, Park SW, Kim SW (2005) Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* 27:127-130
  14. Nascimento AKC, Nobre C, Cavalcanti MTH, Teixeira JA, Porto ALF (2016) Screening of fungi from the genus *Penicillium* for production of  $\beta$ -fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *J Mol Catal B* 134:70-78
  15. Xu Q, Ahang X, Huang M, Wu M, Yan Y, Pan Y, Pan J, Yang Q, Duan C-J, Liu J-L, Feng J-X (2015) Purification and biochemical characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neo-kestose. *Process Biochem* 50:1237-1246

16. Ganaie MA, Lateef A, Gupta US (2014) Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 172: 2143-2159
17. Zambelli P, Fernandez-Arrojo RD, Santos-Moriano P, Gimeno-Perez M, Poveda A, Gandolfi R, Fernandez-Lobato M, Molinari F, Plou FJ (2014) Production of fructooligosaccharides by mycelium-bound transfructosylation activity present in *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium sizovae*. *Process Biochem* 49: 2174-218

### 第3章 水熱処理 *Aureobasidium pullulans* 由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンからのゲンチオビオースの生産

#### 第1節 緒言

二糖であるゲンチオビオース ( $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc) は、白樺の樹液[1]やフルーツトマト[2]に含まれている。ゲンチオビオースを含むゲンチオオリゴ糖は、糸状菌の  $\beta$ -グルコシダーゼが触媒するグルコース転移反応や縮合反応によって、工業的に生産されている[3]。ゲンチオオリゴ糖は、苦みがあり、高吸湿性を持つことから、高い保湿効果を示す。また、溶解したゲンチオオリゴ糖は、水の凝固点を下げる働き[3]もあり、これらの特徴は、食品の品質や味の改善の為に使用されている。ゲンチオオリゴ糖は、*Bifidobacterium infantis* や *Lactobacillus acidophilus* のような善玉菌の成長を助けるほか、抗ガン作用の可能性[4]が見いだされ、カルシウムの吸収を向上させる効果[3]もあることから、健康食品の成分として極めて有用である。ゲンチオビオースの新規の機能として、発芽休止状態で越冬する際の制御機能[5]や、トマトの熟成の開始を引き起こす因子[2]であることが報告されている。

ゲンチオビオースは、基質としてグルコースもしくはオリゴ糖を用いて、*Aspergillus oryzae*[6]、*Penicillium multicolor*[7]、*Rhizomucor miehei*[8]由来の  $\beta$ -グルコシダーゼによるグルコース転移反応によって生産することができる。しかし、*Aureobasidium pullulans* 由来の多糖  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの酵素加水分解反応を利用したゲンチオビオースの生産については、これまで報告されていない。ゲンチオビオースを含む機能性オリゴ糖の酵素加水分解による生産物は、健康促進のための食品成分として利用することができる。以前に、平

林ら[9]は、水熱処理した *A. pullulans* 由来  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの化学構造を確認し、その水への可溶性と酵素加水分解に対する感受性の関係について注目した。

本研究では、ゲンチオビースの工業的生産の向上のため、キタラーゼを用いて *A. pullulans* 由来  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンからゲンチオビース生産し、ゲンチオビースの収率とグルコースに対するゲンチオビースの割合について検討した。

## 第2節 実験方法

### 2.1 水熱処理 *A. pullulans* 由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの調製

*A. pullulans* ATCC 20524 をスクロース 6 g/L、米糠 2 g/L、アスコルビン酸 2 g/L を含む液体培地を用いて、23℃で 72 時間培養した。 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンは、焼ミョウバンを添加することで回収し、次に、連続流通管型反応器（300 mL/min、180 °C、15 分、pH 5.5）を使用して水熱処理した。処理した  $\beta$ -1,3-1,6-グルカン溶液を限外濾過によって濃縮し、121 °Cで 15 分間オートクレーブ処理し、48 時間凍結乾燥した。

### 2.2 酵素加水分解

酵素として市販のキタラーゼ（主要成分：エンド- $\beta$ -1,3-グルカナラーゼ、EC 3.2.1.6、*Rhizoctonia solani* 由来；Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan）を使用した。基質（100 mg/mL）とキタラーゼ（0.1 U/mg-基質）を含む MacIlvain 緩衝液（pH 5.0、50 mmol/L）を 40 °Cで 18 時間温置した。1 U は、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースに相当する可溶性糖を遊離する酵素量と定義した。

### 2.3 糖測定

得られたグルコースとゲンチオビオースは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置 (Shimadzu LC-10; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を使用して定量した。カラムは、Shodex KS-801 カラム (8 × 300 mm; Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) を使用し、検出器は IR 検出器を用いた。分析条件は、カラム温度 40 °C、移動相は精製水を用い、流速 0.5 mL/min で分析した。ゲンチオビオース収率は、反応混合液中の初発基質濃度のパーセンテージとして示した。

## 第3節 結果

### 3.1 各反応 pH におけるゲンチオビオース生産

各反応 pH におけるキタラーゼを用いた *A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカン 100 mg/mL からのゲンチオビオース生産のタイムコースを図 3-1、グルコースに対するゲンチオビオースの割合 (Gen/Glc) を図 3-2 に示した。ゲンチオビオースの最大濃度は、pH 5.5 における 6 時間反応時の 41.2 mg/mL であり、初期の基質濃度の 41.2% (w/w) の収率を示した。それぞれの pH におけるゲンチオビオースの最大値と割合 (Gen/Glc) 値を図 3-3 に示した。ゲンチオビオースは、pH 4-6 の間で、38.3-41.2 mg 生産され、Gen/Glc 値は、1.52-1.59 であった。また、ゲンチオビオース濃度と Gen/Glc 値は、ともに約 pH 7 で減少した。

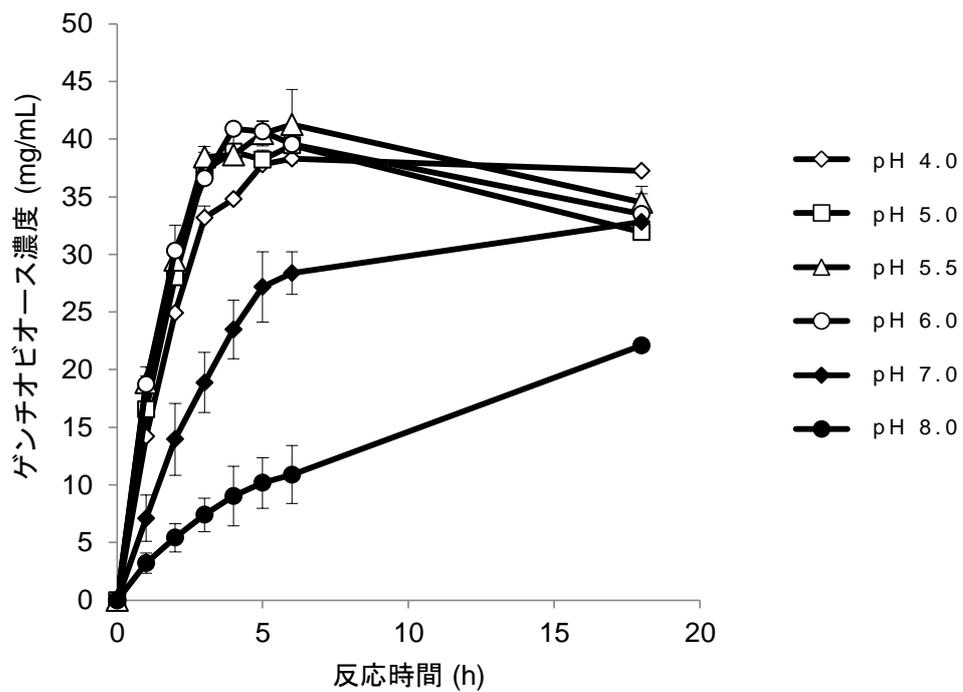


図 3-1 各反応 pH におけるキタラーゼを用いたゲンチオビオース生産の経時変化

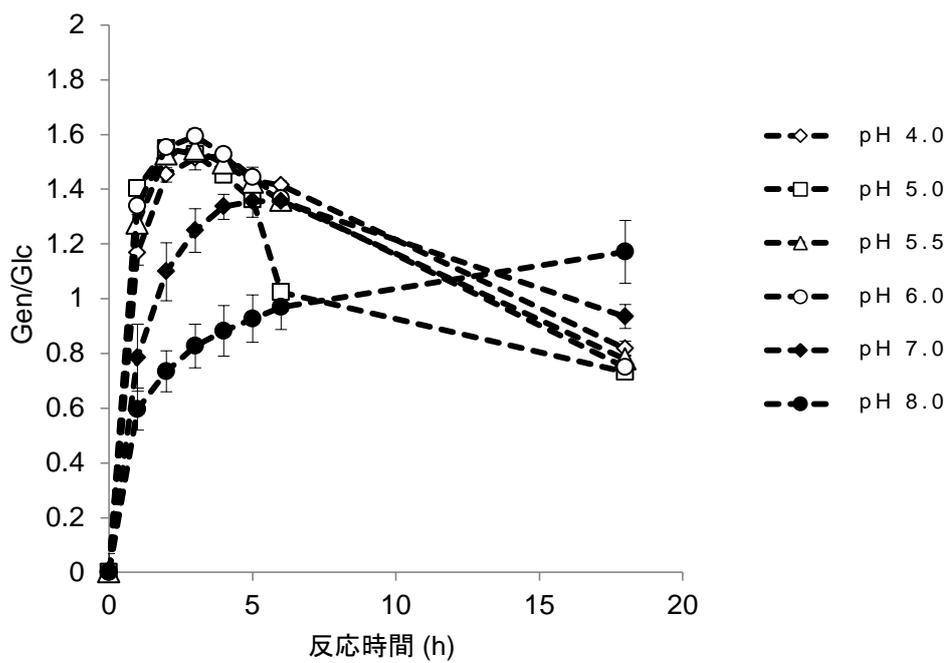


図 3-2 各反応 pH におけるキタラーゼを用いたゲンチオビオース生産でのグルコースに対するゲンチオビオースのモル比の経時変化

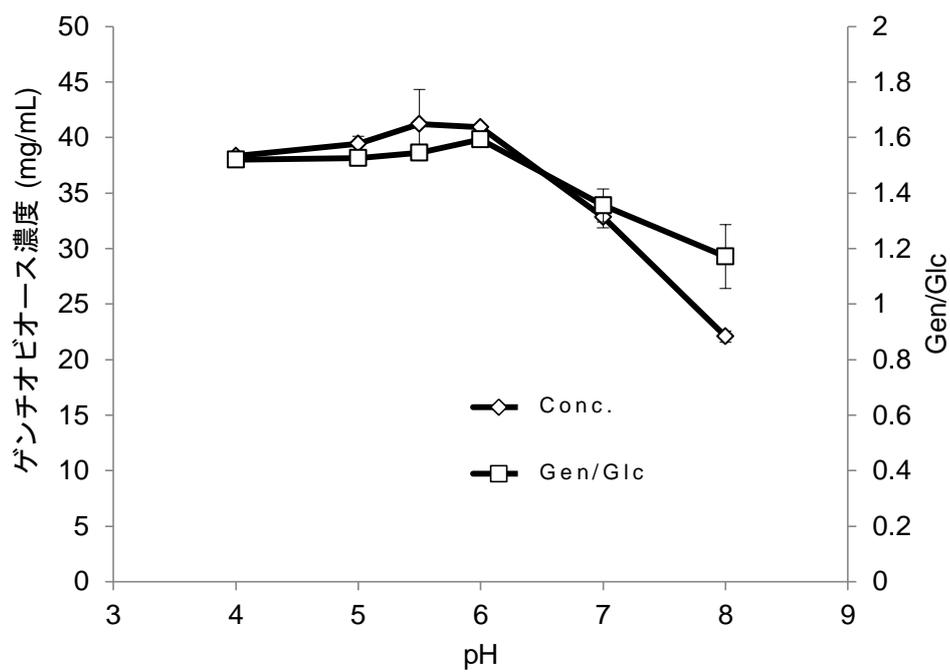


図 3-3 ゲンチオビオース最大濃度およびグルコースに対するゲンチオビオースの最大モル比におよぼす pH の影響

### 3.2 各酵素濃度におけるゲンチオビオース生産

50 mg/mL  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを基質としたときの、各キタラーゼ濃度におけるゲンチオビオース生産と Gen/Glc 値のタイムコースを、図 3-4 に示した。ゲンチオビオースの最大濃度 (21.4 mg/mL) は、0.5 U/mg-基質、1 時間反応時に得られ、初期基質濃度の 42.8% (w/w) の収率であった。酵素濃度におけるゲンチオビオース濃度と Gen/Glc 値の最大値を図 3-5 に示した。Gen/Glc 値の最大値は、酵素濃度が増大するにつれて、1.57 から 0.96 に減少したが、一方でゲンチオビオース濃度の最大値 (19.3–21.4 mg/mL) は、基本的には変化せずに維持した。

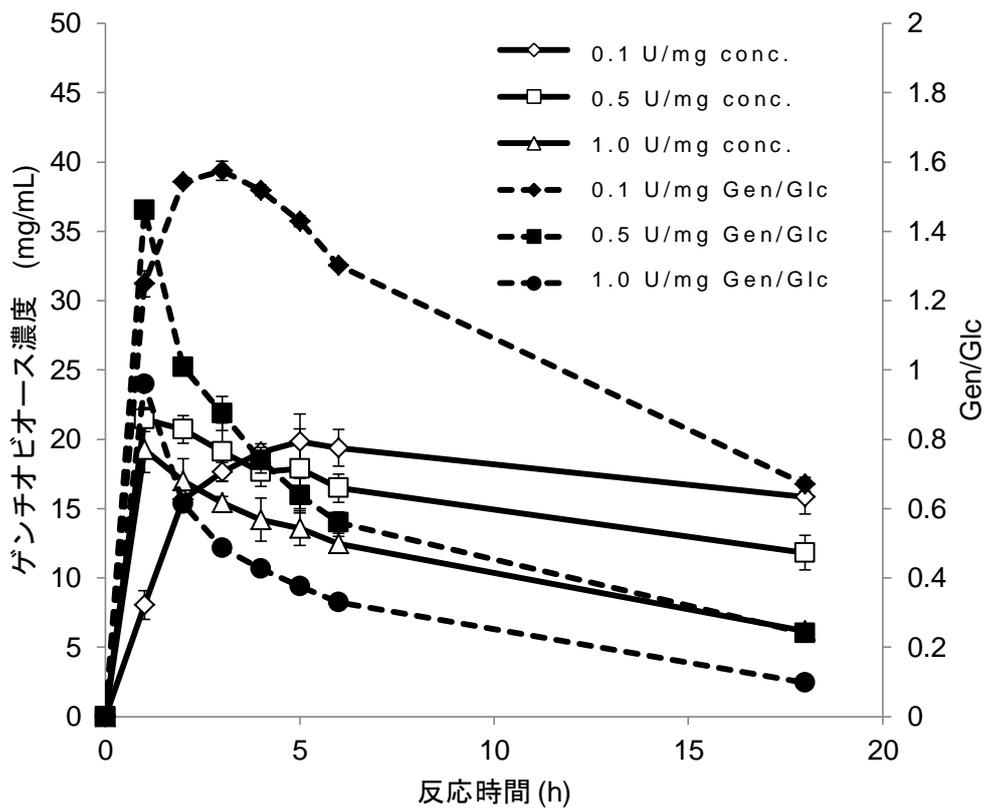


図 3-4 各キタラーゼ濃度におけるゲンチオビオース生産とグルコースに対するゲンチオビオースのモル比の経時変化

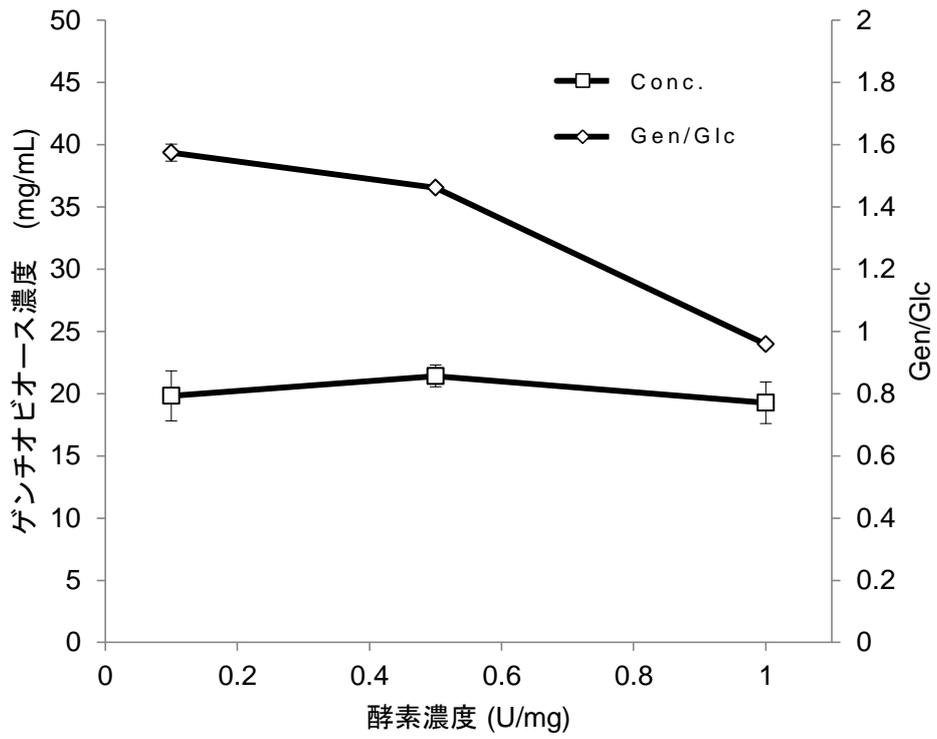


図 3-5 ゲンチオビオース最大濃度およびグルコースに対するゲンチオビオースの最大モル比におよぼすキタラーゼ濃度の影響

### 3.3 各基質濃度におけるゲンチオビオース生産

*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカン濃度において、キタラーゼを用いて得たゲンチオビオースと Gen/Glc 値のタイムコースを図 3-6 に示した。ゲンチオビオースの最大濃度は、100 mg/mL  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンで得られた。酵素濃度における最大ゲンチオビオース濃度と Gen/Glc 値を、図 3-7 に示した。ゲンチオビオースの最大濃度は、初期基質濃度に依存して増大したが、それぞれの濃度の Gen/Glc 値の最大値（1.55–1.62）は、基本的に変化せずに維持された。

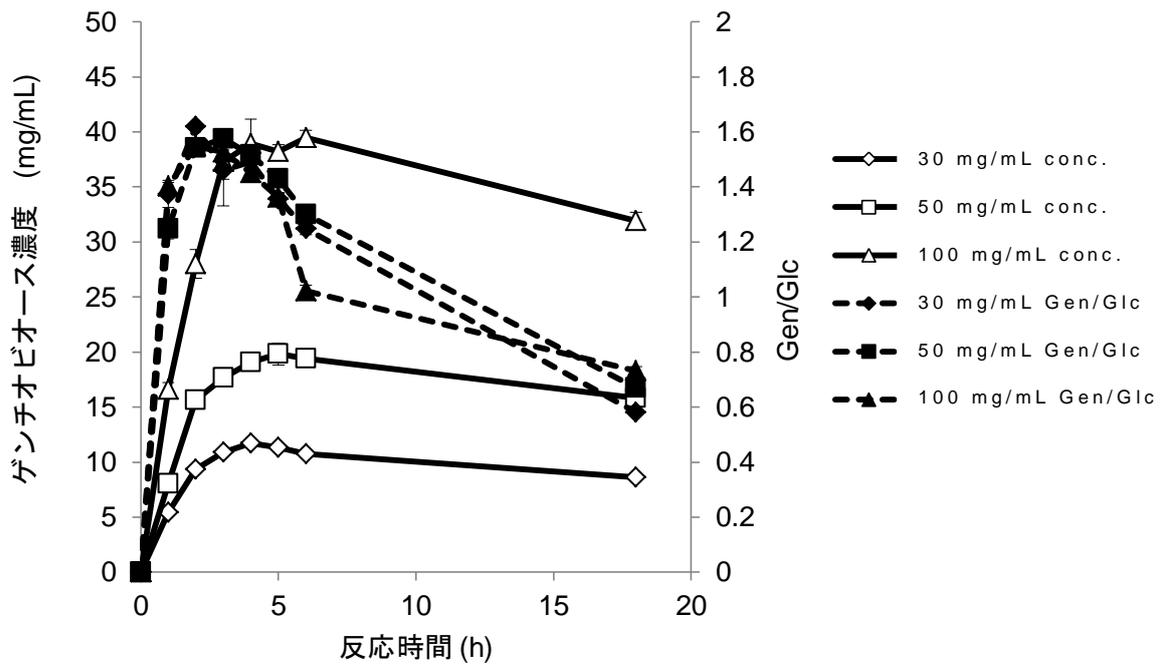


図 3-6 各基質濃度におけるキタラーゼによるゲンチオビオース生産とグルコースに対するゲンチオビオースのモル比の経時変化

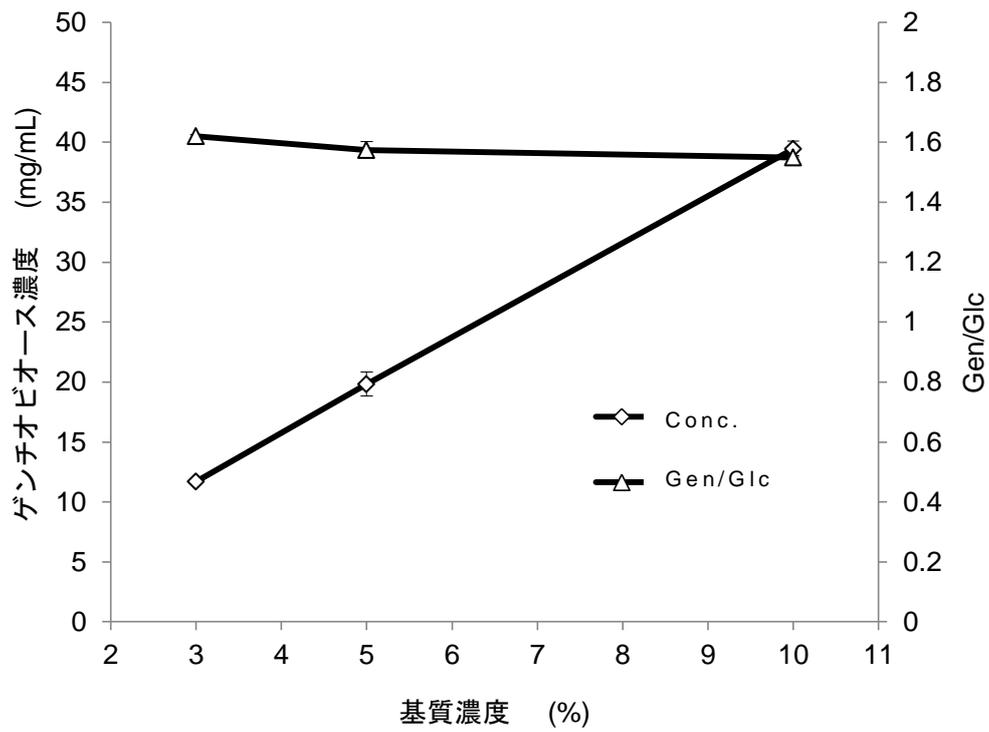


図 3-7 ゲンチオビオース最大濃度およびグルコースに対するゲンチオビオースの最大モル比におよぼす基質濃度の影響

### 3.4 異なる由来の $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの酵素加水分解

*Saccharomyces cerevisiae* (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) もしくは *A. pullulans* 由来の 30 mg/mL  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを基質として用い、得られたキタラーゼによるゲンチオビース生産のタイムコースと Gen/Glc 値を図 3-8 に示した。*S. cerevisiae*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンから生産されたゲンチオビースの最大濃度は、2 時間反応後の 5.6 mg/mL であり、初期基質濃度の 18.7% (w/w) の収率を得た。この値は、*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを使用したときの値 (37.8%, w/w) より低い結果となった。*S. cerevisiae*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを用いた最大の Gen/Glc 値は、1-2 時間後の 0.48 であり、*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを使用した Gen/Glc 値 (1.62) より低い値となった。

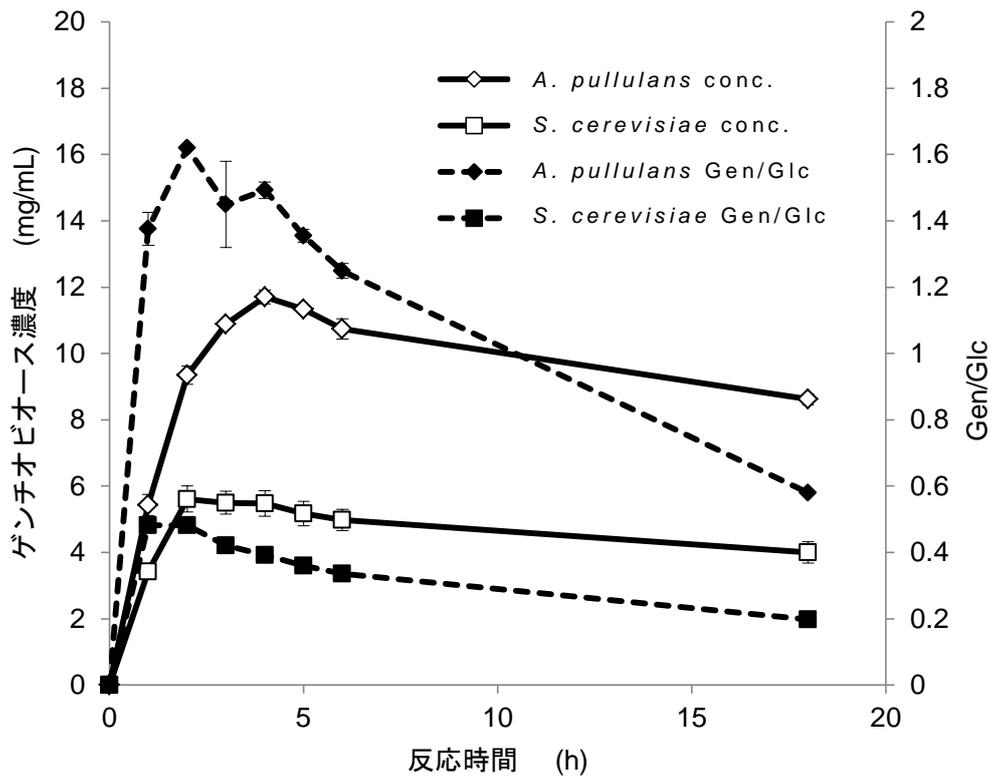


図 3-8 *A. pullulans* と *S. cerevisiae* の  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを用いたキタラーゼによるゲンチオビオース生産とグルコースに対するゲンチオビオースのモル比の経時変化

### 3.5 酵素反応による生産物の HPLC 分析

図 3-9 に、*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの酵素反応によって得られた反応混合物およびゲンチオビオースとグルコースのスタンダードの HPLC 分析結果を示した。生産されたゲンチオビオースのリテンションタイム (12.0 min) は、ゲンチオビオーススタンダード (12.0 min) と一致し、他の生産物のピークから十分に分離し、回収が可能であった。

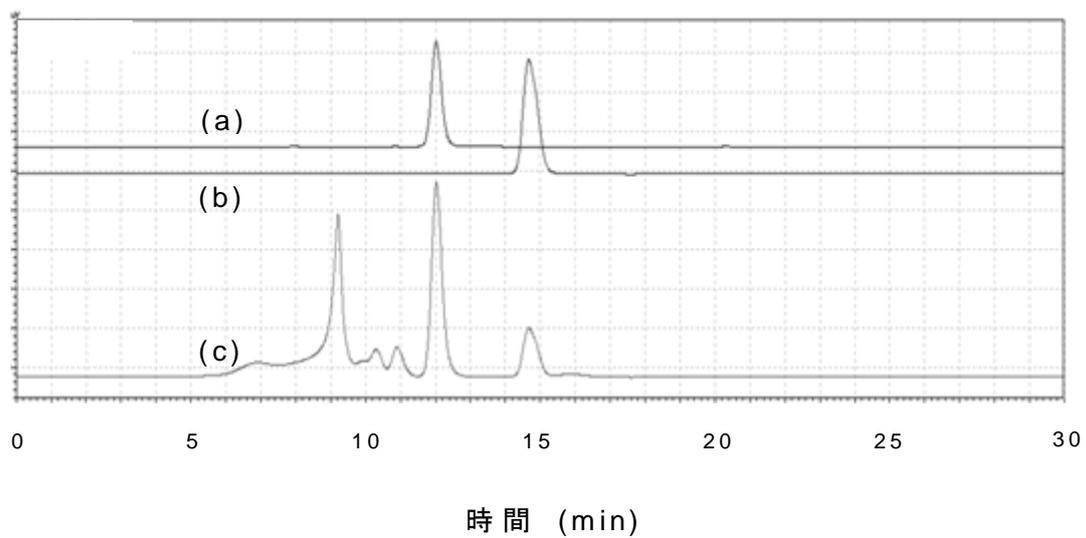


図 3-9 キタラーゼを用いた酵素反応性生物の HPLC 分析

(a) ゲンチオビオーススタンダード

(b) グルコーススタンダード

(c) 反応液

基質濃度 : 30 mg/mL

酵素濃度 : 0.1 U/mg

反応 pH : 5

反応温度 : 40 °C

反応時間 : 1 h

#### 第4節 考察

ゲンチオビオースが苦みを持つ二糖 [7] であり、有用な特性を持ち、食品工業で使用されていることは、第 1 節緒言で述べた。図 3-9 に示した HPLC 分析のリテンションタイム 12 min の糖は、NMR 分析によって、ゲンチオビオースであることを確認している [9]。従って、今回の効率的なゲンチオビオース工業生産モデルは、有用である。ゲンチオビオースを含むゲンチオオリゴ糖は、前述のように通常、グルコース転移反応によって生産されているが、本研究では、酵素加水分解を用いて、多糖からゲンチオビオースを生産することを試みた。

今回、水熱処理 *A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの加水分解とゲンチオビオース生産の最適条件を検討し、最大収率 40% が得られた。この値は、組換え *Thermus caldophilus* [10]、*Penicillium multicolor* [7]、*Rhizomucor miehei* [8] の  $\beta$ -グルコシダーゼを用いたときの最大収率よりも高かった。*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを基質として用いた場合に Gen/Glc 値が高いのは、その高い分岐度によるものと考えられた。

図 3-3 に示すように、pH 7 以下で Gen/Glc 値が減少したので、キタラーゼの  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性に対して  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼ活性が、pH 7-8 において増大することが示唆された。酵素の添加量により  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼと  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性の比率が変化しないことから、酵素量が最大ゲンチオビオース濃度および最大 Gen/Glc 値に影響しないことが、図 3-4 からわかる。最大ゲンチオビオース濃度は、基質濃度が高くなるにつれて高くなるが、一方で、最大 Gen/Glc 値は基質濃度に依存しないことを図 3-7 に示した。これは、キタラーゼの  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼと  $\beta$ -1,3-グルカナーゼの

酵素活性が、基質濃度に影響されないことを示唆する。

図 3-9 に示すように、この加水分解方法では、転移反応によって生産されるゲンチオビオースのピークに近い多様なオリゴ糖 ( $n>2$ ) [7,10]を生産しない。このことは、基礎研究試薬としてのゲンチオビオース生成と分画が容易であることを意味する。ゲンチオビオースの工業的生産のための本手法のスケールアップと分離・生成条件の最適化は、今後検討する予定である。

異なる分岐頻度を有する *A. pullulans*由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンと *S. cerevisiae*由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを基質として用い、ゲンチオビオース生産を比較することによって、今回の加水分解を用いる方法を評価した。*S. cerevisiae*由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの $\beta$ -1,6-分岐の平均分岐度は22%であることが、これまでに報告されている[11]。すなわち、*S. cerevisiae*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンは分岐の少ない多糖であるので、ゲンチオビオース生産と Gen/Glc値が低くなったと考えられた。

本報告では、加水分解法を用いて *A. pullulans*由来 $\beta$ -1,3-1,6-グルカンからゲンチオビオースを生産した。今回の方法を現在使用されている $\beta$ -グルコシダーゼ反応を用いたグルコース縮合法とは異なる新規な方法として、ゲンチオビオースの工業的生産のために提案する。

## 引用文献

1. Haq S, Adams GA (1962) Oligosaccharides of birch sap. *Can J Biochem Phys* 40:989-997
2. Dumviller JC, Fry SC (2003) Gentiobiose: a novel oligosaccharin in ripening tomato fruit. *Planta* 216:484-495
3. Unno T, Nakakuki T, Kainuma S, Kataura K, Okada G (1994) Production of  $\beta$ -glucooligosaccharide-containing syrup and its physicochemical properties. *Oyo Toshitu Kagaku* 41:327-334
4. Kothari D, Goyal A (2015) Gentio-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextransucrase as prebiotics and as a supplement for functional foods with anti-cancer properties. *Food Funct* 6:604-611
5. Takahashi H, Imamura T, Konno N, Takeda T, Fujita K, Konishi T, Nishihara M, Uchimiya H (2014) The gentio-oligosaccharide gentiobiose functions in the modulation of bud dormancy in the herbaceous perennial *Gentiana*. *Plant Cell* 26:3949-3963
6. Qui Y, Zhang Y, He H, Zhu J, Chen G, Li W, Liang Z (2011) Screening and identification of a fungal  $\beta$ -glucosidase and the enzymatic synthesis of gentio-oligosaccharide. *Appl Biochem Biotechnol* 163:1012-1019
7. Fujimoto Y, Hattori T, Uno S, Murata T, Usui T (2009) Enzymatic synthesis of gentiooligosaccharides by transglycosylation with  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium multicolor*. *Carbohydr Res* 344:972-978
8. Guo Y, Yan Q, Yang Y, Yang S, Liu Y, Jiang Z (2015) Expression

- and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase, with transglycosylation and exo- $\beta$ -1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. *Food Chem* 175:431-438
9. Hirabayashi K, Kondo N, Hayashi S (2016) Characterization and enzymatic hydrolysis of hydrothermally treated  $\beta$ -1,3-1,6-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 32:206-212
  10. Kim T-Y, Lee D-S, Shin H-J (2003) Gentiobiose synthesis from glucose using recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Thermus caldophilus* GK24. *Biotechnol Bioproc Eng* 8:210-212
  11. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J (2014) Immune-modulatory effects of dietary Yeast  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan. *Nutr J* 13:38-47

## 第 4 章 総括

近年、予防医学の発展や人々の健康志向の高まりにあわせて、魅力的な効果を有する機能性オリゴ糖は、需要が年々増加している。しかし、機能性オリゴ糖は、大量生産が難しいものも多く、現実、価格も砂糖(スクロース)と比較して高い水準となっている。そこで、本研究では、工業的な機能性オリゴ糖生産を視野に入れて、機能性オリゴ糖の一種であるフラクトオリゴ糖とゲンチオビオースの生産条件の検討を行った。

第 1 章では、酵素の産業利用の現状と糖の種類・構造、機能性オリゴ糖の機能、製造方法、市場および本研究の目的と内容について述べた。

第 2 章では、*Penicillium citrinum* からキタラーゼ(endo- $\beta$ -1,3-glucanase)を用いて抽出した菌体内酵素が、フルクトース供与体と受容体としてスクロース基質のみを利用したフルクトシル転移活性によって、1-ケストースとニストースのようなイヌリン型のフラクトオリゴ糖のみを生産し、同時に混合液中にグルコースを遊離することを確認した。本酵素の最適 pH は 5 であり、また pH 4.5-7 の広い範囲で安定であるため、工業的なフラクトオリゴ糖生産においては十分であると考えられる。本酵素の最適反応温度(50 °C)は、*P. purpurogenum* 由来酵素の値 55 °C と同様であり、*P. oxalicum* 由来酵素の値 60 °C よりも少し低い結果となったが、工業的な生産には問題はないと考えられた。また、これまでに報告されている *Penicillium* 由来酵素の pH と温度に対する特性については、一般的にそれほど大きな相違はないと考えられた。

本酵素におけるイヌリン型フラクトオリゴ糖生産効率(47.1%)は、

*Penicillium* 属由来酵素の中でも高いことが示唆された。*P. citrinum* から得た本酵素は、pH、温度、生成糖の種類において良好な特性を持つため、機能性イヌリン型フラクトオリゴ糖の工業的生産に非常に有用であると考えられた。本酵素は、高いフルクトース転移活性を有する  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼであると推定されるが、本酵素の精製と詳細な分析までは至っておらず、今後の検討が必要である。

第3章では、ゲンチオビオースの新規の生産方法として、熱水処理した *Aureobasidium pullulans* 培養液から得た水溶性  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを利用してゲンチオビオースの生産検討を行った。これまでの工業生産法は、糸状菌の  $\beta$ -グルコシダーゼが触媒するグルコース転移反応や縮合反応を利用したものである。本論文では、*A. pullulans* 培養液から得た水溶性  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンが、 $\beta$ 1,6-分岐を多く持つことを活かして、キタラーゼを用いた加水分解によるゲンチオビオース生産を試みた。最適条件における水熱処理 *A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの加水分解とゲンチオビオース生産において、最大収率 40% が得られ、この値は、組換え *Thermus caldophilus*、*Penicillium multicolor*、*Rhizomucor miehei* の  $\beta$ -グルコシダーゼを用いたときの値よりも高かった。*A. pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンを用いた場合に Gen/Glc 値が高いのは、その高い分岐度によるものと考えられた。

加水分解法によるゲンチオビオース生産の特徴は、二糖を含め三糖、四糖などのオリゴ糖を同時に生産してしまう転移反応や縮合反応と異なり、二糖のゲンチオビオースと単糖のグルコースのみを生産することが可能なことである。工業的に純粋な糖を生産する場合、分離工程が高いハードルとなることがしばしば起こる。しかし、本加水分解法によるゲンチオビオース生産は、HPLC 結果からもわかる

ように、クロマト分離を行う際に近いリテンションタイムを持つ物質がないことは、非常に有用性の高い生産方法であると考えられる。ゲンチオビオースの工業的生産のための本手法のスケールアップと分離・生成条件の最適化は、今後検討したい。

本研究により、機能性オリゴ糖のより効率的な生産方法を見出すことができ、そして健康志向の需要に大いに貢献できることを期待する。

## 参考論文

[1] Production of functional inulin-type fructoorigosaccharides by an enzyme from *Penicillium citrinum*, Yoshiya Tashiro, Hideo Ueno, Masakazu Takaba and Sachio Hayashi, *Current Microbiology*, 74, 9, 1114-1117 (2017)

[2] Production of gentiobiose from hydrothermally treated *Aureobasidium pullulans*  $\beta$ -1,3-1,6-glucan, Katsuki Hirabayashi, Yoshiya Tashiro, Nobuhiro Kondo and Sachio Hayashi, *Journal of Applied Glycoscience*, 64, 33-37 (2017)

## 謝 辞

本研究を進めるにあたって、多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました宮崎大学の林幸男名誉教授に深く感謝いたします。先生には、博士課程在籍中のみならず学士、修士課程の研究から本当に長きにわたり、丁寧かつ熱心なご指導を頂きました。重ねて厚く御礼申し上げます。また、貴重なお時間を割いていただき、本論文作成にご助言、ご指導を賜りました宮崎大学工学部の湯井敏文教授、横井春比古教授、廣瀬遵准教授および松本仁准教授、宮崎大学農学部の吉田照豊教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり大変ご協力いただきました伊藤忠製糖株式会社の葉山彰会長、平林克樹氏、近藤修啓氏および日本オリゴ株式会社の藤井孝一取締役社長、上野秀雄氏、高羽優算氏に、深く感謝申し上げます。

さらには、社会人学生として入学を許可して頂きました WDB 株式会社エウレカ社の大塚美樹社長、小原万美取締役役員に深く感謝申し上げます。

最後に研究生活を長い間、献身的に支えてくれた家族に心から感謝いたします。