Production of α -Linked Galactooligosaccharide (α -GOS) by α -Galactosidase from *Aspergillus niger* APC-9319 and Its Physical and Physiological Properties

(Received October 8, 2003 ; Accepted November 5, 2003)

Akiko Yamashita,¹ Hiroyuki Hashimoto,^{2,*} Sumio Kitahata,² Eriko Kikuchi,³ Koki Fujita,³
 Masamichi Okada,⁴ Atsushi Mizutani,⁴ Shigeharu Mori,⁴ Yoshihiko Amano¹ and Takahisa Kanda¹

¹Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering, Shinshu University
 (4-17-1, Wakasato, Nagano 380-8553, Japan)

²Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University
 (8304, Minamiminowa, Nagano 399-4598, Japan)

³Bio Research Corporation of Yokohama (1-1-1, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan)

⁴Amano Enzyme Inc. (4-179-35, Sue-cho, Kakamigahara, Gifu 509-0108, Japan)

Abstract: α -Linked galactooligosaccharide (α -GOS, 7.5 kg) was produced from galactose (18 kg; prepared from lactose hydrolyzate) by the reverse reaction of α -galactosidase from *Aspergillus niger* APC-9319. α -GOS contained 58% disaccharide, 28% trisaccharide and 14% oligosaccharides larger than trisaccharide. The disaccharide in α -GOS consisted largely of α -1,6-galactobiose (73%). α -GOS was stable at neutral and acidic pHs, at temperatures up to 180°C (pH 4.5, 10 min). The water activity of α -GOS was 0.84 (25°C, 70% (w/v)). The powder preparation was highly hygroscopic, and its solution showed higher activity in retaining moisture than sucrose. The sweetness of α -GOS was 25% of that of sucrose. The taste of α -GOS was mild and mellow. α -GOS reduced acid taste, bitterness, astringency, and harsh taste without spoiling the original taste in various fruit juices, and emphasized the original flavor of food materials in various cooked foods. α -GOS was not hydrolyzed in an *in vitro* digestion method. In an oral α -GOS tolerance test, the blood glucose level did not change at all. α -GOS had a strong selective growth activity for *Bifidobacterium* sp. and *Clostridium butyricum*. An α -GOS intake in rats made the content of lactate and *n*-butyrate in the cecum higher, and pH in the cecum lower than for a control intake. The viable count of *Candida albicans* in the cecum and colon of mouse was decreased by an α -GOS intake more than by a raffinose intake.

Key words: α -linked galactooligosaccharide, α -galactosidase from *Aspergillus niger* APC-9319, improvement of food taste, prevention of *Candida* infection, bifidus growth factor

Aspergillus niger APC-9319 株の α -ガラクトシダーゼによる α -結合ガラクトオリゴ糖 (α -GOS) の製造とその諸性質

山下亜希子¹, 橋本博之^{2,*}, 北畑寿美雄², 菊地恵理子³, 藤田孝輝³,
 岡田正通⁴, 水谷安津司⁴, 森 茂治⁴, 天野良彦¹, 神田鷹久¹

¹信州大学工学部物質工学科 (380-8553 長野県長野市若里 4-17-1)

²信州大学農学部応用生命科学科 (399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304)

³株式会社横浜国際バイオ研究所 (236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-1-1)

⁴天野エンザイム株式会社 (509-0108 岐阜県各務原市須衛町 4-179-35)

α -ガラクトシル基を含む糖質は、天然にはラフィノースやメリビオースが知られ、強いビフィズス菌増殖活性¹⁾や優れた加工特性を有するオリゴ糖として知られている。近年、 α -ガラクトシル基を含むオリゴ糖は、その結合様式により様々な生理機能が報告されている²⁻¹⁵⁾。 α -1,6結合のラフィノースは、経口投与により抗真菌作用によるアトピー性皮膚炎の改善効果⁴⁾や免疫賦活活性⁵⁾を示すこと、また、 α -1,3結合のガラクトビオース (Gal 2) は、動物の臓器をヒトに移植したときに起こる急性の拒絶反応の低減効果⁶⁾や腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* の毒素の

中和効果⁷⁾を示すこと、 α -1,4結合の Gal 2 は病原性大腸菌 O 157 や院内感染で問題となる尿路感染性大腸菌の感染予防・治療効果⁸⁻¹²⁾を示すこと、さらには、 α -1,6結合と α -1,2結合の Gal 2 は *Trypanosoma brucei* のグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーの糖鎖において重要な配列であること^{13,14)}などが報告されている。 α -ガラクトシル基は、生体内においては主として α -Gal 2 の形で存在するため、これら機能の本体は α -Gal 2 と考えられ、 α -Gal 2 は新しい機能をもつ食品や医薬品素材として期待できる。しかし、その安価な大量生産技術は未だに開発されておらず、その機能の実用的な評価やそのメカニズムの解明は十分になされていない。

これまでに、我々は *Candida guilliermondii* H-404 株由来

* Corresponding author (Tel. +81-265-77-1518, Fax. +81-265-77-1518, E-mail: hirohas@gipmc.shinshu-u.ac.jp).

の α -ガラクトシダーゼの縮合反応により、ガラクトースから α -Gal 2を主体とする α -結合ガラクトオリゴ糖 (α -GOS A)を効率良く合成できること、また、調製した α -GOS Aの新規な機能性食品素材としての評価について報告してきた¹⁶⁻¹⁸⁾。最近、我々は、*Aspergillus niger* APC-9319株由来の α -ガラクトシダーゼの縮合反応を用いることにより、*C. guilliermondii* H-404株由来の α -ガラクトシダーゼよりも効率良く α -Gal 2を主体とする α -結合ガラクトオリゴ糖 (α -GOS)を調製できることを見出し、その合成条件を検討した¹⁹⁾。今回は、*Asp. niger* APC-9319株由来の α -ガラクトシダーゼを用いて α -GOSを大量調製し、その諸物性を検討した。さらに、 α -GOS Aでは検討することができなかった食品への添加試験、摂取の血糖値に及ぼす影響(ヒト)、摂取の盲腸内容物に及ぼす影響(ラット)さらにはアレルギーの増悪因子である腸内カンジダ菌の定着予防・除去効果(マウス)について検討した。

実験材料と方法

1. 材 料

Aspergillus niger APC-9319株由来の α -ガラクトシダーゼは、天野エンザイム(株)(名古屋)より入手した。ヒト唾液および人工胃液は既報¹⁷⁾に従い調製した。脾液として、ブタ膵臓アミラーゼ(ロシュ・ダイアグノスティックス(株)、東京)を用いた。小腸粘膜酵素として、ラット小腸アセトン粉末(SIGMA, St. Louis, USA)の50 mMマレイン酸緩衝液(pH 6.6)抽出液を用いた。その他の試薬は、市販のものを使用した。

2. α -ガラクトシダーゼ活性の測定

α -ガラクトシダーゼ活性は、基質にメリビオースを用いて測定した。すなわち、5.0 mMメリビオースを含む20 mM酢酸緩衝液(pH 4.5) 400 μ Lに酵素剤50 μ Lを加え、40°Cで10分間反応させた。反応後、100°Cで10分間加熱し酵素を失活させ、生じたグルコース量をF-キット(グルコース/フルクトース)(ロシュ・ダイアグノスティックス(株))により測定した。なお、 α -ガラクトシダーゼ活性の1単位(U)は、1分間に1 μ molのメリビオースを加水分解する酵素量と定義した。

3. ガラクトースの調製

乳糖100 kgをカチオン交換樹脂(アンバーライト IR 102 B H型, オルガノ(株), 東京)を用いて加水分解後、オルガノ(株)製の擬似移動層分画装置(分画剤; DIAION UBK 530(Ca型), 三菱化学(株), 東京)にてガラクトースを回収した。さらに、この回収物から結晶化によって純度99%以上のガラクトース(25 kg)を調製した。

4. α -GOSの大量調製

100 L容真空結晶缶(DP型晶析装置, 月島機械(株), 東京)に、1 M酢酸緩衝液(pH 4.5)にてpH 4.5に調整した60% (w/v)ガラクトース溶液(ガラクトース18 kg)および*Asp. niger* APC-9319株由来の α -ガラクトシダーゼ

(35 U/g-Gal)を加え、60°Cで3時間反応させた後、過飽和条件である90% (w/v)濃度にまで濃縮した。反応液を100 L容Uトラフ型助晶機(月島機械(株))に移し、さらに60°Cで40時間酵素反応を行った。加熱により反応停止後、擬似移動層分画装置(分画剤; DIAION UBK 530(Ca型), 三菱化学(株))にて未反応のガラクトースを除去し、噴霧乾燥により α -GOSを調製した。

5. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析

糖組成の分析は、配位子交換カラムを用いて行った。HPLC装置は、(株)島津製作所(京都)製のLC-10 ADVP ポンプ, RID-10 AVP 示差屈折率検出器およびC-R 7 Aplus データ処理装置よりなるものを用いた。分析条件は、カラム: ULTRON PS-80 C (8.0×300 mm, Chromato Packings Center, 京都), カラム温度: 80°C, 移動相: H₂O, 流速: 0.6 mL/minを用いた。

有機酸の分析は、ポストカラムpH緩衝化法を利用して行った。HPLC装置は、東ソー(株)(東京)製のCCPS ポンプ, CM-8020 電気伝導度検出器およびLC-8020 データ処理装置よりなるものを用いた。分析条件は、カラム: Shim-pack SCR-102 H (8.0 mm×300 mm, 2本, (株)島津製作所), 移動相: 5 mM *p*-トルエンスルホン酸, 流量: 0.8 mL/min, カラム温度: 45°C, 反応液: 5 mM *p*-トルエンスルホン酸, 20 mM Bis-Tris, 100 μ M EDTA, 反応液流量: 0.8 mL/min, セル温度: 48°Cを用いた。

6. 4-アミノ安息香酸エチルエステル(ABEE)標識化法

オリゴ糖は、既報²⁰⁾に従い、還元アミノ化反応によりABEE標識化した。すなわち、ABEE試薬(40 μ L)を糖液(10 μ L)に添加し、80°Cで1時間インキュベーションした。溶液を室温まで放冷した後、H₂O 0.2 mLとクロロホルム0.2 mLを順に加えた。激しく攪拌した後、混合溶液を3分間遠心し、上層を回収しHPLC分析に供した。

ABEE標識化オリゴ糖の分析は、(株)島津製作所製のLC-6 A ポンプ, SPD-6 A UV 検出器およびC-R 4 A データ処理装置を用いて行った。分析条件は、カラム: Honepak C18 (4.6×75 mm, 生化学工業(株), 東京), カラム温度: 30°C, 移動相: 0.1 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)/アセトニトリル(88/12 (v/v)), 流速: 1.0 mL/minを用いた。ABEE標識化オリゴ糖は、305 nmの波長で検出した。

7. アルカリ処理による非還元糖分析

既報¹⁶⁾に従い、 α -GOSをアルカリ条件下で加熱し、還元糖を分解した。得られた反応液をHPLC(配位子交換カラム)にて分析し、残存しているオリゴ糖を非還元糖とした。

8. α -GOSの諸物性

α -GOSの溶解性、粘度、水分活性、吸湿性、保水性、pH安定性、酸性条件下での温度安定性、保存安定性およびアミノ酸存在下での着色性を、既報¹⁷⁾に従い調べた。

α -GOSの甘味度は、Pauliの全系列法²¹⁾に準じて、10% (w/v)グラニュー糖溶液を基準として基準溶液の甘味の強さに相当すると推定される濃度を中心に、それより甘味の低いもの、高いものをそれぞれ2試験区、合計5試験区

の溶液を調製し、測定した。各試験区の濃度差は3%とし、液温は $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ とした。7名のパネラーに試験溶液を基準溶液と対比試験させ甘味の強さを判別させた。

α -GOSの甘味質は、10%グラニュー糖溶液の甘味質を基準とし、その甘味度と等価濃度の試験溶液（40%）について9名のパネラーに評価させた。

9. 風味改善効果の検討

1) ジュースの風味改善効果

りんご、オレンジ、ぶどうおよびグレープフルーツの4種の100%果汁ジュースをそれぞれ2区分に分けた。A区分にはブランクとして何も添加せず、B区分には10% (w/v) となるように α -GOSを添加混合した。A区分とB区分とで、甘味、酸味、苦味、えぐ味等の強い方および飲みやすい方をパネラー20名に選択させた。さらに、 α -GOS (10%) 添加区分と甘味度が同じになるように、各ジュースにラフィノース (11.4%) を添加した区分を作成した。この区分と何も添加しなかった区分とで酸味、苦味、えぐ味等を評価させ、 α -GOSの評価結果と比較した。

2) アイスコーヒーの風味改善効果

高甘味度甘味剤を用いて、市販のガムシロップ（ショ糖にアラビアゴムを加えたもの）と同等の甘味度および甘味質となるように α -GOSを配合したシロップ（ α -GOS；65.3%，果糖；7.7%，アセスルファムK；0.16%，ステビックスSR；0.04%，水；26.8%）を試作した。無糖アイスコーヒー（150 mL）に市販ガムシロップおよび α -GOSを配合したシロップをそれぞれ添加し（12 g）、苦味と甘味の強い方をパネラー20名に選択させた。

3) ビールの風味改善効果

市販生ビールに1.0% (w/w) となるように α -GOSを配合した区分と無添加の区分について、なめらかさ、コク味および苦味の強い方をパネラー20名に選択させた。

4) 種々の食品の風味改善効果

卵焼き（糖添加量：卵200 gに対し20 g）、筑前煮（糖添加量：野菜400 gに対し24 g）、パンプキンケーキ（糖添加量：かぼちゃ250 gに対し160 g）およびイチゴジャム（糖添加量：イチゴ100部に対し54部）について、上白糖を配合した区分と、同量の α -GOSを配合した区分を一般的なレシピを用いて試作した。これら2区分について、10人のパネラーによって評価させた。

10. 生理機能の評価

消化性試験およびヒト腸内細菌による資化性試験は、既報¹⁷⁾に従い行った。

1) α -GOS摂取の血糖値に及ぼす影響

(1) 被験者

8名の健康成人（20代女性2名、30代女性1名、20代男性2名、30代男性1名、40代男性1名、50代男性1名）を被験者とした。

なお、本実験は「ヘルシンキ宣言」の精神を遵守し、被験者には事前に試験内容を十分説明し、文書による本試験参加の同意を得た上で行った。

(2) 被験物質

α -GOSおよびショ糖（市販のグラニュー糖）とした。

(3) 被験物質負荷

負荷試験前夜10時以降絶食とし、翌朝10時に被験物質（20 g/200 mL H₂O）をそれぞれ摂取し、負荷をかけた。摂取前を0分とし、摂取30、60、90、120、180分後に血糖値を測定した。

(4) 血糖値の測定

デキスター ZII（バイエルメディカル株、東京）簡易型血糖値測定装置を用い、酵素電極法にて測定した。

2) α -GOSの盲腸内容物に与える影響

実験方法は、太田らの実験²²⁾をモデルとしてデザインした。

(1) 動物および飼育方法

実験には4週齢SD雄ラット（日本クレア株、東京）を使用した。購入後7日間馴化飼育し、各群の平均体重および標準偏差がほぼ等しくなるように3群（ $n=4-5$ ）に分け、試験飼料を投与した。ラットは1匹ずつポリカーボネイト製のゲージに収容し、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12時間の明暗切替の飼育室で飼育した。飼育期間中、経時的に体重を測定した。

(2) 実験試料と投与方法

飼料組成をTable 1に示した。AIN-76飼料組成を基に、 α -GOSの投与量は5.0%とし、コントロールのショ糖添加分の一部と置換した。飼育期間中は、試験飼料と蒸留水を自由摂取させた。

(3) 盲腸の採取

試料投与後34日目に、ラットをネブタールで麻酔し、盲腸を採取した。

(4) 盲腸内容物の分析

盲腸内容物を均一に混ぜた後に一定量をサンプリングし、水分（乾燥減量法、 105°C 、2時間）、pH（ガラス電極）、有機酸を測定した。

有機酸は、盲腸内容物に内部標準としてクロトン酸溶液を一定量添加し、良く混合した後に遠心分離（15,000 rpm × 5分間）して得られた上清を、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、HPLCにて分析した。

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient	Control (%)	α -GOS (%)
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	55.0	55.0
Sucrose	10.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0
Vitamin mixture	1.0	1.0
Mineral	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.2	0.2
α -GOS	—	5.0
Total	100.0	100.0

(5) 統計処理

各測定値は、平均値±標準偏差で示した。統計処理は「対応のない *t*-検定」を行い、危険率 5% 以下を有意差有りとした。

3) α -GOS の *in vivo* におけるカンジダ菌定着予防・除去効果

(1) 動物および飼育方法

供試マウスは、CD-1 (ICR) 系 SPF マウス (日本チャールズリバー(株), 神奈川), 4 週齢, 雄性, 1 群 (5 匹) を用いた。また, 予備飼育はマウス用固形飼料と蒸留水を自由摂取できるようにして, 1 週間行った。

(2) 実験試料と投与方法

各種オリゴ糖溶液 (α -GOS, ラフィノース (ポジティブコントロール) およびショ糖 (ネガティブコントロール)) をマウス 1 匹当たり 100 mg となるように毎日 1 回ずつ 1 週間強制経口投与した。その後, マウス 1 匹当たり *Candida albicans* IFM 40009 株 (CA) の生菌液 0.2 mL (1×10^9 CFU) を強制経口投与し, さらに 3 時間後に 0.2 mL の各種オリゴ糖溶液を強制経口投与した。菌液投与後も同様に, 各種オリゴ糖溶液を毎日 1 回ずつ強制経口投与した。

(3) 解剖および生菌数の測定

CA 菌液投与の次の日から 3 日おきに, その前日から 24 時間分の糞便を回収し, 糞便中の CA 生菌数を測定した。糞便中の CA 生菌数の減少を確認後, マウスの盲腸, 回腸および結腸を摘出し, 各部の CA 生菌数を測定した。生菌数は, カンジダ菌選択培地であるカンジダ GS 培地 (栄研 (栄研化学(株), 東京) のプレート培地に, 生理食塩水にて希釈した糞便あるいは腸の内容物を塗布し, 37°C で 48 時間培養後における生育コロニー数より算出した。

(4) 統計処理

生菌数は, Wilcoxon の順位検定法により統計処理し, 危険率 5% 以下を有意差有りとして判定した。

実験結果と考察

1. α -GOS の大量調製

ガラクトース 18 kg から α -GOS 7.5 kg (白色粉末) を調製した。 α -GOS の組成を HPLC 分析 (配位子交換カラム) した結果, α -Gal 2 が全糖の 58% で, その他に α -ガラクトトリオースが 28%, α -ガラクトテトラオース以上のオリゴ糖 (重合度が 8 まで検出) が 14% 含まれていた (Table 2 上)。主生成物である α -Gal 2 の各結合位置異性体の組成を ABEE 標識化法にて分析した結果, α -Gal 2 の主成分は 1,6 結合で, その他に 1,3 結合, 1,2 結合および 1,4 結合が含まれていた (Table 2 下)。また, α -GOS をアルカリ処理した結果, 残存オリゴ糖が約 2% 含まれていたことから, α -GOS 中には約 2% の α -1,1 結合が含まれると推測された。なお, *C. guilliermondii* H-404 株由来の α -ガラクトシダーゼにより合成した α -GOS A の場合は, α -Gal 2 が全糖の 80% で, α -Gal 2 の内 α -1,6 結合が 60% であった^{17,18)}。

2. α -GOS の諸物性

α -GOS の諸物性は, α -GOS A の結果^{17,18)} とほぼ同等であった。すなわち, メリビオースより高い溶解性を示し, 水分活性は 0.84 (25°C, 70% (w/v)) であった。また, 粉末は高い吸湿性を, 水溶液は高い保湿性を示した。 α -GOS は, 中性および酸性条件下, 高温条件下 (180°C, pH 4.5, 10 分間) でも安定で, 粘度もショ糖と同等であったことから, ショ糖と同様に食品加工上作業性の良いオリゴ糖であると考えられた。アミノ酸存在下での着色性は, メリビオースと同等で, ショ糖等の非還元糖より着色しやすかった。さらに, α -GOS の甘味度はショ糖の 25% であった。 α -GOS の甘味質は, ショ糖に比べると刺激のないまろやかな味質を示した。また, わずかながらしつこさと後味が残ったが, これは 10% のグラニュー糖と同程度の甘味の 40% の α -GOS を比較したため, 粘性付与による口腔内でのもたつきによるものと考えられる。

3. 風味改善効果の検討

1) ジュースへの添加試験

結果の 1 例として, グレープフルーツジュースにおける評価を Table 3 に示した。グレープフルーツジュースでは, α -GOS を添加した区分の方が, 酸味, えぐ味が消え, 甘味が増し, 飲みやすいとの評価であった。また, 甘味に関しては甘すぎず, 程よい甘味との評価であった。りんごジュースの場合, α -GOS を添加した区分の方が, 酸味が和らぎ, 甘味が増し, 飲みやすいとの評価であった。また, 甘味に関しては, 甘すぎず程よい甘味との評価であった。また, オレンジジュースでは, α -GOS を添加した区分の方が, 酸味が弱くなり, 苦味が消え, 甘味が増し, 飲みやすいとの評価であった。ぶどうジュースでは, α -

Table 2. Composition of α -GOS.

	%
α -Gal 2	58
α -Gal 3	28
α -Gal 4-8	14
α -Gal 2	%
1,6	73
1,4	3
1,3	19
1,2	5

Table 3. Influence of α -GOS addition on the flavor of grapefruit juice.

	A	B	Unknown or equivalent
Acid taste	14	0	6
Harsh taste	14	2	4
Sweetness	3	10	7
Pleasant taste	4	15	1

The qualities of taste (acid taste, harsh taste, sweetness, and pleasant taste) were evaluated for each sample solution by 20 panelists. A, control; B, α -GOS addition.

GOS を添加した区分の方が、苦味が消え、甘味が増し、飲みやすいとの評価であった。 α -ガラクトシル基を有するラフィノースも、 α -GOS と同様に酸味や苦味などを和らげる傾向を示した。しかしながら、ラフィノースの場合は、旨味が無くなり、薬臭さが出たのに対し、 α -GOS の場合はこのような負の変化は全く見られなかった。

2) アイスコーヒーの風味改善効果

α -GOS を配合して試作したシロップを添加した区分では、市販のものを添加した区分よりもアイスコーヒーの苦味が弱まるという評価が得られた。

3) ビールの風味改善効果

α -GOS を添加した区分は、無添加の区分と比較して明らかになめらかさとコク味が増し、苦味が低減されたという評価が得られた。

4) 種々の調理食品の風味改善効果

全体的に α -GOS を配合した区分の方が上白糖を配合した区分よりも、甘味が弱いという評価が得られた。両者の甘味度の違いを反映しているものと考えられる。しかし、卵焼きでは、 α -GOS を配合した区分の方が、卵の風味そのものが引き立つとの評価であった。筑前煮およびパンケーキでは、いずれも α -GOS を配合した区分の方が、野菜の味が引き立ち美味しいとの評価が得られた。イチゴジャムでは、酸味がやや薄らぎ、イチゴの風味そのものが引き立つ感じであるとの評価であった。

以上のように、 α -GOS は、くだもの、卵、野菜など食品の風味を引き立て、好ましくない酸味、苦味、渋味、えぐ味を弱めた。 α -GOS は、低甘味ではあるが良質の味質をもち、食品加工上優れた性質と食品の風味改善効果を併せ持つ優れた食品素材であると考えられる。

4. 生理機能の評価

1) 消化性試験

α -GOS A¹⁷⁾と同様に、 α -GOS はヒト唾液アミラーゼ、人工胃液、ブタ膵臓アミラーゼ、ラット小腸粘膜酵素のいずれの酵素によってもほとんど消化されなかった。このことより、 α -GOS は難消化性のオリゴ糖で、摂取した場合、ほとんど消化されずに大腸に到達すると考えられる。

2) α -GOS 摂取の血糖値に及ぼす影響

α -GOS およびショ糖をそれぞれ負荷した後、被験者の血糖値について摂取時からの変化を Fig. 1 に示した。ショ糖では、負荷後 30 分で著しい血糖値の上昇が見られた。これは、ショ糖が小腸でスクラーゼにより消化され、吸収されたことを示している。一方、 α -GOS では、全く上昇は見られず、ほとんど変化が見られなかった。これは、 α -GOS がヒトの消化酵素により消化されないため、小腸では吸収されずに、大腸に到達した結果と考えられる。

3) ヒト腸内細菌による資化性

α -GOS のヒト腸内細菌による資化性は、 α -GOS A の結果^{17,18)}とほぼ一致した。 α -GOS は、*Bifidobacterium* 属や酪酸生産菌として有用な *Clostridium butyricum* に良く資化された。一方、有害とされる *Clostridium* 属、大腸菌、黄色ブドウ

Fig. 1. Response in blood glucose level in oral α -GOS tolerance tests.

Values are shown as means $\pm$ SD. $\circ$, α -GOS, $\times$, sucrose.

Fig. 2. Changes in body weight.

●, α -GOS; ○, control.

球菌などにはほとんど資化されなかった。また、メリビオースやラフィノースなどの α -ガラクトシル基を有するオリゴ糖と比較して、 α -GOS は人体に有用と考えられる *B. bifidum* や *C. butyricum* に対する資化性が高かった。

ビフィズス菌や酪酸生産菌は、ヒトの腸内細菌叢のバランスを改善し生体の健康維持に有益な作用をもたらすことから、プロバイオティクスとしてヨーグルトや飲料など様々な食品に利用されている²³⁾。 α -GOS は、これらヒトに有用な細菌に対して選択的な資化性を示すことから、腸内環境を改善する食品素材であるプレバイオティクスとして有用なオリゴ糖であると考えられる。

4) α -GOS の盲腸内容物に与える影響

α -GOS 群の成長曲線 (体重) は、コントロール群と比較して差は見られなかった (Fig. 2)。また、 α -GOS の投与による下痢や軟便は観察されなかった。盲腸内容物の分析結果を Table 4 に示した。盲腸内容物の重量は、コントロール群に対し、 α -GOS 群では約 3 倍に増加した。盲腸内容物の pH は、コントロール群 (6.9 ± 0.4) に対し、 α -GOS 群では 5.3 ± 0.2 と有意 ($p < 0.01$) に低値を示した。これら数値は、モデルとした実験²²⁾のコントロール群 (6.88 ± 0.14) およびオリゴ糖群 [ガラクトオリゴ糖 (5.62 ± 0.31)、ラフィノース (5.54 ± 0.33)、フラクトオリゴ糖 (5.24 ± 0.16)] の結果と近い値であった。また、盲腸内容物 1 g 当たりの総有機酸量は約 1.4 倍に増加し、乳酸はその 34%、*n*-酪酸はその 27% を占め、コントロール群に対し

有意に高値を示した。乳酸の増加は乳酸生産菌の、*n*-酪酸の増加は酪酸生産菌の増加が原因であると考えられる。このことは、ヒト腸内細菌による資化性試験の結果からも示唆される。大腸内で生成された乳酸は、他の短鎖脂肪酸に比べて吸収されにくく、大腸での乳酸の吸収速度は、*n*-酪酸や酢酸などの短鎖脂肪酸の1/100以下である²⁴⁾。そのため、大腸内に残存しpHを低下させる。低いpHの環境では、乳酸を代謝し短鎖脂肪酸に変換する細菌の活性が低い。さらに乳酸が蓄積する²⁵⁾。本実験において乳酸が増加した一因として、大腸内のpHが低下した結果、産生された乳酸が蓄積したことも考えられる。しかし、本実験においては、下痢などの症状が見られなかったこと、また、乳酸濃度はモデルとした実験²²⁾のラフィノースやフラクトオリゴ糖群の結果の1/2程度であったことから、この程度の乳酸の増加は大きな問題ではないと考えられる。一方、生成した短鎖脂肪酸は腸管から速やかに吸収されるため、腸内での濃度は低下するはずである。しかし、 α -GOS群ではコントロール群に対し、酢酸やプロピオン酸が低値を示したのに対し、*n*-酪酸は有意に高値を示した。その濃度は、モデルとした実験²²⁾のオリゴ糖群 [ガラクトオリゴ糖 ($17.0 \pm 3.5 \mu\text{M}$), ラフィノース ($10.7 \pm 8.5 \mu\text{M}$), フラクトオリゴ糖 ($14.8 \pm 6.8 \mu\text{M}$)] の結果よりも高い値であった。*n*-酪酸の増加は、 α -GOSのみの特長であると考えられる。*n*-酪酸は、酢酸やプロピオン酸よりも大腸上皮細胞のエネルギー源として消費されやすく、消化管上皮細胞に対する増殖作用も最も強い²⁴⁾。 α -GOSは、消化管内で*n*-酪酸の産生を促すという観点からも、プレバイオティクス

Table 4. Content of organic acids in the cecum of experimental rats.

Ingredient	Control ($\mu\text{mol/wet g}^*$)	α -GOS ($\mu\text{mol/wet g}^{**}$)
Succinate	0.79 ± 1.3	1.91 ± 0.9
Lactate	0.28 ± 0.3	$69.25 \pm 34.2^{***}$
Formate	0.60 ± 0.8	4.36 ± 3.5
Acetate	87.35 ± 13.0	59.29 ± 31.7
Propionate	33.35 ± 3.8	$13.36 \pm 12.4^{***}$
<i>n</i> -Valerate	2.48 ± 0.3	0.00 ± 0.0
<i>n</i> -Butyrate	14.53 ± 8.7	$54.52 \pm 26.3^{***}$
<i>i</i> -Valerate	ND	ND
<i>i</i> -Butyrate	1.20 ± 1.2	$0.00 \pm 0.0^{***}$

*Control wet g, 1.62 ± 0.18 g. ** α -GOS wet g, 4.84 ± 0.68 g. Values are means $\pm$ SD. Control, $n=5$; α -GOS, $n=4$. *** $p < 0.05$. ND, non detected.

として有用なオリゴ糖であると考えられる。

5) *in vivo* におけるカンジダ菌定着予防・除去効果

菌液投与後の糞便中の *C. albicans* (CA) の菌数は、菌投与1日目から4日目ではいずれも大きく減少したが、7日目になりショ糖群は増加傾向を示したのに対し、 α -GOSとラフィノース群では減少傾向を示した (Fig. 3)。7日後に回腸、盲腸および結腸を摘出しCAの菌数を測定した (Fig. 4)。その結果、回腸では、ショ糖群よりラフィノース群は高値を示した。盲腸では、ショ糖群とラフィノース群とで差は見られなかったが、 α -GOS群では約1/2の低値を示した。結腸では、ラフィノース群はショ糖群より低値を示したが、 α -GOSはさらに約1/2と有意に低値を示した。近年、消化管の常在細菌であるCAが異常増殖すると、アレルギー疾患や、慢性疲労、頭痛などの健康障害を引き起こすという概念が、Yeast Connection²⁶⁾やChronic Candidiasis Sensitivity Syndrome (CCSS)²⁷⁾として提唱されている。また、ラフィノースのアトピー性皮膚炎低減効果のメカニズムの一つは、ラフィノース摂取による腸内CAの低減効果であると報告されている⁴⁾。 α -GOSは、ラフィノースよりさらに強い腸内カンジダ菌の定着予防・除去効果を有すると考えられ、ラフィノースと同様のアトピー性皮膚炎低減効果が期待できる。既に、我々はマウスやラットにおいては α -GOSがラフィノースと同等以上の免疫調節機能を有することを見出している^{28,29)}。

Fig. 3. Changes of viable count of *Candida albicans* (CA) cells in feces after the administration of CA cells by the feeding of α -GOS diet.

□, sucrose; ●, α -GOS; ▲, raffinose.

Fig. 4. Changes of viable count of CA cells in digestive organs after the administration of CA cells by the feeding of α -GOS diet.

a, ileum; b, cecum; c, colon. Values are shown as means $\pm$ SD.

さらに、近年、慢性的な肩凝りや疲労感、肌荒れ、アトピー、リウマチ、大腸ガン、心筋梗塞、子宮内膜症、痴呆症などの不調や病気の原因の一つとして、「リーキーガットシンドローム」が注目されている。腸管壁を覆う粘膜に何らかの原因で「破れ」が生じると、本来は体内には吸収されない未消化の食品成分、腸内の細菌や腸内で発生した毒素が体内に漏れ出す。これらの異物が、免疫系の変調などを引き起こし様々な病気の一因になるのではないかという概念である^{30,31)}。この「破れ」の原因として、腸管内に渋滞した排泄物である「宿便」³²⁾の他に前述のCAの増殖が考えられている。 α -GOSは、腸管の「破れ」の原因の一つと考えられている腸管内のCAを低減させること、また、大部分が腸管上皮細胞のエネルギー源となり、上皮細胞の増殖を最も強く刺激することから、腸管の「破れ」を修復する効果が最も期待される n -酪酸の産生を腸管内で促すことから、「リーキーガットシンドローム」に対する予防効果が期待できる。

α -GOSは、風味改善効果、免疫調節機能および「リーキーガットシンドローム」に対する予防効果を特長とする新規な機能性食品素材として有用な糖質である。

本研究は、平成12年度と平成13年度は「健康増進機能性食品素材の高度加工・利用技術の開発事業（社団法人食品需給研究センター）」、平成14年度からは「民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業（農林水産省）」の一環として行っている。

文 献

- 1) K. Hayakawa, J. Mizutani, K. Wada, T. Masai, I. Yoshihara and T. Mitsuoka: Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **3**, 293-303 (1990).
- 2) 額田ひかる, 額田久子, 渡辺 篤:「ワタ」の成分の抗腫瘍活性. 医学と生物学, **112**, 69-73 (1986).
- 3) 本井重博, 細川友秀, 青池 晟, 田中義憲, 川井啓市: 二糖類 melibiose による Natural Killer 活性の増強. 日本癌学会 (総会記事), **40**, 132 (1981).
- 4) 名倉泰三, 有塚 勉, 佐山晃司: ラフィノースのアトピー性皮膚炎改善作用. *New Food Ind.*, **42**, 17-23 (2000).
- 5) 清信浩一, 大崎忠夫, 東 綾美, 大澤銀子, 神田善姫, 鴨井久一: 免疫細胞に対するオリゴ糖 (ラフィノース) の影響. 歯学, **85**, 551-558 (1998).
- 6) X. Chen, P.R. Ardreana and P.G. Wang: Carbohydrates in transplantation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 650-658 (1999).
- 7) V. Glaser: Carbohydrate-based drugs move closer to market: Drugs in clinical pipeline validate glycobiology targets. *Genet. Eng. News.*, **18** (8), 1, 12, 32 (1998).
- 8) 篠田純男: 大腸菌 O157:H7. ファルマシア, **32**, 954-958 (1996).
- 9) G.D. Armstrong, P.C. Rowe, P. Goodyer, E. Orrbine, T.P. Klassen, G. Wells, A. MacKenzie, H. Lior, C. Blanchard, F. Auclair, B. Thompson, D.J. Rafter and P.N. McLaine: A phase I study of chemically synthesized verotoxin (shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.*, **171**, 1042-1045 (1995).
- 10) N. Stromberg, B.-I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K.-A. Karlsson and S. Normark: Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal α 1-4 Gal-containing isoreceptors. *EMBO J.*, **9**, 2001-2010 (1990).
- 11) I. Ofek and N. Sharon: Adhesins as lectins: Specificity and role in infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **151**, 91-113 (1990).
- 12) スヴェンスカ・ソツケルファブリクス・アクチエボラーグ, ケレニウス・グニツラ・ベターソン, ルンドブラード・カール・アーネ, ミヨルビー・ニルス・ローランド, スヴェンソン・ステファン・ビルガー, ヴェインベルイ・ヤン: 診断に使用するための組成物. 特許公報 平3-22397, 1991-03-26.
- 13) J. Li, D.E. Robertson, J.M. Short and P.G. Wang: Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 5: One-pot regioselective synthesis of bioactive galactobiosides using a ClonezymeTM thermophilic glycosidase library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 35-38 (1999).
- 14) M.A.J. Ferguson, S.W. Homans, R.A. Dwek and T.W. Rademacher: Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, **239**, 753-759 (1988).
- 15) A. Varki: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130 (1993).
- 16) H. Hashimoto, C. Katayama, M. Goto, T. Okinaga and S. Kitahata: Enzymatic synthesis of α -linked galactooligosaccharides using the reverse reaction of a cell-bound α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 179-183 (1995).
- 17) 橋本博之, 片山千栄, 後藤 勝, 北畑寿美雄: *Candida guilliermondii* H-404 株の生産する α -ガラクトシダーゼによる α -結合ガラクトオリゴ糖の製造とその諸性質. 応用糖質科学, **41**, 143-150 (1994).
- 18) 橋本博之, 北畑寿美雄: *Candida guilliermondii* H-404 株の α -ガラクトシダーゼを用いた α -結合ガラクトオリゴ糖の合成とその機能. *FFI J.*, **172**, 51-61 (1997).
- 19) 橋本博之, 山下亜希子, 藤田孝輝, 岡田正通, 森 茂治, 天野良彦, 神田鷹久, 北畑寿美雄: *Asp. niger* APC-9319 α -ガラクトシダーゼによる α -結合ガラクトオリゴ糖の調製とその機能. 応用糖質科学 (講演要旨), **48**, 413 (2001).
- 20) H. Hashimoto, A. Yamashita, K. Ikura, C. Katayama, M. Goto, S. Yasuno, M. Kamei and S. Kitahata: Production of the positional isomers of α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *J. Appl. Glycosci.*, **48**, 279-285 (2001).
- 21) R. Pauli: The measurement of sweetness of artificial sweeteners. *Biochem. Z.*, **125**, 97-105 (1921).
- 22) 太田篤胤, 越坂部奈緒美, 山田和彦, 斎藤安弘, 日高秀昌: フラクトオリゴ糖および各種希少糖類のラットにおける Ca, Mg, P の吸収に及ぼす影響. 栄食誌, **46**, 123-129 (1993).
- 23) 荒 勝俊: 発酵食品と健康 ②乳酸菌の保健効果—腸内環境改善効果—. *New Food Industry*, **43**, 53-64 (2001).
- 24) 坂田 隆: 難消化性糖質と大腸. 「糖と健康」, 日本応用糖質科学会東日本支部監修, 日高秀昌, 坂野好幸編, 学会センター関西, 大阪, pp. 85-110 (1998).
- 25) 星 清子, 矢島高二: 大腸内細菌の代謝と代謝物の作用. 日本食物繊維雑誌, **2**, 1-14 (1998).
- 26) W.G. Crook: *The Yeast Connection Handbook*, 3rd Ed., Professional Books, Tennessee (1999).
- 27) 松田三千雄: 抗カビ対策としての抗真菌剤療法. アレルギーの臨床, **21**(7), 34-38 (2001).
- 28) 渡辺斉志, 園山 慶, 山下亜希子, 橋本博之, 菊地恵理子, 藤田孝輝, 岡田正通, 森 茂治, 川端 潤: 各種難消化性オリゴ糖が経口感作およびアレルギー性好酸球性炎症に及ぼす影響. 農化 (講演要旨), **77**, 72 (2003).
- 29) 山下亜希子, 橋本博之, 藤田孝輝, 岡田正通, 森 茂治, 天野良彦, 神田鷹久, 園山 慶, 北畑寿美雄: *Asp. niger* APC-9319 α -ガラクトシダーゼにより製造した α -結合ガラクトオリゴ糖 (α -GOS) の免疫調節機能. 応用糖質科学 (講演要旨), **49**, 453 (2002).
- 30) R. Venkataraman and M.P. Fink: Mechanisms responsible for intestinal barrier dysfunction in critical illness. *Update Intens. Care Emerg. Med.*, **38**, 282-300 (2002).
- 31) E. Lipski: Leaky gut syndrome. McGraw-Hill/Contemporary Books, New York (1998).
- 32) 森下芳行: 「腸内革命」, ごま書房, 東京 (1996).