

# 乳糖の高度利用を志向したエピラクトースのプレバイオティクス機能性評価

森 春英 [北海道大学大学院農学研究院／教授]  
佐 分利 亘 [北海道大学大学院農学研究院／助教]  
西 岡 浩 [株式会社アミノアップ化学研究部／部長]

## 背景・目的

エピラクトースは、酵素(セロビオース2-エピメラーゼ)の作用により、牛乳に豊富に含まれる乳糖から簡便に製造できる。カルシウム・ミネラル吸収促進効果、プレバイオティクス効果(腸管菌叢改善効果)、脂質代謝改善効果等を示す機能性糖質である。プレバイオティクス効果に関し、代表格のフラクトオリゴ糖と同程度かそれ以上の高い機能性を有することがラット試験では示された。本研究では、ビフィズス菌株レベルでの増殖性および資化代謝の機序を明らかにし、エピラクトースのプレバイオティクス素材としての特色を明確にして、食品素材としての付加価値を高めるために実施した。

## 内容・方法

純粋培養試験には70株(*Bacteroides* 2株、*Bifidobacterium* 34株、*Blautia* 1株、*Clostridium* 5株、*Enterococcus* 2株、*Eubacterium* 2株、*Lactobacillus* 20株、*Lactococcus* 1株、*Propionibacterium* 1株、*Ruminococcus* 2株)を用いた。変法GAM培地および半合成培地を基本培地とし、これに2%のepilactoseまたは対照としてglucose、lactose(乳糖)、lactulose、フラクトオリゴ糖(FOS)添加または糖無添加とした。初期菌体濃度を一定として37℃、24時間の嫌気条件下での静置培養を行った。増殖性を濁度により判定した。次に33株を選択して培養菌体の無細胞抽出液を調製し、ラクトース、ラクチュロース、エピラクトース分解活性の半定量分析および生成物分析をTLCにより行った。最後に*Bifidobacterium adolescentis*無細胞抽出液中のエピラクトース分解酵素について、カラムクロマトグラフィー3種(陰イオン交換、疎水性、ゲルfiltration)および非変性電気泳動(活性染色)により分析を行った。*B. adolescentis*はゲノムの全塩基配列が既知であり、エピラクトース分解に関与する遺伝子群候補の検索を行った。

## 結果・成果

epilactose添加培地による各菌株の増殖の程度は、他の糖質含有培地での増殖といずれも良い相関を示した。ただし、糖無添加培地のものでは相関が見られず、従って添加した糖質といずれも同程度に増殖に関与し、プレバイオティクス効果対象菌株は、効果の高低はあるが概要では良く一致すると結論づけられる。epilactose添加培地での増殖性に対して特に高い相関を示したのはlactoseやlactulose添加培地のものである。従って、epilactoseは基本的にlactoseおよびlactuloseと同等のプレバイオ

ティック性能を有すると評価される(lactoseは代謝により腸管下部には到達しないので実際には機能しない)。すなわち、本実験結果は、プロバイオティクス素材として、epilactoseがlactuloseの代替として同等の機能を有する可能性を示している。細部において違いは認められる(例えば*Enterococcus raffinosus*がlactuloseよりもepilactoseで高い増殖を示す等)が、糖質による増殖性の細部の差違は、試験した2培地間で保存されておらず、実際の腸内細菌叢におけるポピュレーション改善を想定できる物ではない。

epilactoseの資化性に関しては、試験した33株のうち、*Bifidobacterium* 13株と*Lactobacillus*属の3株において無細胞抽出液にepilactose分解活性が認められ、例外はあるもののepilactose含有培地での増殖性と相関が見られた。epilactose分解によりGalおよびManが生じることから、反応は加水分解であり、触媒に関与する酵素はβガラクトシダーゼであると考えられた。このβガラクトシダーゼ活性は、epilactose含有培養細菌には認められる一方、グルコース添加培地での培養菌体には確認されないか顯著に低い。従ってepilactoseによる発現誘導性の活性である。epilactose含有培養で誘導されるβガラクトシダーゼ活性は、epilactose以外にも、lactoseおよびlactulose加水分解活性を示した。このうち*B. adolescentis*由来のepilactose加水分解活性は、無細胞抽出液のタンパク質分画に伴い、p-nitrophenyl β-D-galactopyranoside分解活性と挙動をともにしたことより、βガラクトシダーゼと断定された。またクロマトグラフィーにおいて活性ピークは分離しなかったが、電気泳動的には活性は分離し、活性染色により2本の活性バンドを示した。従って、本株におけるepilactose分解には、βガラクトシダーゼ2種(アイソザイム、または修飾により生成するアイソフォーム)またはそれ以上が関与すると判断される。本菌のゲノム上のβガラクトシダーゼ遺伝子周辺にはABCトランスポータやペーミアーゼ(取り込みに関与)、LacI(lacプロモータ発現抑制タンパク質)等の関連が予想される遺伝子が配置されており、遺伝子クラスターを形成している。以上から、これらが*B. adolescentis*におけるepilactose代謝資化をになう遺伝子群候補と考えられる。

## 今後の展望

本研究により、epilactoseのプレバイオティクス効果は、増殖菌株のスペクトラムおよび代謝機構に関してlactuloseに近いものであることが示された。lactuloseは確立されたプレバイオティクス素材として、粉ミルクをはじめ各所で使用されているが、乳糖のアルカリ異性化により合成されており、煩雑な中和・脱塩工程を要する。これに対し、epilactoseは単純な一段階の酵素反応により簡便に合成でき、牛乳等の食品中での変換が可能である。製造上のポテンシャルは極めて高い。本研究の成果により、lactuloseと同等の効果を持つことが単離細菌レベルで確認された事から、lactuloseに代わるプレバイオティクス素材として実用化が期待される。