Studies on Industrial Oxidizing Methods for Producing Oligoaldonic Acid Including Lactobionic Acid*

ラクトビオン酸生産法をはじめとする工業化を目指したオリゴ糖酸化技術の開発研究*

(2016 年 1 月 21 日受付；2016 年 2 月 18 日採択)

桐生高明^{1,*}, 木曾太郎¹, 駒 大輔¹, 田中重光¹,
中野博文¹, 村上 洋¹

(きりゅう たかあき, きそ たろう, こま だいすけ, たなか しげみつ,
なかの ひろふみ, むらかみ ひろみ)

Takaaki Kiryu,^{1,*} Taro Kiso,¹ Daisuke Koma,¹ Shigemitsu Tanaka,¹
Hirofumi Nakano¹ and Hiromi Murakami¹

¹ 地方独立行政法人大阪市立工業研究所
536-8553 大阪市城東区森之宮 1-6-50

¹ Osaka Municipal Technical Research Institute
1-6-50 Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536-8553, Japan

要旨：アルドースの還元末端を酸化するとアルドン酸が生成する。オリゴ糖の場合も同様で、アルドースを還元末端にもつオリゴ糖を酸化すると、オリゴ糖アルドン酸が生成する。ラクトビオン酸をはじめとするオリゴ糖アルドン酸はカルシウム吸収促進や更年期予防効果の知られるエクオール¹の産生を促進するなどの機能が知られることから、その工業的な生産法の開発が望まれている。筆者らは微生物菌株、子囊菌の分泌酵素などを用いるオリゴ糖アルドン酸の生産法について研究を行ってきた。本稿では筆者らが企業と共同研究で実用化した、酢酸菌休止菌体を用いたラクトビオン酸の生産法を中心にオリゴ糖を酸化しオリゴ糖アルドン酸を生産する手法について工業化を目指した研究を紹介する。

キーワード：ラクトビオン酸, 酢酸菌, グルコースデヒドロゲナーゼ, オリゴ糖アルドン酸, 酸化反応***

1. はじめに

(地独) 大阪市立工業研究所では、主に微生物や酵素を用いる糖質の生産や改変について研究を行い、その成果を世に送り出してきた。古くは福本壽一郎博士を中心に細菌、カビ由来アミラーゼを研究し、ブドウ糖生産の実用化(1959 年)に成功している。さらに、糖加水分解酵素の糖転移活性を利用し、岡田茂孝博士や北畑寿美雄博士がカップリングシュガーや「オリゴのおかげ」で知られるラクトスクロースの実用化に成功している。これらの糖加水分解反応や糖転移反応の技術に加え、筆者らの新たな技術として、オリゴ糖酸化反応の研究を行い、その成果として機能性食品素材ラクトビオン酸の実用化に成功した。本稿では当研究所で取り組んだオリゴ糖酸化反応の研究について紹

介する。

2. オリゴ糖アルドン酸とは

D-グルコース等のアルドースを酸化すると還元末端のアルデヒド基がカルボキシル基に変換され、D-グルコン酸等のアルドン酸が生成する。オリゴ糖でも同様で、アルドースを還元末端にもつオリゴ糖を酸化すると、還元末端にアルドン酸を有するオリゴ糖 (オリゴ糖アルドン酸) が生成する (図 1)。つまり、オリゴ糖アルドン酸はアルドン酸を還元末端にもち、非還元末端にアルドースが連なったオリゴ糖と言える。単糖のアルドン酸であるグルコン酸のラクトン (グルコノ- δ -ラクトン) は豆腐の凝固剤はじめ様々な用途に利用されている。一方、オリゴ糖アルドン酸

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成 27 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 06-6963-8071, Fax. 06-6963-8079, E-mail: kiryu@omtri.or.jp)

*** Key words: actobionic acid, acetic acid bacterium, glucose dehydrogenase, oligoaldonic acid, oxidation

略記: LacA, ラクトビオン酸; CDH, cellobiose dehydrogenase; COX, carbohydrate: acceptor oxidoreductase; m-GDH, 膜結合性 PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ; s-GDH, 可溶性 PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ

図1. ラクトース酸化による LacA 生産

図2. LacA などのオリゴ糖アルドン酸の機能性

表1. 各種有機酸カルシウム塩の水溶性

塩	溶解度 (g/100 mL)
CaCO ₃	0.0014
ピロリン酸 Ca	0.03
クエン酸 Ca	0.96
グルコン酸 Ca	3.8
乳酸 Ca	6.5
ラクトビオン酸 Ca	> 62

は、ほとんど利用されておらず、ラクトースの化学酸化により生成するラクトビオン酸 (LacA) が抗生物質のエリスロマイシンの溶解性を向上させる補助成分として使われるにとどまっていた¹⁾。しかし、単糖の酸化物であるアルドン酸にさらに糖が付与したオリゴ糖アルドン酸は単糖のアルドン酸にはなかった性質や機能が出ることは報告されていた (図2)。例えば、LacA は腸管でのカルシウム吸収を促進する効果や²⁾、ビフィズス菌の選択増殖活性を示す³⁾。また、筆者らが研究を進める間にも、LacA は更年期障害の緩和効果が期待されるエクオール⁴⁾の腸管内での生成促進や、歯の再石灰化促進効果などの機能性を示すことが報告されている⁴⁾。当研究室でも LacA のカルシウム塩が無味であり、添加する食品の味を損なわないことを確認しており、LacA の機能性食品への展開は十分期待できるものであった。

上記のエリスロマイシンの溶解性向上効果だけでなく、LacA には移植臓器の保存剤の成分など、食品用途以外に使用できることが知られている⁵⁾。また、一般に有機酸のカルシウム塩は溶解性が低いことが知られているが、LacA などのオリゴ糖アルドン酸は有機酸でありながら、非常に高い水溶性 (60% 以上のシロップが調製可能) のカルシウム塩を形成する (表1)⁶⁾。これは、最も汎用的な炭酸カルシウムの2万倍、よく溶ける有機酸カルシウム塩として知られる乳酸カルシウム (約5%の水溶性) の10倍以上の値である。このような、高溶解性カルシウム塩の形成という従来の有機酸にはなかった性質を活用した工業的利用用途が期待される。

3. 高いオリゴ糖酸化活性を示す株の検索とそれらによる LacA の生産

3.1 LacA 生産菌のスクリーニング

ラクトースなどのオリゴ糖を酸化し、アルドン酸を生成するには化学的手法と生物的手法が考えられる。化学的手法としては臭化水素酸によるラクトースの化学酸化法が知られている^{7,8)}。しかしながら、臭化水素酸を使用する方法は多量の副生成物を生成することなどから、国内向けの LacA 生産には使用されていない。また、詳細は以下に示すが、ラクトース酸化活性を示す微生物や酵素は報告があるものの、様々な理由により、それらを利用した LacA 生産は実用化していなかった。そこで筆者らの研究室では高いラクトース酸化活性を示す菌株をクリーニングした。

スクリーニングにあたっては、豊かな菌叢を有する土壌からのスクリーニングが有効である。一方、検索により出現する菌の種類が多岐にわたることから、取得した菌が食品生産に適しない菌であるケースが多い。ただ、LacA のカルシウム塩は極めて高い水溶性を示し、従来の有機酸とは異なった利用法が期待されることから LacA の工業的な利用も視野に、土壌からの LacA 生産菌のスクリーニングを行った。その結果、極めて高いラクトース酸化活性を有する *Burkholderia cepacia* の一菌株⁹⁾および子囊菌類の一種、*Paraconiothyrium* 属菌株を単離することができた¹⁰⁾。一方、食品用途の LacA 生産菌を取得するため、株式会社ダイセル (当時：ユニチカ株式会社生活健康事業部) と共同研究で筆者らの研究所の所有する食品発酵菌のライブラリー (主として発酵食品の主要発酵菌とその近縁種) から検索を行った。発酵菌のライブラリーの検索は菌種に限られるため、目的の活性を有する菌を取得できる確率は高くないものの、取得できる菌は食品生産に適していることが期待される。スクリーニングの結果、活性は低いが、酢酸菌がラクトース酸化活性を示すことがわかった¹¹⁾。また、我々は自家製ヨーグルトから、高いラクトース酸化活性を示す *Enterobacter* 属の菌株も取得した¹²⁾。

3.2 子囊菌および担子菌の分泌酵素を用いた LacA 生産法

カビやキノコには糖酸化酵素を分泌するものが知られている。*Aspergillus niger* 由来の glucose dehydrogenase は有名で、D-グルコースを原料とする工業的な D-グルコン酸生産に使用されているが¹³⁾、基質特異性が高く、オリゴ糖には作用しない。オリゴ糖を酸化する酵素としては木材腐朽菌などの cellobiose dehydrogenase (CDH) が知られている。CDH はセロオリゴ糖を酸化し、セロオリゴ糖アルド

ン酸を生産するだけでなく、ラクトースも効率的に酸化することが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。また、食用キノコであるマイタケ (*Grifola frondosa*) 由来の CDH も報告されていることから¹⁷⁾、CDH による食品用途向けの LacA 生産が期待された。しかし、CDH は酸化反応に際し、芳香族化合物などの電子受容体を要求するため、工業的な LacA 生産への活用は困難であると考えられる。酸化反応は還元反応と表裏一体で、ラクトース等の基質が酸化されるには、引き抜かれた電子が何らかの電子受容体等を還元しなければならない。このため、研究室では、人工的に合成した高価な電子受容体を利用されることが一般的である。最も安価な電子受容体は空気中の酸素であり、酸素を直接または間接的に電子受容体として利用できれば、反応液に空気をバブリングすることで、効率的かつ安価に電子受容体を供給することが可能である。しかしながら、CDH は酸素を電子受容体とするものの、その反応効率は非常に低く、酸素を電子受容体として物質生産するのは現実的ではない¹⁶⁾。本研究室は好気的な環境でラクトース酸化酵素の検索を行うことで、酸素を直接電子受容体として、効率的にラクトースを酸化する酵素を *Paraconiothyrium* 属微生物が培養液上清に分泌することを見出した¹⁰⁾。精製、同定の結果、carbohydrate: acceptor oxidoreductase (COX) であることがわかった。このように、酸素を電子受容体とし効率よくオリゴ糖を酸化できる COX は *Microdochium nivale*¹⁸⁾ や *Acremonium strictum*¹⁹⁾ にわずかに報告があるだけである。我々はその後、経済産業省地域新生コンソーシアム研究開発事業の共同研究で、*Paraconiothyrium* 属微生物由来の COX による工業的な LacA 生産の基礎データを取得した。残念ながら、現状では *Paraconiothyrium* 属をはじめとする COX 活性を示す菌は必ずしも食品生産に適した菌とは言えず、生産した LacA は食品生産に利用するのは困難であるが、工業用途として利用される LacA の生産に関しては本菌株が強力なツールとなると考えられる。

3.3 バクテリア菌体を用いた LacA の生産

バクテリアの糖酸化酵素は古くから研究が行われている。NAD(P) 依存性のグルコースデヒドロゲナーゼもその 1 つであるが、本酵素は D-グルコースへの基質特異性が高いため、LacA 生産には適していない²⁰⁾。また、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌には膜結合性 (m-GDH) と、ペリプラズムに遊離で存在する可溶性 (s-GDH) の PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼが報告されている。*Acinetobacter* 属や *Escherichia* 属等の研究で、s-GDH は基質特異性が広く、D-グルコースだけでなく、ラクトースなどの二糖類も効率的に酸化することが明らかになっている^{21,22)}。また、LacA を効率的に生産することが報告されている *Pseudomonas* 属や筆者らがヨーグルトから単離した *Enterobacter* 属の菌株のラクトース酸化酵素もその基質特異性等の性質から s-GDH であると考えられる^{12,23)}。特に *Enterobacter* 属はわずかな期間の培養で、極めて高いラク

トース酸化活性を示す休止菌体が調製可能であることから、LacA の効率生産に適していると考えられる。しかしながら、s-GDH 活性を示す菌株は必ずしも食品生産に適した菌と言えず、本活性を利用した LacA 生産は行われていない。一方、酢酸菌、*Acinetobacter* 属そして *Escherichia* 属はその細胞膜に m-GDH をもつことが報告されている^{21,22,24)}。しかし、m-GDH は D-グルコースに対する基質特異性が高く、筆者らが酢酸菌の m-GDH のラクトース酸化活性について明らかにするまでは (詳細は以下に示す)、m-GDH はラクトースを酸化しないと考えられていた^{22,25,26)}。

筆者らの研究室では高 LacA 生産菌である *B. cepacia* を取得している。本菌株はラクトースを酸化し、モル収率 100% で LacA を生産できる^{9,27,28)}。*B. cepacia* は *Escherichia* 属などと同じグラム陰性菌に属するが、その糖酸化酵素は特異的である。上記の m-GDH のように、既報のバクテリアの膜結合性の糖酸化酵素の二糖類に対する基質特異性は極めて低い。一方、本菌株の糖酸化酵素は膜結合性でありながら、D-グルコースだけでなく、ラクトースをはじめとする二糖類も効率よく酸化する。このような膜結合性の糖酸化酵素の報告はない。酵素の詳細はいまだに明らかになっておらず、その解明が期待される。

食品生産への利用が期待される菌としては、*Zymomonas mobilis* と筆者らの研究する酢酸菌があげられる。*Z. mobilis* の糖酸化酵素は glucose-fructose oxidoreductase であり、細胞質に遊離の形で存在する²⁹⁾。D-グルコースを酸化し D-グルコン酸を生産するのに対応し、D-フルクトースを還元し D-ソルビトールを副生することで酸化還元反応を行っている。また、D-グルコースだけでなくラクトースも効率良く酸化できることが報告されている。*Z. mobilis* はメキシコの蒸留酒、テキーラの発酵菌として知られており、食品生産への利用が期待されるが、LacA 生産の際に、多量の D-ソルビトールを生産するなどの理由から、実用化には至っていない。一方、筆者らは酢酸菌がラクトース酸化活性を示すことを明らかにしたが、酢酸菌のラクトース酸化活性は低く、その時点では酢酸菌による LacA 生産は困難と判断せざるを得なかった。酢酸菌による LacA の工業的生産の検討は、以下に示すように LacA の食経験の証明を待つこととなった³⁰⁾。

4. LacA の食経験の証明とヨーグルト中の LacA 生産菌の同定

LacA は食品素材として適した特性を示すが、食品素材としての LacA 実用化には適当な生産菌の取得以外にも食経験の証明が必須であった。食経験の証明にあたり、発酵乳製品に着目した。発酵乳製品の原料である牛乳は約 5% のラクトースを含む。また、発酵乳製品中の LacA 存在は、発酵過程でラクトースが酸化されていることを示唆することから、LacA を生産する食品発酵菌の取得も期待された。ヨーグルトやチーズをはじめとする様々な発酵乳製

図3. カスピ海ヨーグルト中のLacAの局在

50 mL チューブでカスピ海ヨーグルトを調製、凍結後チューブより抜き取り、表層より1~2 cm 間隔で切断、それぞれに含まれるLacA量をHPAEC-PADにより定量した。

品を調べたが、その中にLacAの存在を確認することはできなかった。その後、当時ブームとなっていたカスピ海ヨーグルトに着目した。カスピ海ヨーグルトはコーカサス地方の伝統的なヨーグルトと言われ、長い食経験をもち、現地では日常的に摂取されている。本ヨーグルトは乳酸菌だけでなく、乳酸菌と酢酸菌の一種 *Acetobacter orientalis* との共発酵で調製されるヨーグルトであったことから、LacAの検出が期待された³¹⁾。家庭で継代されているカスピ海ヨーグルトを分析したところ、待望のLacAを検出することができた³⁰⁾。その後、市販されているカスピ海ヨーグルト種菌で調製したヨーグルトからLacAを分離精製し、その構造を確認した。市販ヨーグルトメーカーで本ヨーグルトを調製、毎日100 g ずつ摂取すると想定して、サンプリングし、その中のLacAを定量した。その結果、毎日100 g のヨーグルトを摂取した場合、年間約0.5~1.0 g のLacAを摂取できることを明らかにし、LacAの食経験を証明した³⁰⁾。ヨーグルト中のLacAの局在を調べたところ、LacAは表層ほど多く蓄積していたことから、好気性菌の酢酸菌により生産されていると推定した(図3)³⁰⁾。カスピ海ヨーグルト種菌から、乳酸菌、*Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* と酢酸菌、*A. orientalis* を分離し、乳酸菌単独および乳酸菌と酢酸菌の共発酵でヨーグルトを調製したところ、共発酵したヨーグルトのみにLacAが検出された。また、牛乳で培養した *A. orientalis* の休止菌体がラクトース酸化活性を示したことから、ヨーグルト中のLacA生産菌は *A. orientalis* と同定した³⁰⁾。この結果は、筆者ら

が実用化を目指す酢酸菌によるLacA生産と同じ現象がカスピ海ヨーグルトでも起こっていることを示唆しており、LacAに付加価値を与えるものと期待された。この発見がきっかけとなり、酢酸菌によるLacA生産の事業化への取り組みが再び動き出すことになった。

5. 酢酸菌のラクトース酸化酵素の同定

酢酸菌による糖質の酸化は古くから研究が行われてきた。酢酸菌には二糖類を酸化できる s-GDH が存在せず、酢酸菌の菌体も精製した m-GDH も D-グルコースは酸化するが、二糖類はマルトースをわずかに酸化するにとどまり、ラクトースに関しては全く酸化しないことが報告されていた²⁴⁾。しかしながら、当研究室で約50株の酢酸菌を調べたところ、そのほとんどがラクトースを酸化するという従来の報告とは異なる結果が得られたが¹¹⁾、酢酸菌の基質特異性を調べることでこの矛盾の理由を明らかにすることができた。*A. orientalis* の休止菌体の D-グルコース酸化活性を100%としたときのラクトースに対する相対活性はわずか0.04%であった³⁰⁾。また、*A. orientalis* 以外の酢酸菌のラクトース酸化活性も D-グルコースに対する活性と比較すると、はるかに低いことがわかった(表2, 3)³²⁾。つまり、ラクトース酸化活性は酢酸菌に広く存在するが、その活性は低すぎて従来の手法では検出が困難であったこと、また、筆者らがLacAを高感度で検出できる条件で分析を行っていたことが本発見の鍵であった。その後の研究で、ラクトース酸化酵素は細胞膜に存在すること、至適pHなどの諸性質が既報の酢酸菌の m-GDH のものと似ていることが明らかになった³²⁾。そこで、酢酸菌、*Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter medellinensis*) NBRC3288 の m-GDH を *Gluconobacter* 属の2菌種で過剰発現させたところ、ラクトース酸化活性が上昇した。また、*K. medellinensis* NBRC3288 のゲノム上の m-GDH 遺伝子を破壊した m-GDH 欠失株は、D-グルコースおよびラクトースの両方に対する酸化活性を示さなかった。これらの結果から、酢酸菌のラクトース酸化酵素は m-GDH であると結論づけた³³⁾。

表2. 酢酸菌休止菌体の単糖への作用性

Substrate	Relative activity (%)	Substrate	Relative activity (%)
D-Glucose	100	L-Arabinose	3.4 ± 0.6
D-Mannose	4.1 ± 0.1	D-Glucosamine	6.1 ± 0.8
D-Allose	75 ± 5.8	D-Galactosamine	0
D-Galactose	16 ± 3.3	L-Glucose	0
2-Deoxy-D-glucose	76 ± 6.9		
2-Deoxy-D-galactose	5.6 ± 0.7	Maltose	0.29 ± 0.1
		Lactose	0.16 ± 0.1
D-Xylose	11 ± 0.9	Cellobiose	7.3 ± 1.6
D-Ribose	1.6 ± 3.3		

Substrate concentration, 50 mM; n = 3.

表 3. 酢酸菌休止菌体の二糖類への作用性

Substrate		Relative activity (%)
D-Glucose		100
Kojibiose	α -Glc(1 $\rightarrow$ 2)Glc	0.85
Sophorose	β -Glc(1 $\rightarrow$ 2)Glc	1.0
Nigerose	α -Glc(1 $\rightarrow$ 3)Glc	0.91
Laminaribiose	β -Glc(1 $\rightarrow$ 3)Glc	1.1
Maltose	α -Glc(1 $\rightarrow$ 4)Glc	0.93
Cellobiose	β -Glc(1 $\rightarrow$ 4)Glc	2.3
Lactose	β -Gal(1 $\rightarrow$ 4)Glc	0.53

Substrate concentration, 8.5 mM; $n = 2$.

6. 酢酸菌による LacA 生産法の確立

酢酸菌は D-グルコース酸化活性の極めて高い菌として知られているが、D-グルコース酸化活性と比較してラクトース酸化活性は低く、酢酸菌による効率的な LacA 生産は容易ではなかった。そこで、筆者らは *A. orientalis* や比較的高い酸化活性を示した *Gluconobacter frateurii* NBRC3285 を用いた酢酸菌の培養条件の検討および休止菌体によるラクトース酸化反応の検討を行った³²⁾。さらに、ダイセル株式会社 (当時：ユニチカ株式会社) で工業的な生産条件の検討が行われ、効率的にラクトースを酸化する条件を確立し、食品用途向けの LacA の工業的な生産に成功した。LacA 生産の効率化には様々な工夫があるが、その中のいくつかを以下に示す。1 つ目は酢酸菌がラクトースを分解する β -galactosidase 活性をもたなかったことがあげられる。 β -galactosidase の存在はラクトースおよび LacA の分解による収率の低下を招くだけでなく、反応液中にその分解産物である D-グルコースを生成する¹¹⁾。D-グルコースはラクトース酸化活性を強く阻害する。(おそらく競争阻害と思われる) 本阻害は比較的低グルコース濃度でも起こるので、 β -galactosidase 活性が弱かったとしても多量の菌体と高いラクトース濃度で反応を行えばその影響は無視できないと考えられた。幸運なことに酢酸菌はラクトースも LacA も分解しないことがわかった¹¹⁾。また、酢酸菌が酸素を直接の電子受容体としないことも要因の 1 つと考えられる。*Paraconiothyrium* 属の COX のように直接酸素を電子受容体とする反応では、反応液中への酸素供給量が反応速度に直接反映される。また、反応液を窒素置換し、さらにミネラルオイルを重層することで酸素をシャットアウトすると、全く反応が進まなくなる。それに対し、酢酸菌の休止菌体での反応は酸素をシャットアウトしても、反応性は落ちるものの、反応が進行する (菌体の中で上手に還元型酵素の酸化型への変換が行われていると考えられる)³²⁾。反応液中に大過剰量の休止菌体を加えた場合、菌体の呼吸等で酸素が消費され、反応液中の酸素が不足すると予想される。酢酸菌の酸化反応はそのような酸素不足の条件下でも反応が停止しない。上記の、ラクトースを資化しないこと、酸素の供給が直接反応速度に影響しないことは、ラクトース酸化反応を促進するために、大量の休止菌体を加えることを可能にした。さらに、高い基質濃度でも

休止菌体の酸化活性が失活しないことも、反応効率の向上に大きく貢献した。一般的に、休止菌体で反応を行う際、基質濃度が高すぎると、細胞等が損傷を受け目的の酵素活性が低下することがある。一方、酢酸菌の休止菌体はラクトースの飽和溶解度に近い高濃度 (300 g/L) で反応を行っても、活性が低下することがなかった¹¹⁾。基質濃度の上昇により、ラクトース酸化速度を大幅に向上させることができた (図 4)。

現在、ダイセル株式会社より“ラクトビオン酸含有乳糖発酵物”として 40% 以上の LacA を含む粉末が食品素材として供給されている。供給された素材は、カルシウム吸収促進効果の向上を期待して、乳製品やサプリメントの成分として利用されるだけでなく、エクオール産生促進効果を期待して、エクオールの前駆体であるイソフラボンを含むサプリメントの成分としても、各種機能性食品に配合されている。また、溶解性が極めて高い LacA のカルシウム塩は、低温にしても析出の恐れがない。そのため、今後はカルシウム補給を目的とした透明な清涼飲料への添加など、従来の有機酸のカルシウム塩では適応が難しかった分野などへの新たな利用が期待される。上記の機能性だけでなく、LacA がカスピ海ヨーグルトの成分の 1 つであり、そのヨーグルト中の LacA 生成機構と同じ手法で生産されているということは、一般消費者に強くアピールするものと考えている。

図 4. 酢酸菌休止菌体による LacA の生産

G. frateurii NBRC3285 の休止菌体を調製し、5% (○), 15% (□), 30% (△) ラクトースとラクトースの 1/2 モル等量の炭酸カルシウムとともに攪拌しながら反応させた。生成した LacA を HPAEC-PAD により定量した。

7. LacA 以外のオリゴ糖アルドン酸の生産

LacA 以外に筆者らはセロビオースなどのセロオリゴ糖の酸化により生成するセロビオン酸やセロオリゴ糖アルドン酸も研究している。Paraconiothyrium 属由来の COX はもともとセロビオースをはじめとするセロオリゴ糖を効率的に酸化する¹⁰⁾。セロペンタオースまでのセロオリゴ糖であれば、鎖長が長くなっても、酸化効率はセロビオースと大きく変わらないことを明らかにした。セロオリゴ糖の原料となるセルロースは地上に最も多く存在するバイオマスである。さらに、バイオエタノール生産の研究の進歩と相まって、その分解物であるセロオリゴ糖は効率よく生産できるようになっており、今後の進展が期待される。また、筆者らは酢酸菌を用いてセロビオースを酸化し、セロビオン酸を生産できること明らかにしている¹¹⁾。その生産効率は基質特異性から LacA のそれとほぼ同じと考えられる。近年、セルロースの分解により食品用途のセロビオースが生産され、市場で販売されるようになってきていることから、酢酸菌による食品向けのセロビオン酸生産の実用化が期待される。

酢酸菌由来だけでなく、Escherichia 属や Acinetobacter 属由来の m-GDH の研究から、m-GDH は二糖類を酸化しない、または酸化しても、その酸化活性は非常に微弱という事が報告されている^{21,22,24)}。酢酸菌の m-GDH もラクトースを酸化するものの、その活性は D-グルコースに対する活性と比較すると非常に微弱である。我々は酢酸菌休止菌体の様々な二糖類への基質特異性を調べる中で、イソマルトース (Glc (α1→6) Glc)、ゲンチオビオース (Glc (β1→6) Glc)、メリビオース (Gal (α1→6) Glc) がラクトースと比較し非常に効率的に酸化されることを明らかにした^{34,35)}。これらの糖質はすべて α または β1→6 グリコシル結合をもつオリゴ糖であり、酢酸菌は α または β1→6 結合をもつ二糖類を効率的に酸化できることがわかった。現在、イソマルトースをはじめとするイソマルトオリゴ糖を主成分とするイソマルトオリゴ糖シロップが市販されている。イソマルトオリゴ糖は最も安価な機能性オリゴ糖の 1 つで、これを原料とすれば、酢酸菌で効率的にイソマルトビオン酸が生産できると考えられている。また、多くの酢酸菌では三糖以上のイソマルトオリゴ糖に対する酸化活性は二糖に比べ大幅に低下したが、イソマルトトリオースをイソマルトース並みに酸化できる酢酸菌株の取得に成功している。本菌株を使えばイソマルトビオン酸だけでなく、イソマルトオリゴ糖アルドン酸の生産が可能になると考えられる。特に、イソマルトースはラクトースと異なり、虫歯菌 (*Streptococcus mutans*) により資化されず、酸を生成しないことから、イソマルトビオン酸は歯の再石灰化素材としての応用が期待されている。

謝辞

ここに記述した成果は株式会社ダイセル ヘルスケア事

業部 (旧ユニチカ株式会社 生活健康事業部) の共同研究と技術者の方々の工業化への取り組みがあつてのものである。あらためて、深謝申し上げたい。また、Burkholderia 属や Paraconiothyrium 属による LacA 生産の研究にご協力いただいた、大阪府立大学 笠井尚哉教授、竹原化学工業株式会社、塩水港製糖株式会社および大和化成株式会社にも、御礼申し上げたい。

文献

- 1) M.A. Neaverson: Intravenous administration of erythromycin: serum, sputum and urine levels. *Curr. Med. Res. Opin.*, **4**, 359-364 (1976).
- 2) R. Brommage, C. Binacua, S. Antille and A.L. Carrié: Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. *J. Nutr.*, **123**, 2186-2194 (1993).
- 3) 雪印乳業(株) 須栗俊朗, 柳平修一, 青江誠一郎, 出家栄記: ビフィズス菌増殖促進剤. 特開平 7-277990, 1995-10-24.
- 4) 木村 隆: 新規機能性糖質「ラクトビオン酸」のアンチエイジング作用. *食品工業*, **54**, 76-80 (2011).
- 5) R. Sumimoto, K. Dohi, T. Urushihara, N.V. Jamieson, H. Ito, K. Sumimoto and Y. Fukuda: An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas, and liver preservation in the rat. *Transplantation*, **53**, 1206-1210 (1992).
- 6) 村上 洋: 機能性糖質素材の開発と食品への応用. シーエムシー出版, 東京, pp. 231-240 (2005).
- 7) 佐橋佳一, 角田利孝: ラクトビオン酸カルシウムの簡易合成法 (第 1 報). *農化*, **24**, 176-177 (1950).
- 8) B.Y. Yang and R. Montgomery: Oxidation of lactose with bromine. *Carbohydr. Res.*, **340**, 2698-2705 (2005).
- 9) H. Murakami, J. Kawano, H. Yoshizumi, H. Nakano and S. Kitahata: Screening of lactobionic acid producing microorganisms. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 469-477 (2002).
- 10) T. Kiryu, H. Nakano, T. Kiso and H. Murakami: Purification and characterization of a carbohydrate: acceptor oxidoreductase from *Paraconiothyrium* sp. that produces lactobionic acid efficiently. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 833-841 (2008).
- 11) T. Kiryu, T. Kiso, H. Nakano and H. Murakami: Lactobionic and cellobionic acid production profiles of the resting cells of acetic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1712-1718 (2015).
- 12) 桐生高明, 山内康平, 益山新樹, 木曾太郎, 中野博文, 村上 洋: *Enterobacter* 属 KYG-11 株によるラクトビオン酸の生産条件. 第 9 回関西グライコサイエンスフォーラム要旨 (2008).
- 13) 市川吉夫: グルコン酸醗酵に関する研究-3-*Aspergillus niger* によるグルコン酸の生産. 京都工芸繊維大学繊維学部学術報告, **4**, 271-277 (1965).
- 14) G. Henriksson, V. Sild, I.J. Szabó, G. Pettersson and G. Johansson: Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1383**, 48-54 (1998).
- 15) C. Schou, M.H. Christensen and M. Schulein: Characterization of cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens*. *Biochem. J.*, **330**, 565-571 (1998).
- 16) M. Samejima and K.L. Eriksson: A comparison of the catalytic properties of cellobiose: quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 103-107 (1992).
- 17) M. Yoshida, T. Ohira, K. Igarashi, H. Nagasawa and M. Samejima: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase from the wood-rotting fungus *Grifola frondosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **217**, 225-230 (2002).
- 18) F. Xu, E.J. Golightly, C.C. Fuglsang, P. Schneider, K.R. Duke, L. Lam, S. Christensen, K.M. Brown, C.T. Jørgensen and S.H. Brown: A novel carbohydrate: acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1136-1142

- (2001).
- 19) S.F. Lin, T.Y. Yang, T. Inukai, M. Yamasaki and Y.C. Tsai: Purification and characterization of a novel glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum* T 1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 41-47 (1991).
 - 20) G. Avigad, Y. Alroy and S. England: Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked aldohexose dehydrogenase from *Gluconobacter cerinus*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1936-1941 (1968).
 - 21) P. Dokter, J. Frank and J.A. Duine: Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem. J.*, **239**, 163-167 (1986).
 - 22) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita, K. Takimoto and O. Adachi: Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 49-57 (1986).
 - 23) Y. Nishizuka and O. Hayaishi: Enzymic formation of lactobionic acid from lactose. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2721-2728 (1962).
 - 24) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita and O. Adachi: D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 851-861 (1981).
 - 25) J. De Ley and J. Schell: Oxidation of several substrates by *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.*, **77**, 445-451 (1959).
 - 26) T.E. King and V.H. Cheldelin: Glucose oxidation and cytochromes in solubilized particulate fractions of *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.*, **224**, 579-590 (1957).
 - 27) H. Murakami, A. Seko, M. Azumi, N. Ueshima, H. Yoshizumi, H. Nakano and S. Kitahata: Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 117-120 (2003).
 - 28) H. Murakami, A. Seko, M. Azumi, T. Kiso, T. Kiryu, S. Kitahata, Y. Shimada and H. Nakano: Microbial conversion of lactose to lactobionic acid by resting cells of *Burkholderia cepacia* No. 24. *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 7-11 (2006).
 - 29) M. Zachariou and R.K. Scopes: Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.*, **167**, 863-869 (1986).
 - 30) T. Kiryu, T. Kiso, H. Nakano, K. Ooe, T. Kimura and H. Murakami: Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. *J. Daily Sci.*, **92**, 25-34 (2009).
 - 31) T. Ishida, A. Yokota, Y. Umezawa, T. Toda and K. Yamada: Identification and characterization of lactococcal and *Acetobacter* strains isolated from traditional Caucasian fermented milk. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 187-193 (2005).
 - 32) T. Kiryu, K. Yamauchi, A. Masuyama, K. Ooe, T. Kimura, T. Kiso, H. Nakano and H. Murakami: Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, "Caspian Sea yogurt". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 361-363 (2012).
 - 33) 桐生高明, 駒 大輔, 木曾太郎, 田中重光, 中野博文, 村上 洋: 機能性オリゴ糖ラクトビオン酸を生産する酢酸菌由来糖酸化酵素の同定. 日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集, 2A34p09 (2015).
 - 34) 桐生高明, 木曾太郎, 中野博文, 大江健一, 木村 隆, 村上 洋: *Acetobacter orientalis* 休止菌体を用いたメリビオン酸の生産. 応用糖質科学, **2 Suppl.**, B 49 (2012).
 - 35) 桐生高明, 木曾太郎, 駒 大輔, 田中重光, 植木将貴, 湯口宜明, 中野博文, 村上 洋: 酢酸菌休止菌体のイソマルトオリゴ糖の酸化特性に関する研究. 応用糖質科学, **4 Suppl.**, B 44 (2014).

質疑応答

[質問] 大阪樟蔭女子大 北尾

① 1,4-結合より 1,6-結合の方が反応特異性が高い理由は何か.

② 立体構造は解明されているのか.

[回答]

① 酵素の立体構造による基質の認識の違いが原因と考えています.

② m-GDH の立体構造は明らかにされていません. しかし, 構造の似ている methanol dehydrogenase の立体構造をもとに m-GDH の立体構造を予測した文献が存在するので, これを利用して 1,6-結合の方が反応特異性が高い理由を明らかにできるかを検討していきたい.

[質問] 石川県立大 山本

ラクトビオン酸が機能を発揮するのは, どの位の量か.

[回答]

ラクトビオン酸のピフィズス菌選択増殖活性については, 特許出願があるものの, 詳細なデータは明らかにされていません. 詳細なデータの取得が望まれています. カルシウム吸収促進効果に関しては, 対カルシウム重量比で 0.5 倍以上の摂取で効果があるというデータがあります.