[澱粉科学 (Denpun Kagaku) 第 40 巻 第 2 号 p.95~101 (1993)]

平成 4 年度 日本澱粉学会奨励賞受賞講演

Arthrobacter sp. K-1 株の β -フラクトフラノシダーゼ と本酵素の利用に関する研究

藤 田 孝 輝*

Some Properties of β -Fructofuranosidase from *Arthrobacter*
sp. K-1 and Its Application

Koki FUJITA

Carbohydrate Research Laboratories, Ensui Sugar Refining Co., Ltd.
(13-46, Daikoku-cho Tsurumi-ku, Yokohama 230, Japan)

Arthrobacter sp. K-1 isolated from soil, produces β -fructofuranosidase. The enzyme had a molecular weight of 52,000, and isoelectric point of 4.3. This enzyme was most active at pH 6.5–6.8 and at 55°C and stable up to 45°C at pH 6.5 for 30 min of incubation, and from pH 5.5 to 10.0 at 40°C in 2 hr of incubation. The enzyme hydrolyzed sucrose, erlose, raffinose, xylosyl-fructoside, neokestose, and stachyose, in this order, but hardly hydrolyzed 1-kestose and nystose. The enzyme catalyzed both transfructosylation and hydrolytic action, when it was incubated with sucrose alone. But in the presence of a suitable acceptor such as lactose, the enzyme catalyzed mostly transfructosylation and transferred the fructose residue preferentially to the acceptor. The enzyme had wide acceptor specificities. D-Xylose, D-galactose, L-sorbose, D- and L-fucose, D- and L-arabinose, maltose, isomaltose, cellobiose, lactose, melibiose, xylobiose, maltotriose, methyl β -glucoside, and galactoside were efficient acceptors in the transfructosylation. On the other hand, D-ribose, L-rhamnose, D-mannose, 2-deoxy-D-glucose, D-galactosamine, D-galacturonic acid, and 1-kestose were not efficient acceptors. Various primary alcohols, polyhydric alcohols including some sugar alcohols, and some glycosides acted as acceptors. The requirement for an acceptor of the transfructosylation by the enzyme is that the saccharide must have free hydroxyl groups of the equatorial bonds at C2 and C3 on 4C_1 or 1C_4 conformation. The main transfer products to aldoses and ketoses by the enzyme were non-reducing oligosaccharides, which had a fructofuranosyl residue bounded to their hemiacetal hydroxyl groups. In the case of D-galactose and L-arabinose, the enzyme produced not only non-reducing oligosaccharides, but also reducing oligosaccharides, identified as 3-O- β -D-fructofuranosyl-D-galactose and 4-O- β -D-fructofuranosyl-L-arabinose, respectively.

The enzyme is useful to synthesize heterooligosaccharide containing fructose. The lactosucrose has been produced on industrial scale by using this enzyme, and supplied in large quantities for food applications. The lactosucrose is not digestible in the human small intestine, but it is fermented by human intestinal microorganisms, especially by *Bifidobacterium*. The administration of the saccharide improved the intestinal bacterial flora.

この度は伝統ある澱粉学会の奨励賞を頂戴することになり、誠に嬉しく思っております。とくに澱粉学会創立 40 周年という節目の年にこのような賞をいただきます

ことはこの上ない喜びであります。今回の受賞は微生物酵素に関する基礎的な部分と、その酵素を用いて生産される乳果オリゴ糖が工業化に至った過程が受賞の対象になったものと思われます。この工業化の仕事は私一人ではなく私ども塩水港精糖一丸となって成し得たものであ

* 塩水港精糖(佛糖質研究所 (230 横浜市鶴見区大黒町 13-46)

ります。この賞は私たち仲間への励ましと、今後への期待であると解釈し、今後も糖質科学の発展のために研究を続けたいと思っております。ご推薦いただきました島下東日本支部長ならびに理事の皆様、ご選考いただきました不破会長はじめ授賞選考委員会の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

それでは受賞の対象となりました研究について述べさせていただきます。大部分は昨年のアミラーゼシンポジウムで発表した内容と重複するため、本稿ではできるだけ新しい実験結果を加えました。

1. はじめに

私どもはショ糖の有効利用を念頭におき、フラクトシル基転移作用を利用した機能性オリゴ糖の合成について研究を行うことにした。フラクトシル基転移活性を有する酵素としては β -フラクトフラノシダーゼ [EC 3.2.1.26] とレバンスクララーゼ [EC 2.4.1.10] が知られている。 β -フラクトフラノシダーゼはショ糖をグルコースとフラクトースに加水分解する酵素であるが、反応条件によっては糖転移反応も触媒し、オリゴ糖を生成することが知られている¹⁾。しかし、従来よく知られているカビや酵母由来の β -フラクトフラノシダーゼの中にはまったく転移作用を示さないものや、ショ糖にはよく転移するものの、受容体特異性の幅が狭いもの等、ヘテロオリゴ糖の生産には不向きであった²⁾。

一方、レバンスクララーゼは幅広い受容体特異性を示し、受容体の存在下ショ糖に作用させると、Table 1に示すように受容体分子の1位の水酸基に選択的にフラクトシル基を転移し、ヘテロオリゴ糖へ生成する³⁻⁵⁾。著者らは、はじめにこのレバンスクララーゼを用いてオリゴ糖を調製することを試みた⁶⁾。しかし工業的規模での生産を考えた場合、培養液に粘性物質を作るために扱いにくいこと、酵素の生産性が低いこと、また耐熱性が低いこと

など問題点が多く工業化には至らなかった。

2. *Arthrobacter* sp. K-1 株の生産するフラクトフラノシダーゼの諸性質⁷⁾

1) 微生物の検索

そこでこれらの問題点を解決するために、酵素生産性および耐熱性が高く、しかも受容体特異性の幅広いフラクトース転移活性をもつ酵素を生産する微生物を土壌より検索した。ショ糖を唯一の炭素源とする Fig. 1 に示すような組成からなる寒天平板培地に土壌の懸濁液を塗布し、30℃で培養した。ここに生育する菌を単離し、窒素源として硝酸ナトリウムの代りに5%コーン・ステープリカーを用いた液体培地に28℃で培養した。得られた培養上澄を粗酵素液としキシロース存在下、ショ糖に作用させキシロースへの転移活性をペーパークロマトグラフィーにより確認した。さらに60℃で10分間処理後も70%以上の残存活性を有する耐熱性の酵素を生産する菌株を数株選択した。これらのうち酵素生産性の高い菌株を選択し同定した結果、*Arthrobacter* 属に属する新種であることから *Arthrobacter* sp. K-1 株と命名した。

本菌の培養条件を検討した結果、フラスコレベルでの前培養では4%ラクトース、1.2%酵母エキス、0.8%ペプトン、0.4%リン酸二アンモニウム、0.1%硫酸マグネシウム・7水和物を含む培地が適し、本培養では3%ショ糖と5%コーン・ステープリカー、0.4%リン酸二アンモニウム、0.1%硫酸マグネシウム・7水和物を含む培地が適していた。これらの培地を用い、pHを7.0に調整しながら37℃で25時間通気攪拌培養することによって1ml当り140単位以上の酵素液を得ることができた。この培養条件では培養液中に粘質物を作ることもなく、菌体外酵素である本酵素は回収も容易で高収率で得ることができた。また他の酵素活性を含まず菌体を除去した液を粗酵素液としてフラクトース転移反応に用い

Table 1. Oligosaccharides produced by levansucrase.

Xylosylfructoside	Xyl ^{1,2} Fru
Galactosylfructoside	Gal ^{1,2} Fru
Mannosylfructoside	Man ^{1,2} Fru
Levanbiose	Fru ^{2,6} Fru
Levantriose	Fru ^{2,6} Fru ^{2,6} Fru
Maltosylfructoside	Glc ^{1,4} Glc ^{1,2} Fru
Isomaltosylfructoside	Glc ^{1,6} Glc ^{1,2} Fru
Cellobiosylfructoside	Glc ^{1,4} Glc ^{1,2} Fru
4-Arabinosylfructoside	Ara ^{4,2} Fru

Fig. 1. Method of screening of β -fructofuranosidase-producing microorganism.

Table 2. Summary of some properties of β -fructofuranosidases from *Arthrobacter* sp. K-1.

	β -FFase I	β -FFase II
Isoelectric point	4.3	4.6
Molecular weight (by SDS-PAGE)	52,000	58,000
Optimum pH (40°C, 10 min)	6.5-6.8	
pH stability (40°C, 2 hr)	5.5-10.0	
Optimum temp. (pH 6.5, 10 min)	55°C	
Temp. stability (pH 6.5, 30 min)	100% (45°C) 70% (60°C)	
K_m (Sucrose, mM)	9.1	—
Inhibitor	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Sn ²⁺ , Pb ⁺ SDS	
Substrate Specificity (10 mM)	Sucrose > Erlrose > Raffinose ≥ Xylosylfructoside > Neokestose > Lactosylfructoside > Stachyose	
(Hardly hydrolyzed)	1-Kestose, Nystose	

ることが可能であった。

2) 酵素の精製とその性質

本酵素は、0.6 飽和硫酸アンモニウムで分画後、DEAE-Toyopearl, Butyl-Toyopearl, Ultrogel AcA44 などを用いたクロマト操作によって 2 種の β -フラクトフラノシダーゼを得ることができた。これらの酵素は Table 2 に示すように等電点 4.3 と 4.6、分子量が 52,000 と 58,000 というようにわずかな差は見られたが、その他の酵素的性質は同じであった。

本酵素を 10 mM の各糖質に作用させた場合の加水分解反応の基質特異性はショ糖、エルロース、ラフィノース、キシロシルフラクトシド、ネオケストース、ラクトシルフラクトシド、スタキオースの順によく作用した。しかし 1-ケストース、ニストースには作用しにくく、イヌロビオース、マルトース、セロビオースには作用しなかった。すなわち本酵素はフラクトースが二つ連なった 1-ケストース、ニストースには作用しにくく、グルコースやキシロースにフラクトースが β 結合したものに高い活性を示した。このように従来のカビの酵素では 1-ケストースに作用するが、本酵素は作用しにくく、他起源の酵素とは異なる基質特異性を示した。

3) 転移反応の特徴⁹⁾

また転移反応も従来の酵素とは異なっている。*Aspergillus niger* の酵素では 50% ショ糖で約 60% の転移オ

Fig. 2. HPLC chromatogram of reaction products on sucrose in the absence and presence of lactose as acceptor.

Chromatographic conditions: column, YMC-Pack AQ-303 ODS (250×4.6 mm i. d.); temperature, room temp.; eluent, water; flow rate, 1 ml/min; detector, refractive index monitor.

リゴ糖の蓄積が見られる⁹⁾が、本酵素では 35% と低く、ショ糖単独に作用させたときには転移率は低くなっている。しかしラクトースのような受容体の存在によってショ糖の分解は促進され、ショ糖あたりの転移率も高くなる。Fig. 2 はショ糖単独と受容体としてラクトース存在下に酵素を作用させた場合の反応生成物の HPLC のパターンを示した。本酵素はフラクトシル基をショ糖自身には転移しにくく、受容体であるラクトースへ転移しやすいため、ショ糖の転移物である 1-ケストースの生成はわずかであり、ラクトースに優先的にフラクトースを転移し、オリゴ糖を生成した。したがって本酵素はフラクトースを含むヘテロオリゴ糖の製造に適した酵素である。

4) 受容体特異性

各種受容体存在下、本酵素をショ糖に作用させたときの受容体特異性を調べた。Table 3 に示すように単糖では D-キシロース、D-ガラクトース、L-ソルボース、D-, L-フコース、D-, L-アラビノースによく転移した。オリゴ糖ではマルトース、セロビオース、イソマルトース、キシロビオース、ラクトース、メリビオースによく転移し、ヘテロオリゴ糖を生成した。配糖体ではメチル基、フェニル基、*p*-ニトロフェニル基 (PNP) をもつグルコシド

Table 3. Transfructosylation of *Arthrobacter* β -fructofuranosidase toward saccharides and glycosides.

The reaction mixture containing sucrose (0.3 M), acceptor (0.1 to 0.6 M), and the enzyme (3.3 to 50 units/g sucrose) in 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) was incubated at 40°C for 2 to 20 hr.

Compound	Transfer product	Compound	Transfer product	Compound	Transfer product
Monosaccharides		Oligosaccharides		Glycosides	
D-Xylose	卅	Maltose	卅	Methyl α -glucoside	卅
D-Galactose	卅	Cellobiose	卅	Methyl β -glucoside	卅
D-Sorbose	卅	Isomaltose	卅	Methyl β -galactoside	卅
D-Fucose	卅	Xylobiose	卅	Phenyl α -glucoside	卅
L-Fucose	卅	Lactose	卅	Phenyl α -galactoside	卅
D-Arabinose	卅	Melibiose	卅	PNP α -glucoside	卅
L-Arabinose	卅	Maltotriose	卅	PNP α -galactoside	卅
D-Mannose	+	Sucrose	卅	Phenyl β -glucoside	++
D-Fructose	+	Raffinose	卅	Rubusoside	++
D-Glucosamine	+	Stachyose	++	Stevioside	++
D-Galactosamine	+	Erlose	++	Esculin	+
D-Ribose	±	Trehalose	+	Riboflavin	+
D-Allose	±	Turanose	+	Adenosine	+
D-Talose	±	Palatinose	+	Inosine	+
L-Rhamnose	±	1-Kestose	+	PNP α -xyloside	±
2-Deoxy-D-glucose	±	Nystose	±	PNP α -mannoside	—
D-Glucuronic acid	±			PNP α -fucoside	—
D-Galacturonic acid	±				

Abbreviations: PNP, *p*-nitrophenyl. 卅, transfer ratio is more than 50%; 卅, 50 to 20%; ++, 20 to 10%; +, less than 10%; ±, below 1%; —, no transfer product.

やガラクトシド, さらにルブソシドやステビオシドなどに転移が見られた。しかし PNP-キシロシド, PNP-マンノシド, PNP-フコシドでは転移は見られなかった。また Table 4 に示すように炭素数 10 までの 1 級の水酸基をもつアルキルアルコールやキシリトール, ソルビトールなどのアルコール類にも転移した。

これらの糖質の水溶液中の構造から本酵素の受容体になるための糖質の条件を考察した。有効な受容体である D-キシロース, D-ガラクトース, L-フコース, L-ソルボースなどはピラノース型の 4C_1 あるいは 1C_4 のイス型コンホメーションをとったとき C2, C3 位の水酸基が equatorial 結合している。L-ソルボースの場合, C3, C4 は 1C_4 コンホメーションの C2, C3 にあてはまり, これらの水酸基は equatorial 結合している。しかし C2 位の水酸基が axial 結合したマンノース, 水酸基がアミノ基に変わったガラクトサミン, 水酸基をもたない 2-デオキシ-グルコース, 4C_1 コンホメーションをとったとき C3 位の水酸基が axial 結合したラムノースやリボースには転移しにくくなっている。すなわち Fig. 3 に示す

ように 4C_1 あるいは 1C_4 のイス型のコンホメーションをとったとき C2, C3 位に相当する炭素に水酸基が equatorial 結合していることが有効な受容体になるための糖質の条件である。

5) 転移生成物の構造¹⁰⁾

種々単糖を受容体に用い本酵素をシヨ糖に作用させたときの反応生成物の HPLC クロマトグラムを Fig. 4. に示した。このように D-キシロース, D-アラビノース, L-フコースでは, ほとんど単一の生成物を示した。一方, D-ガラクトース, L-アラビノース, L-ソルボースでは A で示すメインの生成物の他に B で示す転移物が見られた。これらの転移生成物を分取用 HPLC で分離し, 構造を調べた。その結果, メインの転移生成物 A は L-ソルボースへの転移生成物以外, すべて非還元性の 2 糖で, 1 位の水酸基にフラクトシル基が結合したアルドシルフラクトシドであった。一方, 転移生成物 B は還元性を示し, ガラクトースでは 3 位の水酸基へ, L-アラビノースでは 4 位の水酸基に, ケトースである L-ソルボースへの転移生成物は 2 位の水酸基にフラクトシル基が結合し

Table 4. Transfructosylation of *Arthrobacter* β -fructofuranosidase toward various alcohols.

Compound	Transfer product
Methanol	+
Ethanol	++
Ethyleneglycol	++
1-Propanol	++
2-Propanol	—
1,2-Propanediol	+++
1,3-Propanediol	±
Glycerol	++
1-Butanol	+
2-Butanol	—
tert-Butanol	±
Isobutanol	++
1,2-Butanediol	+++
1,3-Butanediol	+
1,4-Butanediol	+
2,3-Butanediol	++
meso-Erythritol	++
n-Amyl alcohol	+
n-Hexanol	+
n-Heptanol	+
n-Octanol	+
n-Nonanol	+
n-Decanol	+
1,2,6-Hexanetriol	+
Cyclohexanol	—
1,2-Cyclohexandiol	+
1,3-Cyclohexandiol	±
1,4-Cyclohexandiol	±
D-Xylitol	+++
D-Sorbitol	++
D-Ribitol	+
D-Galactitol	+
Maltitol	+
myo-Inositol	+
D-Arabitol	—
D-Mannitol	—

ていた。またマルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオースのような還元性のオリゴ糖を受容体にした場合でも転移生成物は受容体の還元性末端側の糖質の1位の水酸基にフラクトシル基が結合したアルドシルフラクトンドであった。すなわち本酵素は受容体の還元性末

Fig. 3. Chair conformer of the pyranose ring of aldohexose.

端側の糖質がピラノース型のイス型のコンホメーションをとったとき2, 3位の水酸基が equatorial 結合したものによく転移し、ヘミアセタール水酸基が遊離の場合には、主として α 結合したヘミアセタール水酸基にフラクトシル基を転移した。

3. ラクトスクロース (乳果オリゴ糖) の合成とその諸性質^{11, 12)}

1) LS の消化性¹²⁾

本酵素を受容体としてラクトースの存在下、ショ糖に作用させた場合の転移生成物はガラクトース、グルコースとフラクトースから成りフラクトースはラクトースのグルコース分子に β -2, 1結合し、天然に広く存在するラクトースとショ糖の部分構造をもつ3糖であった。一般に4G-galactosylsucrose または lactosucrose (LS) とよばれている。

LS の *in vitro* での消化試験の結果、LS は胃酸で1.5%、小腸粘膜酵素で5%分解されるのみで難消化性であることを示している。またヒトが経口摂取した場合、血糖値および血中インスリン濃度には影響を及ぼさない。さらに経口摂取した場合の水素ガス排出の挙動もマルチトールなどの難消化性の糖質と類似していた。すなわちLS が難消化性であり、摂取したLS のほとんどが大腸にまで達し、ビフィズス菌などの腸内細菌によって容易に発酵性されることを示した。

LS の安全性に関しては国内外で急性毒性・変異原性試験において安全であることが確認されている。また最大無作用量の試験の結果では、ヒトでLS として体重1 kg 当り0.6 g までの経口摂取で下痢の発生は見られなかった¹³⁾。

2) 経口投与による腸内菌叢への影響¹⁴⁾

Fig. 5 にLS を経口摂取したときの腸内菌叢の構成比率の変化を示した。最初の1週間は1日当り3 g 摂取し、次の週は6 g 摂取した。摂取前に10.5%であったビフィズス菌の占有率は摂取7日目まで38.9%と3倍以上に増加し、摂取中止後7日目では元の状態に戻っている。また摂取期間中には糞便量の増加、糞便pHの低下、さ

Fig. 4. HPLC chromatogram reaction products on the mixture of sucrose and various saccharides.

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 2.

Fig. 5. Change in intestinal microflora by administration of lactosucrose.

Lactosucrose (LS-98) was orally administrated 3 or 6 g/day for adults ($n=8$). (■), *Bifidobacterium*; (▨), *Bacteroidaceae*; (▧), others

らにアンモニア、硫化水素、フェノール、クレゾール、インドールなどの腐敗産物の減少が観察された。このように LS は、腸内に棲息する有用菌の代表であるビフィ

ズ菌を選択的に増殖させ、著しく腸内菌叢の改善を促進した。

さらに最小有効摂取量としては LS を毎日 1~2 g ずつ摂取した場合でも、ビフィズ菌の増殖が確認されている¹⁵⁾。

3) 物 性

LS の物性を Table 5 にまとめた。溶解度は 367 g/dl 以上でショ糖より高く、水分活性は 0.87 でショ糖の 0.84 とほとんど同じ値を示した。また甘味度は砂糖を 100 とすると LS 純品では 30 であった。また粘度、浸透圧、熱・pH 安定性ともショ糖と同程度であり、ショ糖に類似した特性をもっている。

4) 工業スケールでの LS の生産

工業スケールでの LS の製造は Fig. 6 に示す二つの方法によって行われる。すなわち基本の反応条件はショ糖とラクトースをほぼ 1:1 とし、固形分濃度を 40~50%，pH を 6.0~6.5 とし、55°C で酵素反応を行う。このときの LS の生成量は 30% 前後であり、30% のラクトースを含む。多量のラクトースは製品とした場合に結晶が析出し問題となる。そのためラクトースの除去が必要で

Table 5. Some properties of lactosucrose.

Solubility (25°C, g/100 ml)	367<
Specific rotation [α] _D (25°C, H ₂ O)	65.7
Water activity (25°C, Bx 70)	0.87
Relative sweetness (20°C, sucrose : 100)	30
Stability (pH 4.5, 1 hr)	120°C
pH stability	
pH 7.0, 80°C, 2 hr	stable
pH 3.0, 80°C, 2 hr	fairly stable
Solution	low viscosity high moisture-retaining capacity
Powder	high hygroscopicity

Fig. 6. Manufacturing of lactosucrose.

あり、われわれは精糖業で培った結晶化技術により、ラクトースを除去し、LS 35% 以上、ラクトース 15% 以下とした、LS-35 を製造している。また反応系に酵素と特殊な酵母を加え、同時反応することによりグルコースを資化させ、LS 含量を 55% 以上にした、LS-55 を製造している。これらの LS-35、LS-55 は、現在「乳果オリゴ糖」として市販されている。

5) LS の利用

この LS は卓越したビフィズス菌増殖効果を有するばかりでなく、味質が非常にショ糖に似ているため、高い評価を得ており、飲料、菓子、デザート、乳製品など広い分野に食品素材として用いられている。

本研究において微生物のスクリーニング、酵素の性質

および利用の基本的な部分は大阪市立工業研究所で行ったものであります。ご指導をいただいた北畑寿美雄先生ならびに同研究所生物化学課の皆様にご感謝致します。

また本研究を進めるにあたり有益なご助言と、ご協力を得ました大阪市立大学理学部南浦能至先生、飯塚勝先生、武庫川女子大学薬学部小泉京子先生、谷本敏子先生、日本獣医畜産大学獣医畜産学部光岡知足先生、寺田厚先生ならびに榊林原生物化学研究所に深謝致します。

最後に本研究の機会を与えていただきました塩水港精糖(株)木村前社長、久野社長、また励ましと協力をいただきました塩水港精糖(株)と大新製糖(株)の社員の皆様にご感謝致します。

文 献

- 1) J. EDELMAN : *Advances in Enzymology*, Vol. XVI, F. F. NORD, ed., Interscience Publishers, Inc., p. 189-232 (1956).
- 2) 日高秀昌, 平山匡男 : 化学と生物, **23**, 600-605 (1985).
- 3) S. HESTRIN, D. S. FEINGOLD and G. AVIGAD : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6710 (1955).
- 4) D. S. FEINGOLD, G. AVIGAD and S. HESTRIN : *J. Biol. Chem.*, **224**, 295-307 (1957).
- 5) T. TANAKA, S. YAMAMOTO, S. OI and T. YAMAMOTO : *J. Biochem.*, **90**, 521-526 (1981).
- 6) 藤田孝輝, 原 耕三, 橋本 仁, 北畑寿美雄 : 日食工誌, **36**, 910-915 (1989).
- 7) K. FUJITA, K. HARA, H. HASHIMOTO and S. KITAHATA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 913-919 (1990).
- 8) K. FUJITA, K. HARA, H. HASHIMOTO and S. KITAHATA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2655-2661 (1990).
- 9) H. HIDAKA, M. HIRAYAMA and N. SUMI : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181-1187 (1988).
- 10) 投稿中
- 11) 藤田孝輝, 大沢武司, 三国克彦, 原 耕三, 橋本仁, 北畑寿美雄 : 澱粉科学, **38**, 1-7 (1991).
- 12) 藤田孝輝, 原 耕三, 堺 修造, 三宅俊雄, 山下昌之, 恒富保彦, 光岡知足 : 澱粉科学, **38**, 249-255 (1991).
- 13) 三国克彦, 藤田孝輝, 榊原恵美子, 桑原宣洋, 尾形正裕 : 澱粉科学, **40**, 15-19 (1993).
- 14) 原 宏佳, 寺田 厚, 光岡知足, 原 耕三, 石神博, 藤田孝輝, 緒方幸代, 藤森 勲 : 日本食品衛生学会第 63 回学術講演会講演要旨集, p. 32 (1992).
- 15) 緒方幸代, 藤田孝輝, 寺田 厚, 原 宏佳, 光岡知足, 原 耕三, 石神 博, 藤森 勲 : 日本ビフィズス菌センター第 12 回学術集会議要旨集, p. 17 東京 (1992).

(平成 4 年 10 月 2 日受理)