



カスピ海ヨーグルトに含まれる 新規機能性糖質ラクトビオン酸の開発

(地方独立行政法人大阪市立工業研究所)

桐生 高明*・木曾 太郎・中野 博文・村上 洋

ラクトビオン酸とは

ラクトースの還元末端を酸化するとラクトビオン酸 (LacA) が生成する (図1)。筆者ら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) と共同で、酢酸菌を用いる LacA の工業的生産法を確立した。現在、LacA カルシウムは「乳糖発酵物」として乳製品やサプリメントに配合され市販されている。詳細なデータなどは参考文献に記載しているので、ここでは LacA 生産の実用化に至る経緯をエピソードとともに紹介したい。

図2に示すように LacA には古くから腸管でのカルシウム吸収を促進するなどの機能性が知られていた¹⁾。さらに、筆者らは研究過程で、LacA が配合する食品の味を損なわない良好な味質を示すことや、カルシウムと水溶性の高い塩を形成 (炭酸カルシウムの約20,000倍) するなどの性質を見だし、LacA に大きな可能性を見だしていた。一方、LacA の生産法としては、臭化水素酸でラクトースを化学酸化する方法や、さまざまな糖酸化菌や糖酸化酵素を用いる手法が報告されるものの、それらの手法は食品への適用を考えると必ずしも日本の生産者・市場に受け入れられるものとは言えなかった。我々の研究室も *Burkholderia* 属微生物の休止菌体の糖酸化活性^{2,3)} や子囊菌の一種である *Paraconiothyrium* 属の分泌性の糖酸化酵素⁴⁾ など LacA 生産を検討した。しかし、これらの微生物の糖酸化酵素は学術的には興味深い酵素であったが、安全性の担保という高いハードルを越えずに食品生産に利用することはできなかった。

食品生産に適した LacA 生産菌 (酢酸菌) の発見

その後、株式会社ダイセル (旧 ユニチカ株式会社) との共同研究を行い、食品生産に利用可能な LacA 生産菌



図1. LacA 生産プロセス

を得るため、工業研究所の所有する保存菌株から、食品に利用可能でかつ目的の活性を示す菌株の検索を行った。その結果、酢酸菌が目的の活性を示すことを突き止め、食品の生産に利用可能な LacA 生産菌の取得に成功した。これまでの研究では酢酸菌やその糖酸化酵素はラクトースを酸化しないと報告されていたので、酢酸菌にラクトース酸化活性があることは意外な結果であった⁵⁾。ラクトース酸化活性は酢酸菌に広く分布するものの、その活性は非常に微弱であり、我々が特殊な酢酸菌を見いだしたのではなく、今までの LacA 研究のノウハウを生かし、微量の LacA 生成も検出できる実験系で研究していたことが検出の鍵であったことが分かった⁶⁾。このラクトース酸化活性が微弱であるため、酢酸菌を用いたラクトビオン酸生産は報告されなかったものと推察される。これは我々にとって幸運な点であったが、一方、この微弱な活性をいかに工業的な生産につなげるかという難しい課題に直面することになった。

カスピ海ヨーグルトとの出会い

LacA 実用化には、生産菌の取得の他に、その食経験の証明という課題もあった。そこで、筆者らはヨーグルトなどの乳製品を中心とした発酵食品に含まれる LacA の検索を行った。ラクトースの所在は哺乳動物の乳中であるため、乳中のラクトースが発酵過程で発酵菌により酸化され LacA が生産されると考えたからである。しかし、さまざまな発酵乳製品を調べたが、LacA を見出すことはできなかった。その状況を打開したのが、カス

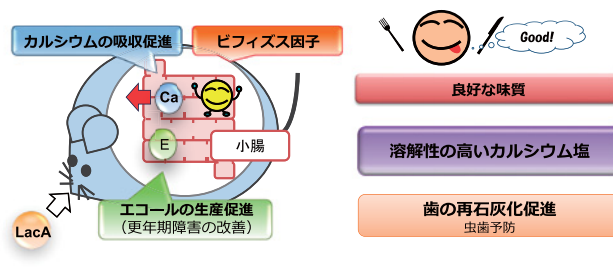


図2. LacA に期待される効果

*連絡先 E-mail: kiryu@omtri.or.jp



ピ海ヨーグルトとの出会いであった。カスピ海ヨーグルトは、WHOの協力を得て、食と長寿の関係の研究を行っていた家守幸男・京都大学名誉教授が、長寿の国として知られるジョージア共和国から持ち帰られたコーカサス地方の伝統的なヨーグルトで、乳酸菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) だけでなく、酢酸菌 (*Acetobacter orientalis*) もその発酵に深く関与することが報告されていた⁷⁾。本稿の筆者の一人でもある木曾研究主任が本ヨーグルト中の酢酸菌に着目、カスピ海ヨーグルトを分析するよう提案したのが研究の始まりであった。しかし、市販のカスピ海ヨーグルトを購入し分析するも、それらの中にLacAを検出することはできなかった(後に知ることとなるが、調べた市販カスピ海ヨーグルトは乳酸菌の単発酵で調製されていた)。我々にとって幸運だったのは、研究員の一人が家で発酵させたカスピ海ヨーグルトを研究所で毎昼食に食べていたことであった(カスピ海ヨーグルトは家庭でも簡単に調製でき、家庭で継代する愛好家が多い)。このヨーグルトを種とし、発酵乳を作成した。その際、酸素の供給を十分にするなど酢酸菌がラクトビオン酸を生産しやすいであろう条件を整えることも忘れなかった。そのように調製したヨーグルト中には、確かにLacAの存在を確認することができた(図3)。さらに市販されているカスピ海ヨーグルト種菌 (*L. lactis* subsp. *cremoris* と *A. orientalis* の乾燥菌体粉末)でも同様の結果を得ることができた。この検出を端緒として研究が進み、年間LacA摂取量推定により食経験を証明するとともに、本ヨーグルト中のLacA生産菌が酢酸菌であることを確認した⁶⁾。筆者らが工業化を目指した酢酸菌によるラクトースの酸化と同じ反応がカスピ海ヨーグルト中でも起こっていることは、本技術を事業化するあたり、大いにプラスに働くこととなった。実は、ヨーグルトを発酵させ食べていた研究員とは、ともにLacA研究を行ってきた村上洋研究室長であり、彼女が研究所だけでなく、家庭でも実はLacA調製をしていた

こと、さらに毎日それを摂取していたことに何か運命的なものを感じざるを得なかった。

LacAの工業的な生産法の確立

筆者らはかねがねLacAを配合する食品として乳製品を考えていたが、その根拠はラクトビオン酸の「ラクト」がラテン語で「乳」を表す言葉に由来するというぐらいしかなかった。しかし、カスピ海ヨーグルトでのLacA発見や、そのヨーグルトのLacA生産菌である*A. orientalis*と同じ酢酸菌に分類される菌株を生産に使用することは、LacAがヨーグルトなどの乳製品に配合するのに適した素材であることを示していた。このことはラクトビオン酸の高付加価値化に大きく寄与し、止まっていたLacA事業化への動きを加速することとなった。酢酸菌のラクトースに対する活性は微弱ではあったが、筆者らの研究室での培養・反応条件の検討や⁸⁾、菌株の選定や育種などの地道な努力と、その後の企業での研究の結果、工業生産に必要なまでにLacAの生産性を向上させることができた。この成功の影には以下に示すような酢酸菌のLacA生産に適した性質が関係している。LacAは酢酸菌休止菌体とラクトースを反応させることで生産される。一般的に、基質濃度を上げると反応速度は上昇するが、基質阻害や生成物阻害が起こるだけでなく、高い基質濃度が菌体にダメージを与えることで反応効率が低下する恐れがある。しかし、酢酸菌はラクトースの最大溶解度近傍の約300 g/L溶液中で反応を行っても、基質および生成物阻害や、酸化活性の顕著な低下がみられず、効率的にLacAを生産した⁹⁾。その結果、基質濃度の上昇で、反応効率を向上させることに成功した。また、ラクトース酸化活性はごく微量のグルコース存在下で強く阻害されることを筆者らは明らかにした。酢酸菌がラクトースやLacA分解活性を示せば、ラクトースやLacAの分解による収率の低下だけではなく、分解に伴うグルコース生成により酸化反応の阻害が起こることが予想された。しかし、酢酸菌は原料のラクトースやLacA分解活性を持たず、それらを資化しなかった⁹⁾。このため大量の菌体を高濃度のラクトースに作用させても、収率低下やグルコース生成による反応阻害は認められず、大量の菌体で高濃度のラクトースを反応させることが可能であった。

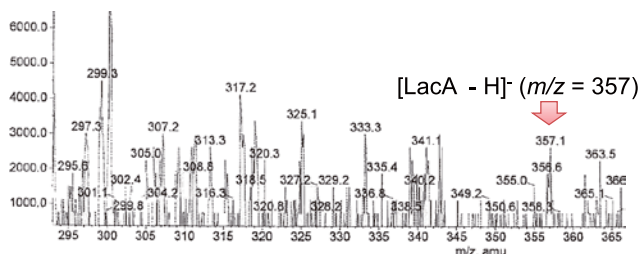


図3. カスピ海ヨーグルトで初めてLacAを検出した時の質量分析のデータ。矢印がLacAのシグナル。カスピ海ヨーグルト中にLacAが存在するという確信と、今までのLacA研究の経験をヨーグルト調製に反映させ検出できたシグナル。漫然と分析していたなら、他の成分のシグナルにかくれて見過ごされていた可能性が高い。

酢酸菌のラクトース酸化酵素の同定

酢酸菌の糖酸化活性は古くから研究されてきた。しかしながら、酢酸菌の菌体やその酸化酵素であるPQQ依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼ (m-GDH) やNADP依存性グルコースデヒドロゲナーゼはラクトースに対して酸化活性を示さないと報告されていた。一方、カスピ海ヨーグルトから単離した酢酸菌*A. orientalis*の



糖酸化活性を調べるとその特徴は *Gluconobacter suboxydans* 由来の m-GDH と似ていた^{5,6,10)}。しかし酢酸菌由来のものだけでなく、大腸菌など他のバクテリア由来の m-GDH もラクトースを酸化しないと報告されており、酢酸菌のラクトース酸化酵素の正体は不明であった。そこで筆者らは m-GDH 遺伝子を導入し発現させた酢酸菌の m-GDH 導入株およびゲノム上の m-GDH をノックアウトした m-GDH 欠失株を調製し、その酸化活性を調べることで、従来の報告に反し、m-GDH がラクトースの酸化を触媒する酵素であることを明らかにした¹¹⁾。話は少しそれるが、筆者らは酢酸菌がイソマルトース、ゲンチオビオースおよびメリビオースなどの α 1,6 や β 1,6 結合を持つ二糖をラクトースの 10–60 倍の効率で酸化することも見いだしている¹²⁾。従来、酢酸菌とその糖酸化酵素である m-GDH はマルトースに対して微弱な酸化活性を示すものの、二糖類は酸化しないと報告されていたことから、この結果は酢酸菌の糖酸化活性についての新たな知見といえる。特に、イソマルトースを主成分とするイソマルトオリゴ糖は汎用的機能性オリゴ糖として利用されており、イソマルトオリゴ糖を基質として用いれば、イソマルトビオン酸は LacA より安価に生産できると期待されている。

LacA の現在と将来への展望

カルシウムの吸収促進効果が期待される LacA はカルシウム塩の形状で「ラクトビオン酸含有乳糖発酵物」として、乳製品やサプリメントなどに配合されている (図 4)。さらに、LacA が更年期障害の予防に効果のあるといわれるエクオール (equol) の腸内での産生を促進するという新たな機能性も報告されており (本誌 90, 595–597 (2012) を参照)、エクオールの前駆体であるイソフラボンを配合するサプリメントの補助成分としても利用

されている。現在のところ、まだ一般消費者に対する LacA の知名度はそれほど高くない。しかし、「ラクトビオン酸」という名称や、カスピ海ヨーグルトでの食経験などは消費者に広く受け入れられるものであると筆者らは考えている。また、LacA カルシウムはほとんど無味で配合する食品の味を損なわないことや、他の有機酸のカルシウム塩と異なり溶解度がきわめて高く (60% 以上のシロップの調製が可能)、透明な飲料などに配合しても白濁の心配がないなど、使用上の利点も大きく、今後のさらなる普及が期待されている。

おわりに

大阪市立工業研究所の糖質関連酵素研究とその研究成果の産業化の伝統は古く、福本壽一郎博士の細菌、カビ由来アミラーゼによるブドウ糖生産の実用化 (1959 年) に始まる。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や転移反応の技術に続く筆者らの研究室の新しい技術として、筆者が入所した 2000 年頃から、村上洋研究室長を先頭に糖酸化技術の確立に取り組み、10 年もの歳月をへて、その成果ともいえるラクトビオン酸を実用化することができた。しかしこの成果も、LacA 生産の工業化に取り組まれた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) の技術者の方々の成果があつてのものであり、紙上をもって御礼申し上げたい。また、本研究に多くの知見をもたらした *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深謝申し上げたい。

文 献

- 1) Brommage, R. *et al.*: *J. Nutr.*, **123**, 2186 (1993).
- 2) Murakami, H. *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 469 (2002).
- 3) Murakami, H. *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **502**, 117 (2003).
- 4) Kiryu, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 833 (2008).
- 5) Ameyama, M. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 851 (1981).
- 6) Kiryu, T. *et al.*: *J. Daily Sci.*, **92**, 25 (2009).
- 7) Ishida, T. *et al.*: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 187 (2005).
- 8) Kiryu, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 361 (2012).
- 9) Kiryu, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (in press).
- 10) Kiryu, T. *et al.*: *Biocat. Agri. Biotechnol.*, **1**, 262 (2012).
- 11) 桐生高明ら: 日本農芸化学会大会要旨集, 2A34p09 (2015).
- 12) 桐生高明ら: 日本応用糖質科学会平成 25 年度大会要旨集, p. 46 (2014).



図 4. 市場で販売されているラクトビオン酸を含む食品