アルカリ異性化を用いた希少糖含有シロップの製造方法 および α -グルコシダーゼの阻害作用

(2014年10月21日受付；2014年12月25日採択)

高峰 啓^{1,*}, 中村雅子¹, 飯田哲郎¹, 大隈一裕¹, 何森 健²

¹ 松谷化学工業株式会社研究所 (664-8508 兵庫県伊丹市北伊丹 5-3)

² 香川大学希少糖研究センター (761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393)

Manufacturing Method of Rare Sugar Syrup through Alkali Isomerization and its Inhibitory Effect of α -Glucosidase

Satoshi Takamine,^{1,*} Masako Nakamura,¹ Tetsuo Iida,¹ Kazuhiro Okuma¹ and Ken Izumori²

¹Research and Development, Matsutani Chemical Industry Co., Ltd. (5-3 Kita-Itami, Itami, Hyogo 664-8508, Japan)

²Rare Sugar Research Center, Kagawa University (2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan)

要旨：アルロースやアロース等の希少糖には、現代社会において問題視されるメタボリックシンドロームを予防する効果があることが報告されている。また、過去にはフルクトースのアルカリ異性化によりこれら希少糖を生産できる可能性が示唆されている。本研究では、ブドウ糖果糖液糖のアルカリ異性化によるこれら希少糖を含むシロップの効率的製造法を検討し、また実際に製造したシロップの希少糖含量の測定、これら希少糖の α -グルコシダーゼに対する阻害作用を解析した。アルカリ異性化の方法は、3種のアルカリ触媒と、基質を変えた際の希少糖生成量を調べた。希少糖含量は HPLC を用いて定量し、 α -グルコシダーゼ阻害作用は、スクラーゼ活性に対する阻害作用を調べた。その結果、ブドウ糖果糖液糖を水酸化ナトリウムと強塩基性イオン交換樹脂で異性化する生産方法を確立した。この希少糖を含むシロップ中には、アルロース 5.4 g/100 g, ソルボース 5.3 g/100 g, タガトース 2.0 g/100 g, アロース 1.4 g/100 g, マンノース 4.3 g/100 g が含まれていた。これら機能性単糖のスクラーゼ活性に対する阻害様式は不拮抗型であった。

キーワード：希少糖, アルカリ異性化, 血糖値, スクラーゼ, アルロース**

近年、先進国だけでなく発展途上国においても、ライフスタイルの変化に伴い肥満の割合が増加している。世界の成人人口のうち 10% 以上が肥満であると言われ、小児にも広がりを見せている。肥満は、糖尿病、高血圧症、脂質異常症、動脈硬化など生活習慣病と密接な関係にあり、死亡のリスクに繋がることが指摘されている¹⁾。特に内臓脂肪型肥満を上流にして、耐糖能異常、高脂血症、高血圧などが一個人に集積するマルチプルリスクファクター症候群はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化が要因となる心臓病、脳卒中などの死因に結び付く。その問題は年々深刻化しており、対応に追われている国も少なくない。したがって、このメタボリックシンドロームを予防、特に内臓脂肪を低減する食品開発が急務であり、制度面でも例えば特定保健用食品や 2015 年から施行予定の新機能性表示制度が注目を集めている。一方で食生活において、

糖質の過剰摂取が肥満の原因の 1 つとする報告も多く、特に砂糖や異性化糖を含む食品が疑われていることから、これらを多く含む食品を課税対象とする国もある。また、高甘味度甘味料に関しても糖尿病のリスクが増加することが報告され²⁾、甘味料と食欲、代謝内分泌の関係がクローズアップされつつあり、より体に良い甘味料の開発が望まれている。

糖質は、細胞の構成成分や生命活動のエネルギー源など様々な役割を担っており、自然界に広く分布している。単糖レベルでみると、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノースなどが自然界に多量に存在する。一方、これに対して存在量が少ない糖は希少糖と呼ばれ、種類は非常に多く、50 種類以上あることがわかっている。この希少糖の中に、様々な生理活性を有するものの存在が最近の研究で明らかになっている。D-フルクトースの C3 エピマーで

* 連絡先 (Tel. 072-771-2032, Fax. 072-771-2023, E-mail: satoshi-takamine@matsutani.co.jp)

** Key words: rare sugar, alkali isomerization, blood glucose level, sucrase, allulose

注記：The International Society of Rare Sugars 2014 において、過去の命名経緯をレビューし、アルドースのアロース、糖アルコールのアルトロースに対応して、ケトースのプシコースはアルロースと呼称することが望ましいと決められた。本論文においてもアルロースと表記する。

ある D-アルロース (プシコース) は、希少糖の 1 種であり、食後血糖上昇抑制作用³⁾や脂肪蓄積抑制作用⁴⁾などが確認されており、メタボリックシンドロームを予防する甘味料として期待されている。また、D-アロースは、抗酸化作用⁵⁾や癌細胞増殖抑制作用⁶⁾などのアンチエイジングの予防効果が確認されている。D-タガトースには血清脂質の改善作用が⁷⁾、D-ソルボースには、 α -グルコシダーゼ阻害作用が報告されている⁸⁾。なお、希少糖ではないが D-マンノースは尿路感染予防にも役立つ糖であり⁹⁾、米国では既にサプリメントとして定着している。これら機能性を持つ糖を以下“機能性単糖”と呼ぶこととする。

これら機能性単糖の持つ生理活性は、世界で拡大しつつある肥満や糖尿病などの生活習慣病に対して有効であると考えられ、次世代の機能性甘味料として注目されている。

希少糖の製造は、D-グルコースや D-フルクトースを基質として、酵素を用いて異性化する方法が知られている¹⁰⁾。酵素による異性化の場合、副反応が少なく、目的の希少糖を高純度で得られることが利点であるが、商業化へは安全な酵素の低価格化が課題になっている。酵素以外の異性化として、Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein の反応を利用する方法が最も有名であり、これまで数多くの研究が行われている¹¹⁻¹³⁾。この反応はアルカリ溶液中における糖の異性化反応であり、過去には、食品総合研究所の貝沼らにより、果糖製造開発時にブドウ糖の異性化反応として試みられた。その後、より副生成物の少ないイソメラーゼの開発が進み、アルカリ異性化法の研究は少なくなった。しかしながら、アルカリ異性化研究の途上、上記効果を持つ D-アルロースなどの機能性単糖が生成されることも示されていた¹¹⁾。このことから、内臓脂肪を低減し、メタボリックシンドロームを予防する効果を持つ甘味料開発にアルカリ異性化法が利用できる可能性が考えられた。

本研究は、アルカリ異性化を用いて、メタボリックシンドロームを予防する効果を持つ希少糖を含む甘味料 (希少糖含有シロップ) を製造することを目的とし、その糖組成および α -グルコシダーゼ阻害作用についても検討を行った。 α -グルコシダーゼ阻害作用を持つ食品素材は、食後血糖値の上昇抑制作用に寄与し、糖代謝を改善する可能性が有る。例えば、特定保健用食品にも認可されている単糖素材である L-アラビノースでこのことが報告されている¹⁴⁾。本検討においても希少糖含有シロップに含まれる機能性単糖の本阻害効果を調べ、希少糖含有シロップの上部消化管における糖代謝に対する影響を考察した。

1. 材料と方法

1) アルカリ異性化反応

(1) 試薬

アルカリ異性化反応の基質として、特級グレードの D-グルコースと D-フルクトース (和光純薬工業(株); 大阪)、およびブドウ糖果糖液糖 (日本食品化工(株); 東京) を用いた。

アルカリ剤として、水酸化ナトリウム (キシダ化学(株); 大阪)、アルカリ剤の強塩基性イオン交換樹脂としてアンバーライト IRA900JCI (オルガノ(株); 東京) を用いた。

(2) 反応条件の検討

強塩基性イオン交換樹脂は、カラムに充填後、樹脂量に対して 5 倍量の 5% 水酸化ナトリウム溶液、10 倍量の蒸留水を順に通液し、試験に供した。また、水酸化ナトリウム濃度、基質濃度、反応温度、樹脂量など諸条件を予備試験によって決定し、以下の条件で本検討を行った。

10% の基質溶液を 60°C 保温のジャケット付カラム (長さ 30 cm × 内径 1.5 cm) に流速 1.6 mL/min で通液した。アルカリ剤の使用条件として、以下に示す 3 つの方法を検討した。

- ① 最終濃度が 0.1 M となるように水酸化ナトリウムを基質溶液に添加。
- ② カラムに強塩基性イオン交換樹脂 45 mL を充填。
- ③ ①, ②の 2 条件を併用。

また、基質としては、D-グルコースと D-フルクトース、およびブドウ糖果糖液糖の 3 つに関して検討を行った。通液後の液を 50 mL ずつ分画し、強酸性および弱塩基性イオン交換樹脂 (オルガノ(株)製アンバーライト 200 CT および IRA67) を充填したカラムに通液することで中和した。

(3) 反応液中の糖組成の分析

反応の程度を確認するため、反応液中の糖組成の内、グルコース、フルクトース、アルロースを分析した。中和した反応液の糖組成は HPLC によって分析した。分析条件は分析カラムとして MCI GEL CK08EC (三菱化学(株); 東京)、移動相として蒸留水、カラム温度 80°C、流速 0.4 mL/min、注入量 10 μ L とした。検出には示差屈折計 (RI-8020, 東ソー(株); 東京) を用い、クロマトグラムのピーク面積比を組成比として算出した。

2) 希少糖含有シロップに含まれる機能性単糖の分析

(1) 希少糖含有シロップの調製

ブドウ糖果糖液糖を基質とし、前記 (2)~③の反応条件により 19 ロットを調製した。

(2) 機能性単糖の定量

標準物質として、市販のアルロース、ソルボース、アロース、タガトース (株)希少糖生産技術研究所; 香川)、マンノース (ナカライテスク(株); 京都)、ソルビトール (SIGMA 社; 東京) を用いた。

移動相として、アセトニトリル (キシダ化学(株)), HPLC 用グレードのリン酸 (ナカライテスク(株)) を用いた。

アルロース、ソルボースの定量方法として、HPLC 分析の内部標準法を用いた。試料 1 g に内部標準物質として 0.5% のソルビトール溶液 10 mL を添加し、蒸留水を加えて 20 mL に定容し、メンブレンフィルター (13CP020AN, アドバンテック東洋(株); 東京) に通したものを分析検体とした。分析条件は、分析カラムとして Shodex SUGAR SP 0810 (昭和電工(株); 東京)、移動相として蒸留水、カラム

温度 50°C, 流速 0.4 mL/min, 注入量 10 μ L とした。検出には示差屈折計 (RID-10A, (株)島津製作所; 京都) を用いた。

アロース, タガトース, マンノースの定量方法として, HPLC 分析の外部標準法を用いた。試料 300 mg に後記の移動相を加えて 20 mL に定容し, メンブレンフィルター (13HP045AN, アドバンテック東洋(株)) に通したものを分析検体とした。分析条件は, 分析カラムとして Asahipak NH2P-40 3E (昭和電工(株)), 移動相としてアセトニトリル:リン酸:蒸留水 = 78.0:0.5:21.5, カラム温度 50°C, 流速 0.2 mL/min, 注入量 30 μ L とした。検出には示差屈折計 (RID-10A) を用いた。

結果には, 試料における各糖の濃度を, 試料の固形分当りの濃度に換算して表した。試料の固形分は Brix と同等とし, デジタル屈折計 (RX-5000, (株)アタゴ; 東京) によって試料の Brix を 5 回測定し, 平均値を濃度計算に用いた。

3) α -グルコシダーゼ阻害作用の評価

(1) 実験材料の調製

市販のラット小腸アセトンパウダー (SIGMA) を 4.8 g/60 mL の濃度で 0.1 M マレイン酸バッファー (pH 6.0) に懸濁してホモジナイズした後, 遠心分離した上清を粗酵素液とした。基質として, スクロース (キシダ化学(株)) を同バッファーに溶解し, 500 mM (17.1%) および 100 mM (3.42%) に調製した。試料として, アルロース, ソルボース, タガトース, アロース, マンノースを, 希少糖含有シロップ固形分当りの含有量比 (表 2) になるように秤量後, 同バッファーに溶解し, 102 mM (1.84%) の機能性単糖溶液を調製した。前記の機能性単糖溶液のモル濃度は, グルコース溶液と同様に 1 M = 180.16 g/L として計算した。

(2) スクララーゼ活性に対する阻害作用の評価

200 μ L の粗酵素液, 500 mM のスクロース溶液, 機能性単糖溶液, 0.1 M マレイン酸バッファーを用いて, スクロースおよび機能性単糖の最終濃度が表 3 となるように反応液を調製し, 全量を 1.2 mL とした。37°C で反応を開始し, 開始後 0.5, 10, 20, 30 分に反応液 200 μ L を採取して 50 μ L の 0.5 M 過塩素酸と混合して反応を停止し, グルコース CII テストワコー (和光純薬工業(株)) を用いて遊離グルコース量を測定した。各反応での遊離グルコース量の経時変化から 1 分当りのグルコース生成速度を求め, 下記の式によりスクラーゼ活性を算出した。

$$\text{スクラーゼ活性 (\%)} = 100 \times \text{① or ②} / \text{③}$$

① 機能性単糖を含まない反応系のグルコース生成速度

② 機能性単糖を含む反応系のグルコース生成速度

(3) スクララーゼに対する阻害様式の検討

200 μ L の粗酵素液, 100 mM のスクロース溶液, 機能性単糖溶液, 同バッファーを用いて, 基質濃度が 10, 20, 30, 50 mM, 機能性単糖の濃度が 0, 10, 20 mM となるように反応液を調製し, 全量を 1.2 mL とした。37°C で反応を開始し, 開始後 0.5, 10, 20, 30 分に反応液 200 μ L を

採取して 50 μ L の 0.5 M 過塩素酸と混合して反応を停止し, グルコース CII テストワコーを用いて遊離グルコース量を測定した。各反応での遊離グルコース量の経時変化から, 1 分当りのグルコース生成速度を初速度とし, Lineweaver-Burk プロットにより阻害様式を求めた。

2. 結果と考察

1) 希少糖含有シロップの製造法

(1) アルカリ異性化法の検討

アルカリ異性化の触媒としては, 水酸化ナトリウム, 強塩基性イオン交換樹脂, その併用などが考えられる。予備試験において, 水酸化物イオン供給源として水酸化カリウムと水酸化ナトリウムを用いると, ほぼ同様な結果が得られた。二価の水酸化物イオン供給源である水酸化カルシウムを用いると, 得られた組成物は副生成物が多く認められた。Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein 反応においては, フルクトースからアルロースができることから, 初めに検討する基質としてはフルクトースを選び, 異性化触媒としては水酸化ナトリウム, 強塩基性イオン交換樹脂, またその併用による結果を比較検討した。

フルクトースを基質として用い, アルカリ剤として水酸化ナトリウム, 強塩基性イオン交換樹脂, およびこれらを併用しアルカリ異性化を行った場合のアルロース生成量を図 1 に示した。水酸化ナトリウムのみを使用した場合, 通液量が増加するとともに, アルロースの生成量は増加し, 最終的に 5~6% まで上昇した。強塩基性イオン交換樹脂のみを使用した場合, アルロースの生成量は, 通液初期では 8% と高いが, 通液量の増加に従い徐々に減少した。水酸化ナトリウムと強塩基性イオン交換樹脂を併用した場合, アルロースの生成量は 8~9% と高く, 通液量の増加に伴い生成量が減少することはなかった。単糖のアルカリ異性化の場合, アルロース生成量と糖の分解によって生じた有機酸の生成量には正の相関があることが報告されているが¹³⁾, 本検討における強塩基性イオン交換樹脂のみの異

図 1. D-フルクトースのアルカリ異性化反応によって生じるアルロース量

■, 0.1 M NaOH; △, IRA900J; ●, 0.1 M NaOH + IRA 900 J のアルカリ溶剤を使用し, 10% D-フルクトース溶液を流速 1.6 mL/min で, 60°C に保温したカラムに通液した。アルロース量は, ピーク面積比として算出した。

性化反応では、通液初期のアルロース生成量に比べて有機酸の溶出が少なく、その溶出量にほとんど変化はみられなかった。強酸性イオン交換樹脂に通液することによる中和後の pH は、それぞれ 2.9 ± 0.3 (水酸化ナトリウムのみ)、 4.6 ± 0.1 (樹脂のみ)、 2.3 ± 0.1 (水酸化ナトリウムと樹脂の併用) であり、樹脂のみでは反応中に生成した有機酸が樹脂に吸着する分、反応液の pH が上昇していることが推察される。したがって、強塩基性イオン交換樹脂のみの場合、有機酸と強塩基性イオン交換樹脂とのイオン交換反応が原因で、触媒として働く OH 基が減少し、アルロースの生成量が低下するが、水酸化ナトリウムを添加することで、OH 基が補給されるため、反応効率が維持されると推察された。

高い触媒作用を持つ強塩基性イオン交換樹脂と、その反応効率を維持する水酸化ナトリウムを併用する方法が、アルカリ異性化法によって希少糖を製造する上で有効な手段であると考えられた。

(2) 基質の検討

アルカリ異性化の反応速度は、基質とする単糖の種類によって異なることが報告されている¹⁹⁾。そこで、基質に用いる単糖が、生成する糖質の組成に及ぼす影響を調べるため、強塩基性イオン交換樹脂と水酸化ナトリウムを併用する方法で、グルコース、フルクトース、ブドウ糖果糖液糖をそれぞれ基質として異性化反応を行った。カラム内を糖液で平衡化した時点における反応液のグルコース、フルクトース、アルロース組成比を表 1 に示す。全ての基質において、反応液の主成分はグルコースとフルクトースであり、これらの量は糖質全体の 7~8 割を占めた。反応液のグルコースとフルクトースの比率は基質の糖組成と関係しており、基質に含まれるフルクトース含有量が多いほど、アルロースの生成量も増加が認められた。各原料に対するアルロースの生成量 (ピーク面積比を組成比として算出) を Bonferroni の補正を用いた多重検定法 (SPSS ver. 13 使用) で検定し、アルロース生成量に関して各原料間においていずれも $P < 0.05$ で有意差が認められた。山田らの報告を参照すると、ブドウ糖果糖液糖に対して、4% 以上のアルロースが含まれていれば、内臓脂肪の低減効果が認められる結果が得られている¹⁹⁾。本検討では、どの基質を用いた際にも内臓脂肪を低減する濃度のアルロースを含むという条件は満たすことが出来る。実生産には、流通してい

る価格 (ブドウ糖, 150~180 円/kg; 果糖, 220~280 円/kg; 異性化糖, 90~380 円/kg) や流通の際の取り扱い易さなどを考慮して原料を選定する¹⁹⁾。ロープライスゾーンでのブドウ糖果糖液糖を基質として用いた場合、最もアルロース生成量 1 kg 辺りの価格が安いことが示されている。そこで、ブドウ糖果糖液糖を原料としてアルカリ異性化したものを希少糖含有シロップとし、以下に示す試験に供した。

2) 希少糖含有シロップ中の機能性単糖の定量分析

糖は一般的にアルカリ性にすることによって、様々な糖に異性化することが知られ、HPLC を用いて 1 つの分析カラムで同時に分析することは困難である。

MCI GEL CK08EC (以下 CK08EC) は、アルロースの分析には適するが、その他の機能性単糖 (ソルボースとマンノース, タガトースとアロース) は検出時間が非常に近く、単独ピークとして得られなかった。

本項では、Shodex SUGAR SP0810 (以下 SP0810) と Asahipak NH2P-40 3E (以下 NH2P-40) の 2 つのカラムを用いて諸条件を検討し、希少糖含有シロップ中の機能性単糖の定量を試みた。3 種のカラムのクロマトグラムを図 2 に示す。CK08EC では、マンノースとソルボース, タガトースとアロースのピークの重なりが認められた。一方、SP0810 では、アルロースとソルボースが、NH2P-40 では、アルロース, タガトース, アロース, マンノースのピークが定量可能な範囲で分離していることが認められた。これらの結果から、前項で調製した希少糖含有シロップ 19 ロット分の各機能性単糖を、アルロースおよびソルボースは SP0810, アロース, タガトース, マンノースは NH2P-40 を用いて定量し、これらの平均値, 標準偏差 (σ), 平均値 $\pm 3\sigma$ による本検討条件における母集団の 99.7% が存在する範囲を求めた (表 2)。その結果、希少糖含有シロップに存在する 5 種類の機能性単糖のそれぞれの含有量は、固形分当り換算でアルロース 5.4 g/100 g, ソルボース 5.3 g/100 g, タガトース 2.0 g/100 g, アロース 1.4 g/100 g, マンノース 4.3 g/100 g であった。また、本検討条件で製造した希少糖含有シロップは、希少糖で 13~15%, 機能性単糖として 17~20% 含むことが示された。

一方、希少糖含有シロップにはクロマトグラムのピーク面積比で 4% 程度のオリゴ糖が認められたが、これらの主成分はブドウ糖果糖液糖と同様にマルトース, イソマルトース, マルチュロースであることが報告されている^{17),18)}。

3) α -グルコシダーゼ阻害作用

希少糖含有シロップは、抗肥満効果を持つことが報告されている¹⁹⁾。このことは、シロップに含まれる希少糖が、糖や脂質代謝を異化の方向に、もしくは排泄促進することを示唆する。アルロースが脂肪燃焼を促進することや²⁰⁾, α -グルコシダーゼ活性を阻害すること^{21),22)}は報告されているが、希少糖含有シロップ中の機能性単糖の α -グルコシダーゼ活性に対する阻害作用はこれまで検討されてい

表 1. 各単糖を出発原料とするアルカリ異性化後の主な糖組成

原 料	グルコース (%)	フルクトース (%)	アルロース (%)
D-グルコース	48.1 ± 1.8^a	32.0 ± 0.3^a	5.6 ± 0.2^a
D-フルクトース	29.0 ± 0.2^b	41.0 ± 0.3^b	8.8 ± 0.1^b
ブドウ糖果糖液糖	41.1 ± 1.4^c	32.3 ± 0.3^a	6.3 ± 0.2^c

ピーク面積比を組成比として算出し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示す ($N = 8$)。各原料間における有意差を Bonferroni の補正を用いた多重検定法にて検定。異なるアルファベット間で有意差あり ($P < 0.05$)。

図2. 希少糖含有シロップに含まれる機能性単糖のHPLC分析条件の比較

分析カラムとして (a) CK08EC, (b) SP0810, (c) NH2P-40 を用いて希少糖含有シロップをHPLCにて分析した。h, n, p, アルロース; j, ソルボース; q, タガトース; s, アロース; t, マンノース; e, ソルボース + マンノース; g, m, タガトース + アロース; k, 未知物質 + マンノース; r, フルクトース + ソルボース; d, i, u, グルコース; f, l, フルクトース; o, ソルビトール (内部標準物質)。

表2. 希少糖含有シロップ中の希少糖および機能性単糖の含有量

	平均値 ± σ (g/100 g)	存在範囲 (g/100 g)
アルロース	5.4 ± 0.1	5.1~5.7
ソルボース	5.3 ± 0.2	4.7~5.8
タガトース	2.0 ± 0.1	1.8~2.3
アロース	1.4 ± 0.1	1.1~1.8
マンノース	4.3 ± 0.1	3.9~4.7
希少糖合計値	14.1 ± 0.4	12.9~15.3
機能性単糖合計値	18.4 ± 0.5	16.9~19.9

g/100 g は製品固形分当り, σ は標準偏差を示す。存在範囲は, 母集団の 99.7% が存在する平均値 ± 3σ の範囲を示す。

い。本実験では, 希少糖含有シロップ中の機能性単糖のスクラーゼ活性に対する阻害作用を調べることににより, 糖代謝における影響を考察した。

まず, 前項で定量した組成になるよう機能性単糖を混合

表3. スクラーゼ活性に対する抑制作用の評価実験における基質および機能性単糖の濃度

希少糖含有 シロップ (固形分 換算)	重量比 : スクロース	% (mM)		
		希少糖 含有 シロップ	機能性単糖	スクロース
0 : 10		0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	3.42 (100)
2 : 8		0.86 (47.5)	0.16 (8.74)	3.42 (100)
3 : 7		1.47 (81.4)	0.27 (15.0)	3.42 (100)
4 : 6		2.28 (127)	0.42 (23.3)	3.42 (100)
5 : 5		3.42 (190)	0.63 (35.0)	3.42 (100)

%は質量パーセント濃度, (mM) はモル濃度を示す。希少糖含有シロップに含まれる機能性単糖が 18.4% として計算した。

図3. 希少糖含有シロップによるスクラーゼ活性の抑制作用

ラット小腸粗酵素液と, 機能性単糖とスクロースを表3の濃度で反応させ, 1分当りのグルコース生成速度を測定した。スクラーゼ活性 (%) は, 機能性単糖を含まない反応系のグルコース生成速度を 100% として算出した。

し (表3参照), 機能性単糖溶液を調製後, 本実験に用いることでスクラーゼ活性に対する阻害作用について評価した。

その結果, 重量比で希少糖含有シロップ (固形分換算): スクロース = 0 : 10 になるように機能性単糖溶液を添加したときのスクラーゼ活性を 100% とすると, 希少糖含有シロップ (固形分換算): スクロース = 2 : 8 のときのスクラーゼ活性は 47%, 5 : 5 のときは 23% であった (図3)。

また, 希少糖含有シロップ中の機能性単糖のスクラーゼに対する阻害様式を評価した結果, Lineweaver-Burk プロットから不拮抗型の阻害様式であり (図4), 見かけの阻害定数 $K_i = 8.3 \text{ mM}$ であることが明らかになった。不拮抗型の場合, 阻害剤は酵素-基質複合体に結合して反応を阻害することから, 希少糖含有シロップ中の機能性単糖は, 高スクロース濃度下で, 酵素-基質複合体の濃度が高くなるほど, スクラーゼ活性を阻害する効果が高くなると推測された。このことから, 希少糖含有シロップは, 多量の砂糖 (菓子類・清涼飲料など) と共に摂取した際に, より効果的に砂糖の分解を抑制する可能性があると考えられた。

実際の小腸内では, 希少糖は比較的遅いながらも吸収されることが示されている²³⁾ことから, 吸収も含めた腸管モデルを用いるなど更なる検討が必要である。

図4. Lineweaver-Burk プロットによる希少糖含有シロップのスクラーゼに対する阻害様式

s はスクロース濃度 (mM), v は1分当りのグルコース生成速度 (mg/dL/min) を示す。●, 機能性単糖なし; ■, 機能性単糖 10 mM; ▲, 機能性単糖 20 mM。

3. 要 約

希少糖含有シロップの製造法を検討し, 10% ブドウ糖果糖液糖を基質溶液とし, 最終濃度が0.1 M 水酸化ナトリウム, 温度 60°C, 単位時間当り樹脂量の2倍となる流量で塩塩基性イオン交換樹脂に通液させる条件を確立した。その場合, 固形分当りアルロース 5.4 g/100 g, ソルボース 5.3 g/100 g, タガトース 2.0 g/100 g, アロース 1.4 g/100 g, マンノース 4.3 g/100 g の機能性単糖を含むことを明らかにした。この希少糖含有シロップ中の機能性単糖はスクラーゼ活性の阻害作用があり, 不拮抗型の阻害様式を示した。ここで明らかにした α -グルコシダーゼ阻害作用は実際に人では食後血糖値上昇抑制に関わっていることが考えられ, その詳細なメカニズム解明も期待される。

謝辞

本研究の一部は, 地域イノベーション創出研究開発事業 (経済産業省) の支援のもと行われました。本論文を作成するに当たり, 多大なご助言を頂きましたレアスウィート社の近藤社長や松谷化学工業株式会社の西端研究員, 上原研究員, 田代研究員に感謝致します。

文献

- World Health Organization: *Obesity and Overweight*, Fact sheet N 311 (2014).
- J. Suez, T. Korem, D. Zeevi, G. Zilberman-Schapira, C.A. Thaiss, O. Maza, D. Israeli, N. Zmora, S. Gilad, A. Weinberger, Y. Kuperman, A. Harmelin, I. Kolodkin-Gal, H. Shapiro, Z. Halpern, E. Segal and E. Elinav: Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, **514**, 181–186 (2014).
- N. Hayashi, T. Iida, T. Yamada, K. Okuma, I. Takehara, T. Yamamoto, K. Yamada and M. Tokuda: Study on the postprandial blood glucose suppression effect of D-psicose in borderline diabetes and the safety of long-term ingestion by normal human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 510–519 (2010).
- M. Ochiai, Y. Nakanishi, T. Yamada, T. Iida and T. Matsuo: Inhibition by dietary D-psicose of body fat accumulation in adult rats fed a high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1123–1126 (2013).
- A. Murata, K. Sekiya, Y. Watanabe, F. Yamaguchi, N. Hatano, K. Izumori and M. Tokuda: A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 89–91 (2003).
- L. Sui, Y. Dong, Y. Watanabe, F. Yamaguchi, N. Hatano, K. Izumori and M. Tokuda: Growth inhibitory effect of D-allose on human ovarian carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer Res.*, **25**, 2639–2644 (2005).
- T. Donner, L. Magder and K. Zarbalian: Dietary supplementation with D-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol. *Nutr. Res.*, **30**, 801–806 (2010).
- T. Oku, Y. Murata-Takenoshita, Y. Yamazaki, F. Shimura and S. Nakamura: D-Sorbose inhibits disaccharidase activity and demonstrates suppressive action on postprandial blood levels of glucose and insulin in the rat. *Nutr. Res.*, **34**, 961–967 (2014).
- 豊田精一, 福士泰夫, 加藤慎之介, 折笠精一, 鈴木康義: 尿中マンノースの感染防御における役割. *日泌尿会誌*, **80**, 1816–1823 (1989).
- K. Izumori: Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses. *J. Biotechnol.*, **124**, 717–722 (2006).
- J.C. Spec: The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **13**, 63–103 (1958).
- S.J. Angyal: The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation and related reactions. *Topics. Curr. Chem.*, **215**, 1–14 (2001).
- J.M. de Bruijn, A.P.G. Kieboom and H. van Bakkum: Alkaline degradation of monosaccharides V: Kinetics of the alkaline isomerization and degradation of monosaccharides. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **106**, 35–43 (1987).
- K. Seri, K. Sanai, N. Matsuo, K. Kawakubo, C. Xue and S. Inoue: L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrose in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism*, **45**, 1368–1374 (1996).
- 山田貴子, 飯田哲郎, 林 範子, 大賀浩史, 大隈一裕, 何森 健: 異性化糖食で飼育したラットの体脂肪蓄積に対する D-ブシコースの作用. *食料工誌*, **57**, 263–267 (2010).
- 総合企画センター大阪: 食品添加物関の市場分析調査, **53** (2014).
- S. Osaki and Z. Yoshino: Analysis Method of Maltulose in High-fructose syrup. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 210–215 (1982).
- N. Hayashi, T. Yamada, S. Takamine, T. Iida, K. Okuma and M. Tokuda: Weight reducing effect and safety evaluation of rare sugar syrup by a randomized double-blind, parallel-group study in human. *J. Funct. Foods*, **11**, 152–159 (2014).
- T. Iida, T. Yamada, N. Hayashi, K. Okuma, K. Izumori, R. Ishii and T. Matsuo: Reduction of abdominal fat accumulation in rats by 8-week ingestion of a newly developed sweetener made from high fructose corn syrup. *Food Chem.*, **138**, 781–785 (2013).
- M. Ochiai, K. Onishi, T. Yamada, T. Iida and T. Matsuo: D-psicose increases energy expenditure and decreases body fat accumulation in rats fed a high-sucrose diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **65**, 245–250 (2014).
- 松尾達博, 何森 健: D-ブシコースは小腸 α -グリコシダーゼを阻害し, ラットにおける炭水化物摂取後の血糖値上昇反応を抑制する. 香川大学農学部学術報告, **58**, 27–32 (2006).
- 中井瑤絵, 高柳恵理, 田島香里, 福嶋典子, 山田和彦: ラット小腸粘膜吸収上皮細胞刷毛縁膜スクラーゼならびにイソマルターゼに対する D-ブシコースの活性阻害様式. 第17回日本食物繊維学会学術集会講演要旨, 74–75 (2012).
- T. Hishiike, M. Ogawa, S. Hayakawa, D. Nakajima, S. O'Charoen, H. Ooshima and Y. Sun: Transepithelial transports of rare sugar D-psicose in Human Intestine. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 7381–7386 (2013).