

氏 名 栗 本 雅 司
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2228 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学 位 論 文 題 目 Studies on Enzymatic Synthesis of Nonreducing Oligosaccharides and Their Application
 (非還元性オリゴ糖の酵素合成とその応用に関する研究)
 (主査)
 論文調査委員 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 清 水 昌 教 授 村 田 幸 作

論 文 内 容 の 要 旨

現在食品分野で使われている抗う蝕性、ビフィズス菌資化性のオリゴ糖の大部分は、還元性を有している。そのため食品加工に際し他の物質と反応し、品質劣化の原因となる。著者はこれを克服すべく、非還元性オリゴ糖の酵素的合成法を研究し、得られた非還元性オリゴ糖の機能を明らかにした。

主な研究内容は以下のように要約できる。

1. グルコシルラクトシドの合成

α -サイクロデキストリン (α -CD) およびラクトースに *Bacillus stearothermophilus* の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 (CGTase) を、次いでグルコアミラーゼを作用させた。生成物を単離し、機器分析により、これが非還元性の新規糖質グルコシルラクトシド ($\text{Gal} \beta 1-4 \text{Glc} \beta 1-1 \alpha \text{Glc}$) であることを明らかにした。

2. ネオトレハロースの合成

上記方法により得たグルコシルラクトシドにラクターゼを作用させ、ガラクトース残基を取り除き、ネオトレハロース ($\text{Glc} \beta 1-1 \alpha \text{Glc}$) を得た。また、ドナーとして α -CDあるいはデンプン部分分解物、アクセプターとしてグルコースを含む反応液にCGTaseを作用させ、生成率約22%でネオトレハロースを合成した。ネオトレハロースは非還元性糖質であるためアミノ酸との加熱による着色が少なく、また、pH 2～10で100℃、24時間処理してもほとんど分解されない極めて安定な糖質であった。さらに、小腸粘膜酵素により分解されることが明らかになった。

3. α -1,4-グリコシルトレハロースの合成

α -CDとトレハロースにCGTaseを、ついで β -アミラーゼを作用させ、5種類の転移生成物Glucosyl α -1,4-trehalose, Maltosyl α -1,4-trehalose, Glucosyl α -1,4-(glucosyl α -1,4')-trehalose, Maltosyl α -1,4-(glucosyl α -1,4')-trehalose, Maltosyl α -1,4-(maltosyl α -1,4')-trehaloseの合成を確認した。これらは、小腸酵素により大部分がトレハロースとグルコースに分解された。一方、*Streptococcus mutans* によるショ糖からの不溶性グリカンの生成を強く抑制した。

4. α -1,6-グリコシルトレハロースの合成

マルトテトラオースおよびトレハロースを含む混液に、*Aspergillus niger* の α -グルコシダーゼを作用させ、転移糖を合成した。その結果、Glucosyl α -1,6-trehalose, Isomaltosyl α -1,6-trehalose, Glucosyl α -1,6-(glucosyl α -1,6')-trehaloseの合成を確認した。これらは、*S. mutans* による不溶性グリカン生成を抑制し、同菌による酸発酵を受けなかった。さらにビフィズス菌選択的資化性を示した。

5. フルクトシルトレハロースの合成

高い β -フルクトフラノシダーゼ活性を有するバクテリアを土壌より単離し、*Bacillus* 属と同定、本菌から本酵素を単離し、遺伝子をクローニングした。スクロースとトレハロースに本酵素を作用させ、Fructosyl β -2,6-trehaloseを合成した。本糖質は、難消化性であったが、ビフィズス菌による選択的資化性を示した。

論文審査の結果の要旨

最近の健康志向を反映して、機能性オリゴ糖の開発が、盛んに進められている。これまでに、虫歯の原因菌である *S.mutans* に利用されにくいカップリングシュガーやイソマルトオリゴ糖など、さらに、腸内環境を整えるビフィズス菌選択的資化性糖質、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクトスクロースなどの開発が行なわれてきた。しかしながら、これらのオリゴ糖の大部分は還元性を有しており、食品加工に際し他の物質と反応しやすく、着色等の品質劣化を起こしやすい。著者は本研究において、これを克服すべく非還元性の新規オリゴ糖の酵素的合成法を開発し、これらオリゴ糖の機能を明らかにした。

評価すべき主な点は以下のとおりである。1. α -CDおよびラクトースからCGTaseおよびグルコアミラーゼの作用により、非還元性の新規糖質グルコシルラクトシドを合成した。2. グルコシルラクトシドにラクターゼを作用させ、ネオトレハロースを合成した。また、ドナーとして α -CDあるいはデンプン部分分解物、アクセプターとしてグルコースを用い、CGTaseの作用により、ネオトレハロースを合成した。さらに、ネオトレハロースの安定性、消化性を明らかにした。

3. α -CDとトレハロースにCGTaseを作用させ、5種類の α -1,4-グリコシルトレハロースを合成した。これらが、小腸、酵素により分解されること、抗う蝕性であることを明らかにした。

4. マルトテトラオースおよびトレハロースから、 α -グルコシダーゼの作用により、3種類の α -1,6-グリコシルトレハロースを合成した。これらが、抗う蝕性およびビフィズス菌選択的資化性を有することを明らかにした。

5. 土壌分離菌から新規な β -フルクトフラノシダーゼを単離し、遺伝子をクローニングした。スクロースとトレハロースに本酵素を作用させ、 β -2,6-フルクトシルトレハロースを合成した。本糖質が、難消化性であり、ビフィズス菌選択的資化性を有することを明らかにした。

以上のように、本論文は、微生物酵素によるオリゴ糖の新規合成法を確立するとともに、合成した非還元性各種オリゴ糖の機能を明らかにし、その用途を示したものであり、酵素化学、応用微生物学および機能性食品開発領域に寄与するところが多い。

よって本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年1月14日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。