

β -D-ガラクトシダーゼの開発と利用

齋藤 忠夫^{1*}・長畑 直樹¹・木村 一雅²

¹東北大学大学院農学研究科, 〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468-1

²新潟青陵大学短期大学部, 〒951-8121 新潟県新潟市中央区水道町 1-5939)

Development and application of β -galactosidase

Tadao Saito^{1*}, Naoki, Nagahata¹, Kazumasa Kimura²

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba 468-1, Aramaki, Aoba-ku, Sendai,
Miyagi 980-0845, Japan

²Department of Human Science, College of Nigata Seiryō University, Suidomachi 1-5939, Chuoh-ku, Nigata,
Nigata 951-8121, Japan)

要約

β -D-ガラクトシダーゼ (EC3.2.1.23, β -gal) は、乳糖 (ラクトース, Gal β 1-4Glc) の β -ガラクトシド結合を加水分解して、ガラクトースとグルコースの単糖に遊離させる酵素タンパク質である。ラクターゼは β -gal の別名として乳糖分解酵素を指す場合が多いが、ラクターゼ (EC3.2.1.108) は哺乳動物小腸の絨毛に多く存在して乳糖を分解する酵素複合体として単離された酵素をさす。

β -gal は自然界に広く分布しており、植物、動物の器官、酵母、細菌およびカビなどの多くの異なる起源より単離されている。本酵素は、細菌、酵母では細胞内に、カビでは細胞外に生産する。現在では、 β -gal は食品産業では最も重要な酵素の一つと位置付けられており、主として2つの使用目的で世界中で広く利用されている。一つ目の使用目的は、乳および乳製品中の乳糖の分解である。

これは、乳糖不耐症の方々用の製品製造のためだけでなく、最近では甘みを増して砂糖不添加でかつ嗜好性を向上させることにも活躍している。

もう一つの β -gal の使用目的は、乳糖を用いた糖転移反応によるガラクトオリゴ糖 (GOS) の製造である。本オリゴ糖は、育児用調製粉乳などに添加されたり、機能性ヨーグルトにプレバイオティクスとして添加利用されるなど、社会的な需要と利用が増えている。現在商業的に使用されているのは、酵母、細菌、カビの微生物起源の酵素が広く使用されている。これらの微生物由来のラクターゼは可溶性であり、至適 pH や至適温度、安定性および糖転移能などが異なり、それぞれの特徴を生かした用途と使用法が模索されている。

本稿では、 β -gal の乳糖の加水分解反応について、酵母 (*K. lactis*) や細菌 (*B. circulans*) 由来の酵素について概説する。ついで、 β -gal の糖転移反応について述べ、産業的にも大量調製されている GOS の特性と分析方法について概説し、最後に細菌起源の β -gal で製造された GOS におけるアレルギー性の指摘にも簡単に触れる。

* Tel : 022-757-4372, Fax : 022-757-4374
E-mail: tadao.saito.a3@tohoku.ac.jp

1. はじめに

β -D-ガラクトシダーゼ (β -D-ガラクトシド・ガラクトヒドロラーゼ, 以下 β -gal) は, 乳糖 (ラクトース, Gal β 1-4Glc) の β -ガラクトシド結合を加水分解して, ガラクトースとグルコースの単糖に遊離させる酵素タンパク質である。本酵素は, 1961年に創立した国際生化学連合 (現在の国際生化学分子生物学連合) の酵素委員会において, 初めて3 (ヒドラーゼ: 加水分解酵素) に分類され, その後1980年に酵素番号 (Enzyme Commission numbers: EC) 3.2.1.23 に再分類された。国際酵素委員会では, 全酵素を6つの種類に大別しており, EC番号の分類基準は酵素の反応特異性と基質特異性の違いにより区分されている。EC3.2.1は糖加水分解酵素に該当する¹⁾。一方, β -galの別名として乳糖分解酵素をラクターゼ (lactase) と呼ぶ場合も多い。しかし, ラクターゼ (別名ラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ) は酵素科学的には哺乳動物小腸の絨毛に多く存在して乳糖を分解する酵素複合体として単離された酵素を指し, 酵素番号も EC 3.2.1.108 (1984年) と β -galの分類番号とは区別されている。この小腸上皮粘膜から単離された酵素は, 乳糖分解活性に加えて EC3.2.1.62 活性も含む酵素複合体である。両者は完全分離されず, 複合体

内に両酵素活性が別々に存在されるとされる²⁾。本稿では, 主として食品産業で利用されている β -gal について述べることにする。

β -gal は, 自然界に広く分布しており, 植物 (アーモンド, モモ, アプリコット, リンゴなど) や動物の器官, 酵母, 細菌およびカビなどの多くの異なる起源より単離されている³⁾。本酵素は, 細菌, 酵母では細胞内に, カビでは細胞外に存在する。現在では, β -gal は食品産業では最も重要な酵素の一つと位置付けられており, 主として2つの使用目的で世界的に利用されている。一つ目の β -gal の使用目的は, 乳および乳製品中の「乳糖の分解」である。これは, 乳糖不耐症の方々の乳・乳製品の製造のためだけでなく, 最近では発酵乳などでの酸味を抑え, 甘みを増し嗜好性を向上させることにも使用され始めている。1950年代に, β -gal は初めて酪農分野で利用された。乳糖を加水分解した乳や乳製品は1970年代から盛んとなり, 初めて β -gal も市販されるようになった。1977年には, UHT 殺菌乳にろ過滅菌したラクターゼを加え作用させた「乳糖分解乳」(ラクターゼミルク) が誕生した。

もう一つの β -gal の使用目的は, 「乳糖からガラクトオリゴ糖 (GOS) を作る」ことである。このオリゴ糖は, 母乳中にも含まれる天然型の糖質であるために, 育児用調製粉乳などに添加したり,

表 1 酵母, 細菌, カビを起源とする β -ガラクトシダーゼの諸性質

起 源	分子量 (kDa)	至適 pH	至適温度 (°C)	活性因子	阻害因子	糖転移活性
酵母						
<i>Kluveromyces lactis</i>	117	6.5-7.3	37-45	K, Mg, Mn	Ca, Na	低
<i>fragilis</i>	201	6.6	37	K, Mg, Mn	Ca, Na	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	200	4.3	60	不要	なし	中
<i>Sporobolomyces singlaris</i>	146	3.5	45	不要	なし	高
細菌						
<i>Escherichia coli</i>	464	7.2	40	Na, K, Mg	なし	
<i>Bacillus circulans</i>	160	6	60	不要	なし	高
<i>subtilis</i>	88	6.5-7.0	50	不要	なし	
<i>stearothermophilus</i>	116	5.8-6.4	65	Mb	なし	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	540	6.2-6.6	55	Mg	なし	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	540	6.5	55	Na, K, Mg	Ca	低
カビ						
<i>Aspergillus niger</i>	124	3.0-4.0	55-60	不要	なし	
<i>oryzae</i>	90	5.0-6.2	50-55	不要	なし	中

シンバイオテイクスとしての機能性ヨーグルトに添加利用されるなど、社会的な需要と利用が増えている。 β -galの食品産業や医薬領域での利用に伴い β -galに対する研究成果も蓄積されており、Web of Scienceのデータベースによると、 β -galでは21,268件が、ラクターゼでは3,642件が、両者のキーワードでは367件が検索された。 β -galの検索結果では、化学、生化学、酵素科学の文献が含まれ、 β -galでは乳糖不耐症のような医学文献が多く含まれていた。

様々な生物が β -galを生産することが知られているが、現在商業的に使用されているのは表1に示したように、酵母、細菌、カビの微生物起源の酵素が広く使用されている⁴⁾。これらの微生物由来のラクターゼは可溶性であり、至適pHや至適温度、安定性および糖転移能などが異なり、それぞれの特徴を生かした用途と使用方法により世界中で広く利用されている。

本稿では、まず初めに β -galの乳糖の加水分解反応について、酵母(*K. lactis*)や細菌(*B. circulans*)由来の酵素について概説する。ついで、 β -galの糖

転移反応について述べ、産業的にも大量調製されているGOSについて概説し、最後に細菌起源の β -galで製造されたGOSにおけるアレルギー性の指摘にも簡単に触れることにする。

2. β -galの加水分解特性

β -galは、産業界では乳糖不耐症者向けの低ラクトースミルク(低乳糖乳)の製造や、砂糖不使用または低減のための甘味度向上、乳糖の結晶防止、ホエイ中の乳糖を分解した甘味シロップの製造などの目的で広く利用されている⁵⁾。ここでは、比較的良く研究されている β -galの加水分解反応における反応機構と、とくに加水分解能に優れた酵母 β -galの特徴について述べる。

2-1 β -galの加水分解の反応機構

β -galは糖質加水分解酵素(Glycoside Hydrolase)の中でも、基質の立体配座が生成物で保持される「アノマー保持型酵素」に分類されている。アノマー保持型酵素は、酸/塩基触媒と求核触媒残基の2つの酸性残基が反応に関与している。 β -galの反応機

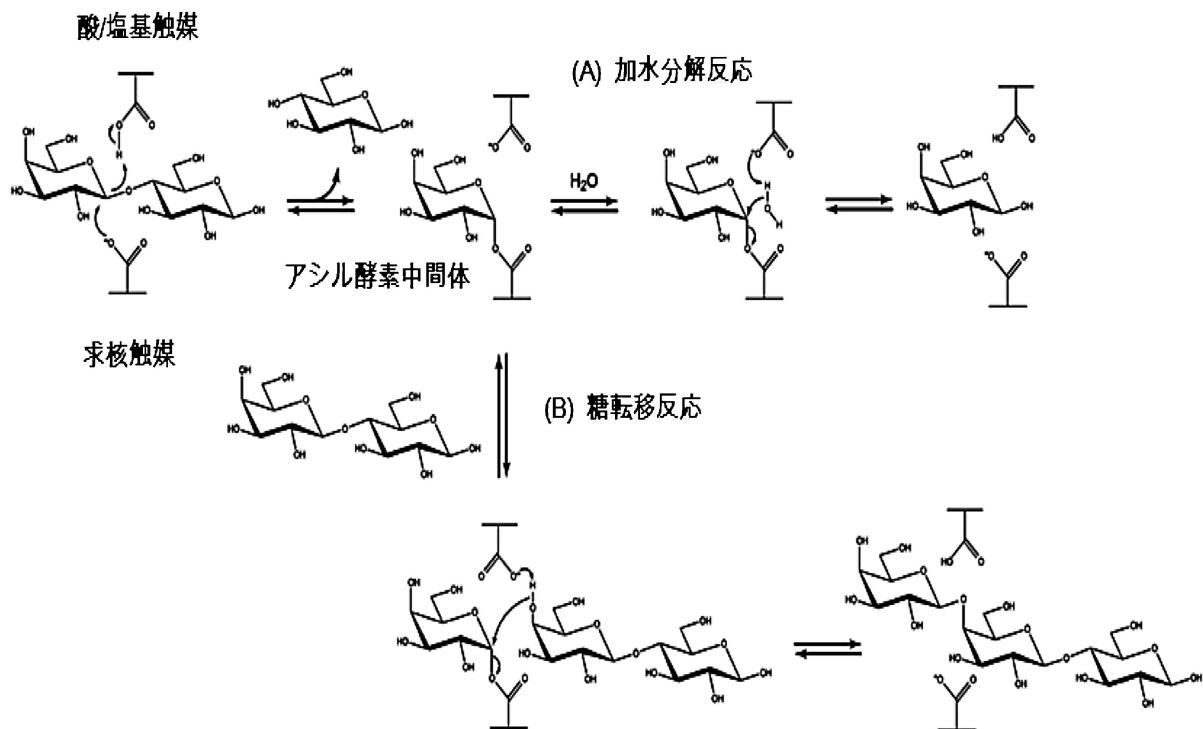


図1 β -ガラクトシダーゼの反応機構

構を、図1に示した。この反応では、アシル酵素中間体を介して加水分解反応(A)と糖転移反応(B)が起こる⁶⁾。

すなわち、反応の第一段階では、求核触媒によるグリコシド結合への攻撃、酸触媒によるプロトンの供与が起こり、求核触媒とガラクトースが共有結合を形成するアシル酵素中間体ができる。水分子存在下では、主として加水分解反応が起こる。塩基性触媒が脱プロトン化することで、活性化した水分子がアシル酵素中間体に求核攻撃し、ガラクトース分子が遊離する。また、水分が少ない高濃度の乳糖存在下では、加水分解反応よりも糖転移反応が優先する。塩基性触媒の脱プロトン化により活性化した糖は、アシル酵素中間体に求核攻撃し、ラクトースにガラクトースが結合したガラクトシルラクトース(3糖)が遊離する。ラクトースの代わりに3糖や4糖が存在すると、より高分子のオリゴ糖ができることになる。一連のガラクトースが転移したオリゴ糖をGOSと呼ぶ。

このような反応機構から、基本的には乳糖の基質濃度が低い(水分子が多い)条件では加水分解が起こりやすく、基質濃度が高い(水分子が少ない)条件では糖転移反応が起こりやすいことになる。また、 β -galは起源の違いによってアミノ酸配列やタンパク質の構造などが大きく異なるため、加水分解能や糖転移能も異なることが知られている。

細菌や酵母、カビ起源の β -galの一部の構造はPDB (Protein Data Bank) に登録されている。基

本的には、 β -galの活性中心付近の構造が乳糖分子よりも水分子が入りやすい構造であれば加水分解活性が高くなり、より乳糖分子が入りやすい構造であれば糖転移活性が高くなる。図2にPDBに登録されている2種類の β -galの触媒残基付近の構造を示した。Aの酵母(*K. lactisi*)の β -galでは、活性中心の触媒残基への入口が非常に狭いため乳糖分子よりも水分子が入りやすい構造であるのに対して、Bの細菌(*B. circulans*)の β -galでは触媒残基への入口が大きく開いているために、乳糖分子が酵母 β -galより入りやすい構造をしていることが分かる。酵母由来の β -galは、とくに乳糖の加水分解反応が高いことが知られているが、この特性は酵素分子の立体構造からも推定される⁷⁾。

2-2 酵母由来の β -gal

乳糖分解乳の製造には、主として酵母由来の β -galが使用されている。これは、牛乳(ホルスタイン種常乳)のpHが6.5-6.7であり、酵母由来の β -galの至適pHと同じ中性領域であることと、最終的には乳糖がほぼ100%分解できる酵素の特性によるものである。酵母の代表的な生産菌である*K. lactis*は、オランダの微生物学者Albert Jan Kluyver(1888-1956)によって発見・命名された酵母である。古くはモンゴルなどの中央アジアで広く飲まれている馬乳酒(クーマス)製造で利用され、乳への利用では長い歴史を持つ。本酵素は、日本の食品衛生法はもとより米国や欧州など各国の食品加

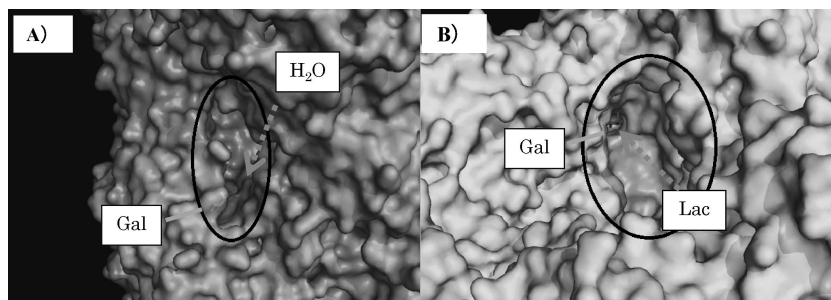


図2 A) 酵母 β -ガラクトシダーゼ(*K. lactis*, PDB accession code 3OB8)
B) 細菌 β -ガラクトシダーゼ(*B. circulans* sp. *alkalophilus*, PDB accession code 3TTY)
灰:ガラクトース分子, 黒の円:触媒残基の入り口

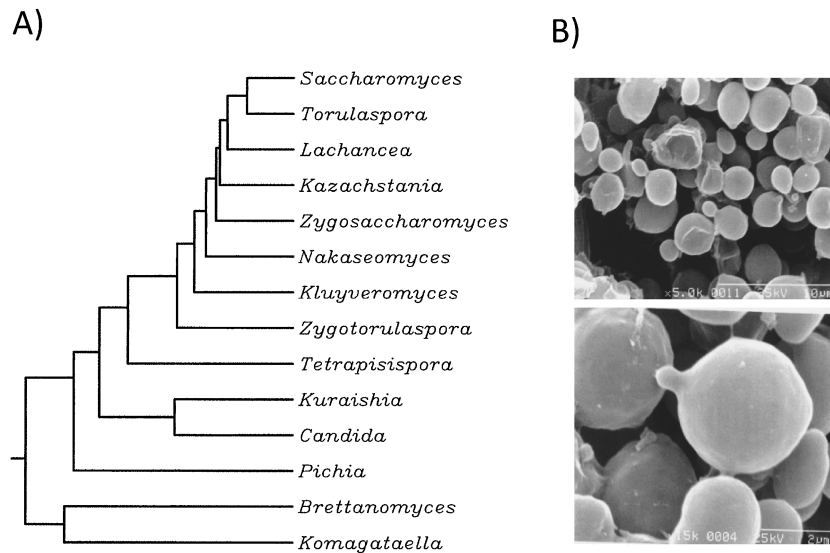


図3 A) サッカロミセス科酵母の系統樹 (23S rDNA Clustal W 解析)
B) *K. lactis* 酵母の電子顕微鏡像 (SEM 画像)

工用酵素としてもその使用が広く認められている。

K. lactis は、酒造りなどで有名な *Saccharomyces cerevisiae* と同じ *Saccharomycetaceae* (サッカロミセス) 科に属する出芽酵母であり (図3), *S. cerevisiae* と異なり乳糖を資化利用することができる。これまで *K. lactis* に関しては多くの研究が報告され、2004年には全ゲノム配列の解読が終了し⁸⁾、2013年には β -gal の生産メカニズム等も解明されている⁹⁾。合同酒精(株) (東京) は、1970年代に乳製品から *K. lactis* を分離し、その後自然突然変異による育種で生産性の向上や夾雑酵素の除去などを行い「GODO-YNL」として β -gal が上市されている。この酵母は30年以上の育種を続けているが、 β -gal 本体の構成遺伝子は野生型と比較して変異が起こっておらず、 β -gal 生産系が極めて安定であることを示している。*K. lactis* 由来の β -gal の開発については、優れた総説があるので参照して頂きたい¹⁰⁾。塩田らは、 β -gal の生産性を上げることは重要な問題と捉え、構造遺伝子である *LAC4* をベクターに組み込んで導入を試みた。すなわち、トリミングにより *K. lactis* より外来遺伝子を除去し、全て宿主由来の遺伝子で構築したゲノム組み込み型のセルフクローニング株の創出にも成功し、生産性の向上が確認されている。

K. lactis 起源の β -gal は、1,025個のアミノ酸残基からなる分子量117,628 (約118 kDa) のタンパク質であり¹¹⁾、活性発現には2量体や4量体構造が必要であるとされる¹²⁾。本酵素の活性化には、カリウム (K) イオンが不可欠であり、マグネシウム (Mg) イオンやマンガン (Mn) イオンなどの2価金属イオンが酵素安定性には必要である¹³⁾。酵母 β -gal の酵素学的な特徴は、中性 (pH 6.5) 付近で最も活性が高く、熱安定性が他の酵素と比べるとやや低い (図4)。乳糖に対する親和性は、他の微生物起源の β -gal と比較して約4-8倍も高い特徴を示す¹⁴⁾。牛乳の pH は6.5付近であり、K や Mg などのミネラルが多量に含まれていることから、*K. lactis* 起源の β -gal は乳中の乳糖を最も効率的に分解することが理解できる。

反応開始2時間後の乳糖の分解率が50%となるよう各種基原の異なる β -gal を乳に添加すると、50%以降の分解速度は酵母 β -gal が最も速く開始され、約24時間ではほぼ100%に到達する (図5A)。これは K_m 値 (最大反応速度の1/2を与えるときの基質濃度) の違いや生成物阻害を受けにくい酵素の性質によるもので、酵母 β -gal は乳糖の濃度が低くても効率的に分解できることを意味している。市販の各種酵母 β -gal の乳糖分解曲線を比較すると、

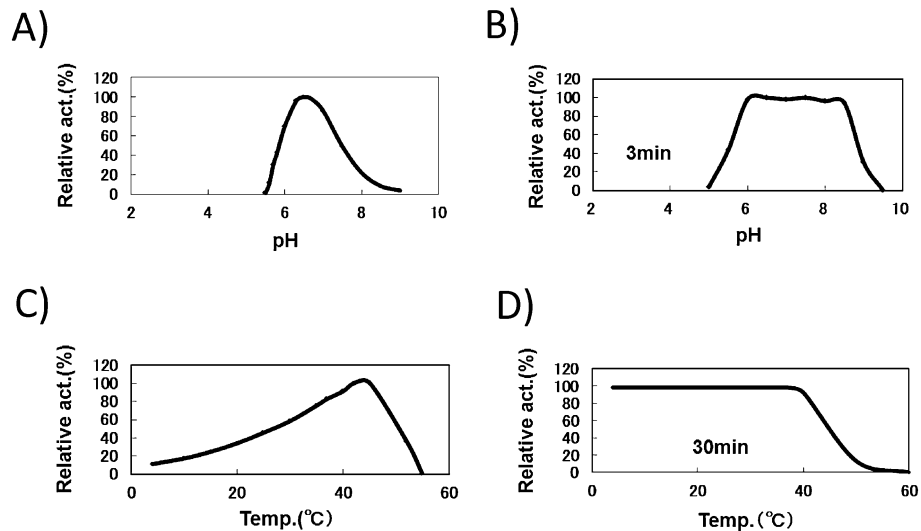


図4 A) 至適pH (37°C), B) pH安定性 (37°C, 3分)
C) 至適温度 (pH 6.5), D) 温度安定性 (pH 6.5, 30分)

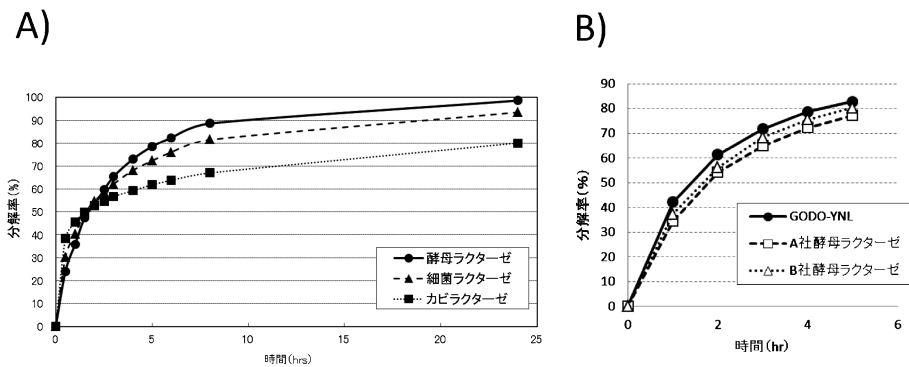


図5 A) 起源の異なる β -ガラクトシダーゼの乳糖分解曲線
(試料は牛乳, pH無調整, 10°C, 酵素添加量は, 酵母0.08 (w/v)%, 細菌0.2%, カビ0.2%)
B) 市販酵母 β -ガラクトシダーゼの乳糖分解曲線
(試料は牛乳, pH無調整, 10°C, 酵素添加量はすべて0.10 (w/v)%)

GODO-YNLはカビや細菌由来の他酵素と比べて高効率で乳糖を分解することが確認できる(図5B)。これは培養法や精製法の検討により、プロテアーゼやリパーゼなどの夾雑酵素含量が低く、安定性の高い β -galが誘導されている点も重要である。 β -galに限らず、市販・流通されている酵素剤のほとんどが主酵素とそれ以外のタンパク質成分を含むクルードな製品であり、いかにコストをかけずに夾雑する不要な酵素活性を取り除いた酵素剤を製造するかは経済的に重要である。

一般的な酵素剤の製造工程では、吸着クロマトや塩析、沈殿など物理的な方法で精製を行うことが

多いが、酵素を使用する際に不要となる夾雑酵素活性のみを除去できれば、主酵素の精製度が高い必要はない。GODO-YNLでは、除去すべき夾雑酵素を特定し、その欠損株を育種することで対応している。この酵素を生産する*K. lactis*生産株は2倍体酵母であり、少なくとも2回の変異が必要である(稀に片方がすでに欠損の場合もある)。不要な夾雑酵素を欠損した株により製造された酵素は、精製コストをかけなくとも同レベルの活性品質を達成することができる。

2-3 酵母由来以外の β -gal

酵母以外の起源の β -gal には、カビ (*Aspergillus oryzae*) や細菌 (*Bacillus circulans*) 由来の酵素が知られている。カビ由来の β -gal は至適 pH 3 付近と酸性域にあることが特徴であり、ヨーグルトなどの酸性食品の中での乳糖を分解することが可能であり、臨床的には人の胃などの酸性域でも効力を発揮する。しかしながら、酵素利用の観点からは、乳糖の分解により生成する反応生成物である遊離のガラクトース分子により活性阻害を受けるのが大きな欠点である。米国の FDA (食品医薬品局) では、通常の食事を栄養学的に補う目的でダイエタリーサプリメントが制定されているが、乳糖不耐症用の市販 β -gal の多くはカビ由来の酵素が用いられている¹⁵⁾。

一方、細菌起源の β -gal は、加水分解活性よりも糖転移活性の高いものが多いのが特徴である。1976年、土壌より単離された桿菌である *B. circulans* は、分子量の異なる4種類の β -gal (BgaD-A, BgaD-B, BgaD-C, BgaD-D) を生産する^{16,17)}。これらの β -gal の特徴は、BgaD-A が自身の持つプロテアーゼによって C 末端側のアミノ酸が部分的に加水分解されて低分子化された B, C および D の3種類の酵素が生じる。興味深いことに、分子量の最も大きな BgaD-A は乳糖の分解活性が高いのに対し、最も低分子の BgaD-D は乳糖への糖転移活性が最も高い性質を示す。基質特異性を除く酵素学的な性質は4種の酵素でほとんど変わらず、pH 5-9 という広範囲で有効に作用し、低温域 (約 5°C) から高温域 (65°C, 乳糖高濃度存在下) まで広温度領域で作用する。さらに、牛乳中に含まれる金属イオンの影響を受けず、遊離ガラクトースによる活性阻害も受けないのも特徴である。大和化成株式会社 (現在は天野エンザイム株式会社) では、培養条件を制御することで各 β -gal を選択的に作り分けることに2011年に成功した。乳糖分解活性の高い β -gal の「ラクトレス」(2000年) と、また糖転移活性の高い β -gal が「ビオラクタ」(1992年) として製造・販売されている¹⁸⁾。

ラクトレスは、乳糖分解活性の高い BgaD-A が

主成分であり、5-40°Cの広い温度域で活性が維持され、反応産物である遊離ガラクトースによる反応阻害性は小さく、乳糖分解反応は効率よく進行するし、牛乳中の金属イオンによる影響を受けないので牛乳のロット差によるバラツキが出ないなどの特徴があった。ただし、この加水分解反応では、反応初期に3糖の GOS が一時的に生成するが、反応終期には GOS は分解されて消滅し、10°C, 24時間後には単糖と2糖 (20%) からなる乳糖分解乳が得られた。これは、*B. circulans* の生産する β -gal は、基本的には糖転移能力の高い加水分解酵素であることを示していた。

2-4 β -gal の食品産業への利用

β -gal の加水分解性を使用した乳製品の開発は、古くから乳業メーカーで検討されてきた。国内では、乳以外にも発酵乳やアイスクリーム、練乳なども商品化されている。海外では、 β -gal を使用している乳および乳製品の種類は日本よりはるかに多く、北米や欧州では陳列されている半数近くの乳製品にラクターゼが使用されている売り場もある。最も使用例の多い *K. lactis* の乳および乳製品に対する利用性については、優れた総説がある¹⁹⁾。

乳業メーカーでは、おなかゴロゴロ (乳糖不耐) 以外にざらつき (乳糖結晶) 防止、低甘味などが挙げられ、これらの課題を解決するために β -gal が利用されている。その結果、組織の滑らかなアイスクリームや練乳などの商品化が可能となった。乳糖の分解により生じるグルコースはショ糖の70-80%の甘味を有するので、その他の甘味料を敢えて添加する必要がなく、「砂糖不使用」や「甘味料無添加」と表示した乳飲料や発酵乳などの商品化が可能となった。最近では、構成する糖質の変化により味質が変化することで、乳の濃厚さが増す効果 (リッチ感の獲得) やミルク臭の低減などのサイド効果が認められている。

具体的な *K. lactis* 由来の β -gal の使用例は以下のようである。

- 乳飲料：生乳をチルド状態で β -gal を作用させ、

乳糖分解後に殺菌と同時に酵素活性を失活させ充填する方法と原乳を初めに殺菌し、適温でラクターゼを作用させ、乳糖分解後に殺菌と酵素失活を同時に行い充填する方法がある。

前者では4℃下の酵素反応は16-20時間の長時間がかかるが、後者では30-40℃下での短時間の酵素反応で済むという違いがある。

• 発酵乳：原乳を殺菌後、乳酸菌と共にβ-galを添加し、発酵条件下で乳糖を分解させる。乳酸菌のみの発酵では乳糖の約20-40%しか分解されないが、β-galを作用させると50%以上の乳糖を分解され、しかもpHが5以下の発酵終期では添加酵素も失活しているという合理的な製造方法である。

練乳：原乳を殺菌し3倍程度に濃縮し、その後β-galを添加して乳糖を分解し、さらに加熱濃縮する。濃縮時の加熱により褐変反応(メイラード反応)が進み、香ばしいキャラメル風味を付与できる。

• アイスクリーム：組織中での乳糖の結晶化によるザラつきを軽減するために、日本では微細な乳糖結晶を加えるシーディングが行われているが、海外ではβ-galによる代替技術が一般的である。原乳に事前にβ-galを添加して乳糖を分解することで、低乳糖アイスクリームが製造可能となる。

最近の食品業界では、糖質ゼロ、脂質ゼロやカロリーオフなど、健康を意識した食品が数多く商品化され、この傾向は乳業界においても同様である。無脂肪乳製品や微糖など健康志向の乳製品が数多く商品化され、β-galの市場拡大に繋がっている。酵素処理により乳糖が減少することで、発酵後の酸度上昇も抑えられ、各種製品の風味変化も抑制できる。

また、β-gal処理により甘みが増加し過ぎたり、褐変反応が増加するという酵素処理による負の側面もある。乳中の乳糖の約70%分解は、2%ショ糖添加と同様の甘みが増加する。Vasalaら(1996年)は、乳糖分解UHT乳の甘みを減少させるために、クエン酸、マレイン酸、グルコン酸、乳酸などの有機酸のカリウム塩を添加した。また、加熱処理製品中では、還元糖の増加はより強いメイラード反応の原因ともなるので注意が必要である。

3. β-ガラクトシダーゼによる糖転移反応

β-ガラクトシダーゼ(β-gal)によるガラクトース(以下Gal)転移反応に関しては、比較的早くから研究され、多くの報告がある²⁰⁾。最も良く知られた研究はFrançois JacobとJacques Lucien Monodによる大腸菌のラクトースオペロン発現調節に関連する乳糖分子内転移反応によるアロラクトース(allolactose)生成についての報告であろう。また、欧米においてチーズ生産時の余剰廃棄物であった乳糖の利用を目的として、*Asp. Oryzae*や*Asp. niger*などのカビ由来β-galによる加水分解反応時に、比較的低濃度の乳糖溶液中で乳糖にGalが転移した6'-galactosyllactose(GL)の生成が報告されている²¹⁾。とくに、この6'-GLは、後に当時神戸大の山下および木幡らによりヒト母乳から同オリゴ糖が分離同定された²²⁾。その後、GLはヒト消化管内でビフィズス菌の選択的増殖効果を示すことが見いだされ、母乳成分であることもあり、我が国を中心にGOSの機能性オリゴ糖として開発研究に発展した。

本稿では、工業的GOS生産を目的とした筆者らの研究の経験を基に、β-galのGal転移活性について概説する。

β-galの食品生産分野での利用については、余剰乳糖の利用、乳糖不耐症対策としての乳糖の分解、また乳糖の甘味度の向上などを目的にさまざまな検討が行われてきた。その際、乳糖を加水分解することが目的であったにもかかわらず、反応系に一定量の乳糖異性体や乳糖に1ないし数個のGal分子が転移したGLが生成することが見いだされた(図6)。

当初*Asp. oryzae*や*Asp. niger*由来のβ-galは既存添加物として記載されており、入手が容易で使いやすいことから、多くの利用研究が進められた。また、一方ではより乳糖加水分解効率の高い酵素の選別なども行われた。結果としてβ-galには、比較的Gal転移活性の高い酵素と転移生成物を生じにくい酵素の存在が理解されるようになった。

筆者らは、20年ほど前から、上市されていて入手が容易なβ-galについて糖転移活性の検討を行っ

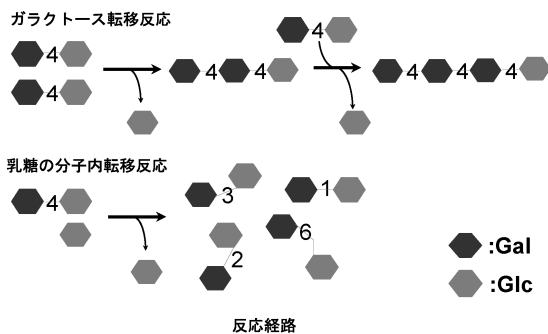


図6 β -ガラクトシダーゼによる乳糖転移反応生成物の生成経路(市販酵素:ピオラクタを例に)

てきた。その際、生成するオリゴ糖の収量や構造を迅速に決定する必要が生じたが、当時はオリゴ糖の分離分析を簡便に行う有効な手段がなく、 β -galの転移反応を系統的に行った研究はほとんど見られなかった。

当時のオリゴ糖研究は、ペーパークロマトグラフィーやゲル濾過(GPC)による糖鎖長の分析と、入手可能な標準試料を用いた移動度による同定などが基本であった。

こうした環境の中で、1991年7月の「栄養改善法施行規則の一部を改正する省令」(厚生省令第41号)に基づき、特定保健用食品制度(トクホ)が施行された。日本発の新たな機能性食品素材であるオリゴ糖による機能表示が許可されることとなり、種々のオリゴ糖がトクホ表示許可取得に向けて開発された。

トクホでは機能性への関与成分の分析法の確立が義務とされ、オリゴ糖の迅速簡便な分析手法の開発が求められた。

β -galによる乳糖転移生成物は乳糖の異性体を含み、主に糖鎖長の異なるGLの混合物であり、基本的に構造異性体(位置異性体)混合物として得られる。使用する β -galのGal転移活性の詳細を理解するためには、生成した糖鎖の構造と収量を正確に知ることが重要である。

筆者らの例では、トクホ申請の際に、当時の審査担当者からオリゴ糖構成成分の標準物質の提出と詳細な構造情報の提示が求められ、構造の類似したオリゴ糖の迅速簡便な分離・分析技術の開発に取り組

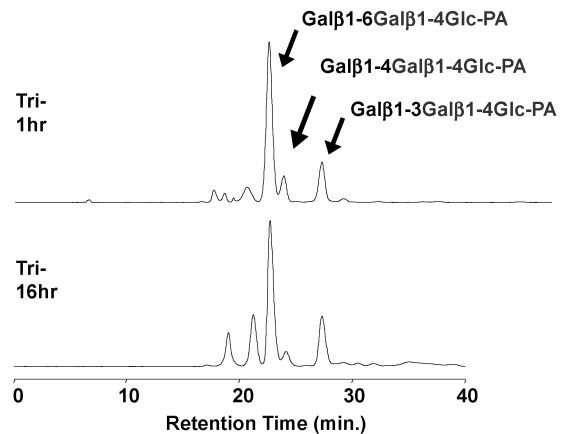


図7 *Aspergillus oryzae*由来の β -ガラクトシダーゼによる乳糖転移生成物の経時的な成分変化

む必要が生じた。

GOSは基本的に、乳糖にGalが転移した還元性糖鎖である。種々検討した結果、当時、阪大の長谷らにより開発された2-アミノピリジン誘導体化による還元アミノ化法を応用し、UV検出によるODS-HPLCを用いた解析手法を構築した²³⁾。この分析法では、D-グルコース二糖のセロビオース異性体やマルトース異性体などの8種の二糖異性体がODS-HPLCで完全に分離でき、三糖以上のGOSについても、あらかじめGPCにより糖鎖長別に分離しておけば、異性体をほぼ完全に分離することが可能であった(図7)。

効率的な分析技術が整って、種々の β -gal転移反応生成物の解析を開始すると、それまで詳細が明らかになっていなかったGal転移の特性に関する興味深い知見が得られた。 β -galによるGal転移反応は多様であり、各種 β -galを用いて乳糖を基質に転移反応を行うとGOSが生成するが、酵素ごとに生成物には異なる特徴が見られる。特徴の一つ目は、酵素により転移生成物の収量の上限が大きく異なる点であり、二つ目は転移生成物の構造に違いや特徴があり、特に乳糖の非還元末端Galに対して極めて厳密な位置特異性を示す酵素が存在することである。そして、三つ目は予想を超えて低濃度の基質で転移生成物を与える酵素が存在することであった。こうした結果は、個々の酵素について断片的には報

告されていたが、整った条件下での比較検討は行われていなかった。

3-1 乳糖転移反応の特性

確立した技術を用いて筆者らが解析した例を以下に示す。

1) *Asp. oryzae* 由来 β -gal による乳糖転移反応

乳糖からのオリゴ糖転移生成物の収量は最大で約30%程度で、主要な生成物は「6'-GL」である²⁴⁾。反応時間ごとの転移生成物の収量と組成を比較してみると興味深いことが見えてくる。多くの場合こうした転移反応は工業的にはバッチ処理 (*in situ*) で実施される。加水分解酵素であることから生成したGLも加水分解の基質となり、反応の初期すなわち基質乳糖と生成物の濃度差が著しく乳糖に偏っている時期と、反応後期すなわちオリゴ糖が蓄積し乳糖濃度が減少した時期とでは組成に違いがあると考えられる。しかし、*Asp. oryzae* 由来 β -gal においては図7に示す通り反応初期と後期において生成物の組成はほとんど変わらない。このことについては他の酵素の例と比較して後述する。

2) *Str. thermophilus* 由来 β -gal による乳糖転移反応

本酵素はヨーグルト調製に使われる乳酸菌由来の酵素であり、ヨーグルト中にオリゴ糖の生成を認めたことから、使用乳酸菌の β -gal について解析したところ、牛乳中の低乳糖濃度でも GOS が生成することを見出した。主要な Gal 転移生成物は「3'-GL」である。本酵素について *Asp. oryzae* 由来 β -gal と同様に、反応初期の生成物とオリゴ糖収量が最大値となる時間の生成物の構造と組成を比較した。すると、その組成は著しく異なっていた。反応初期のオリゴ糖生成物はほぼ 3'-GL であったが、反応後期では 6'-GL が主な生成物で、3'-GL の割合は少なかった (図8)。そこで、反応の時間を追って生成物の組成を解析したところ、本酵素は本来、乳糖の非還元末端 Gal の3位への転移生成物を与える高

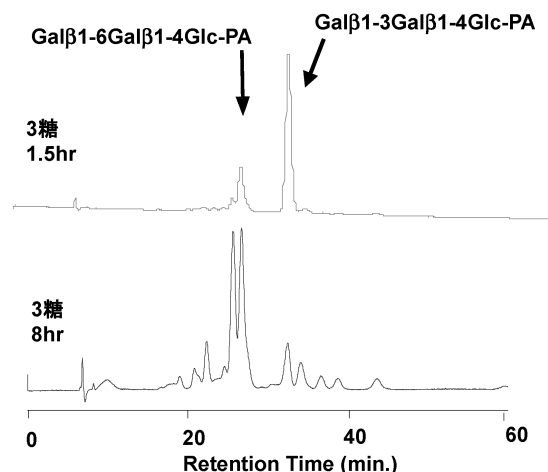


図8 *Streptococcus thermophilus* 由来の β -ガラクトシダーゼによる乳糖転移主要生成物の経時的変化

い位置特異性を有するが、生成した Gal β 1-3Gal 結合は同酵素による加水分解速度も速く、良好な基質 (Gal 供与体) となることが明らかになった。そのため、反応が進行し乳糖濃度が減少すると 3'-GL は Gal の供給源となり、3'-GL は減少する。一方、反応後期に見られた 6'-GL は、生成速度は遅いにもかかわらず加水分解速度されにくい (相対速度が遅い) ことにより、反応系に蓄積して残ることが明らかとなった。過去に、*Str. thermophilus* 由来 β -gal による乳糖転移反応では 6'-gal が主な生成と報告されているのはこうした性質を表していると考えられた。反応の時間を調節することにより、3'-GL を高純度で調製することも可能である²⁵⁾。

近年、3'-GL を生産する技術としては *B. bifidum* 由来 β -gal の遺伝子をクローニングした酵素による生産技術が英国で開発されている²⁶⁾。

3) ビオラクタ (*B. circulans* 由来 β -gal) による乳糖転移反応

現在、世界的な視点で GOS の生産量を見ると、約9割が本酵素を使用して調整されている。本酵素は複数の同系列の酵素を含む混合物であるが、各酵素による転移生成物の構造には大きな違いはなく、乳糖転移活性には多少違いが見られる。オリゴ糖の収率を高める目的で、この点が検討されている。

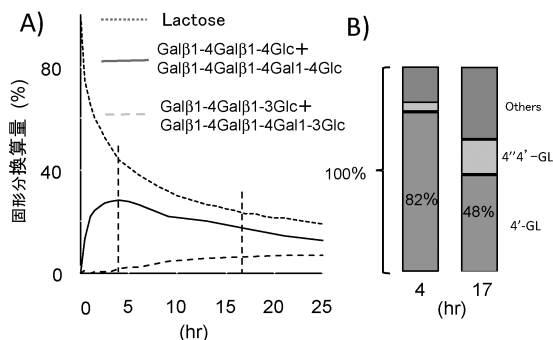


図9 A) *Bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼによる乳糖転移生成物の経時的変化
B) 生成オリゴ糖の存在比と4'-GLの存在比率

本酵素は、乳糖非還元末端のGalに対しては極めて厳密にGalがβ1-4結合した転移生成物を与える。前述の2種の酵素に比べると、オリゴ糖の対乳糖収率は高く、最大で60%近くに達する。本酵素の生成物を反応初期と反応後期で比較すると、反応初期には4'-GLが主要な生成物で、オリゴ糖中の純度も極めて高い(図9)。しかし時間の経過と共に3糖の量が減少し、Galが非還元末端Galの4位に逐次転移した4糖、5糖および少量の6糖が生成する。

ここまで3種のβ-galについて乳糖転移反応の特性を概説した。主要な生成物の生成経路は述べた通りであるが、現実には生成物の組成を複雑にする要因が他に存在する。

3-2 乳糖異性体二糖の生成

上記3種の酵素は、単純に2分子の乳糖から1分子のGal転移生成物と1分子の遊離グルコース(以下Glc)を生成するかのように説明してきたが、実際にはもう少し複雑な結果を与える(図10)。

基質である乳糖の割合が反応液中で高いときには理想的な転移反応が進行するが、乳糖の比率が低下してくると、生成したGlcに対する転移生成物、すなわち乳糖異性体(転移2糖)を生じ蓄積する。さらに、転移2糖にGalが転移した生成物や、Galを還元末端とするGalのみからなるオリゴ糖の生

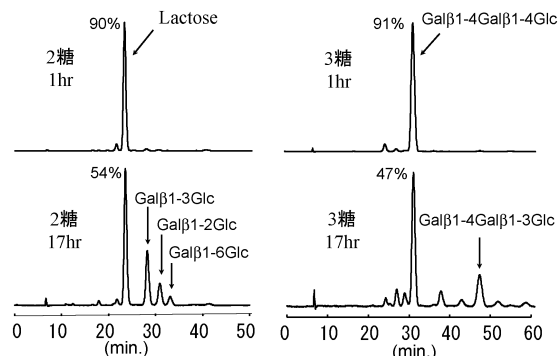


図10 *Bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼによる乳糖転移生成物の経時的変化

表2 種々のβ-ガラクトシダーゼのガラクトシルラクトースに対する相対分解速度

酵素の起源	6'-GL	4'-GL	3'-GL
酵母			
<i>Kluveromyces lactis</i>	2+	—	1+
<i>Saccharomyces fragilis</i>	3+	—	2+
細菌			
<i>Bacillus circulans</i> Type II	—	3+	—
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	3+	—
<i>Streptococcus</i> 6646K	1+	3+	3+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1+	—	3+
<i>Escherichia coli</i>	—	—	3+
カビ			
<i>Aspergillus oryzae</i>	1+	3+	3+
<i>Aspergillus niger</i>	1+	2+	2+
その他			
Jack Bean	1+	—	1+
<i>Charonia lampas</i>	1+	1+	1+

成物などが認められるようになる。すなわち還元末端の構造が乳糖以外のオリゴ糖が一定量生成することとなる。結果としてGOSは複雑なオリゴ糖混合物になっていく。さらに、少量であるが、非還元糖であるGal1-1Glcの生成も確認された²⁷⁾。これらの乳糖異性体(転移2糖)も難消化性で、GOSの成分として機能することが確認されている²⁸⁾。

3-3 転移反応の位置特異性

改めて前述の酵素のGal転移反応の位置特異性について考察する。

種々のβ-galを用いて調製し精製した6'-GL, 4'-GL, 3'-GLを基質として、各種β-galの非還元

表3 主要なβ-ガラクトシルラクトースの乳糖および乳糖異性体に対する相対分解速度

微生物の種類	β1-4結合	β1-3結合	β1-2結合	β1-6結合
酵母				
<i>Kluveromyces lactis</i>	100	110	27	48
細菌				
<i>Bacillus circulans</i> Type II	100	93	49	2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	77	24	48
<i>Escherichia coli</i>	100	40	180	260
カビ				
<i>Aspergillus oryzae</i>	100	760	400	170

表4 各種β-ガラクトシダーゼによる乳糖転移反応時のガラクトース転移の位置特異性

微生物の種類	特異性	主生成オリゴ糖
<i>Bacillus circulans</i> Type II	高度	4'-GL
<i>Cryptococcus laurentii</i>	高度	4'-GL
<i>Escherichia coli</i>	中程度	3'-GL
<i>Streptococcus thermophilus</i>	中程度	3'-GL, 6'-GL
<i>Kluveromyces lactis</i>	低度	6'-GL, 3'-GL
<i>Aspergillus oryzae</i>	低度	6'-GL, 4'-GL, 3'-GL

末端 Gal-Gal 結合間の加水分解反応の相対速度と、乳糖および乳糖異性体 2 糖の Gal-Glc 間の加水分解の相対分解速度を求めた。結果を表2および表3に示した。

この結果から加水分解反応と転移反応の間には強い相関の見られる酵素と、相関の見られない酵素とが存在することがわかる。*Asp. oryzae* 由来のβ-galは、加水分解速度はGalβ1-3Galが高いが、転移生成物はGalβ1-6Galを主に生成する。一方*Str. thermophilus*のβ-galはGalβ1-3Gal結合の糖鎖を反応初期の転移生成物として与えるが、加水分解速度も速い。同様のことは「ビオラクタ」(*B. circulans* 由来β-gal)においても認められ、Galβ1-4Gal結合に対する転移と加水分解の位置特異性が高い。事実、筆者らが解析した結果では、ビオラクタによる転移性オリゴ糖生成物のGal-Gal間の結合は、ほぼ完全にβ1-4結合のみで構成されていることが確認されている(表4)。

最近になって、オランダの研究グループがDomo社のビオラクタで調製されたGOSについて詳細な

構造解析の結果を報告した^{29,30)}。その報告では、原理的に定量性に欠ける分析法が用いられているが、Gal-Gal結合はβ1-4結合が多いものの、β1-4結合以外の結合様式の糖鎖も含まれるとされており、筆者らの結果とは異なっている。筆者らの経験では、酵素反応時の温度が高い場合や、原料乳糖の残存率が25%以下の場合、反応速度論的に著しく遅い生成物が蓄積する傾向が認められたことから、DOMO社のオリゴ糖の調製条件がかなり過酷な条件であると推察された。

我が国の特定保健用食品制度では、高純度、安全・安心、が第一に求められることから、可能な限り生成物の組成を単純にすること、また機能性が明確な糖鎖の含有率を高めることを目標としてオリゴ糖調製技術の開発が進められてきた。

3-4 GOS糖の機能と安全性

オリゴ糖の開発に関わっていた際に、しばしばビフィズス菌にとって最も望ましいオリゴ糖の構造は何かという質問を受けた。実は、答えはそれほど単純ではない。GOSが消化管内でビフィズス菌の菌数を増加させることは、実験により明らかになっているが、試験管内で各種のビフィズス菌による発酵性試験を行うと、GLの構造により菌種、菌株ごとに生育速度が異なっている。これは、食品としては6'-GLや4'-GLを単独で用いるよりも、それらの混合物が望ましいのではないかと考える根拠でもある。ビフィズス菌のβ-gal遺伝子の解析でもこのことが予想される結果が得られており、特異性の異なる複数の酵素が糖代謝に関連して機能していることが明らかになってきている。

また筆者らの最近の研究で、ヒト消化管下部ではビフィズス菌と共生する優性細菌類が菌体外でオリゴ糖を加水分解し、生成した還元末端由来の乳糖をビフィズス菌が効率よく利用する可能性が示されている^{31,32)}。経口的に摂取した乳糖は消化管上部で腸上皮由来β-galにより分解され吸収されるが、大腸内で生成する乳糖はビフィズス菌の高い乳糖利用活性によって速やかに利用されるとする考えである。

この場合も GL の構造は単一であることが望ましいとは言えない。

幸い、日本で生産量の多い GOS のオリゴメイト 55N (ヤクルト薬品工業社) は、複数の β -gal をタイミングよく利用することで、適度な割合で 4'-GL, 6'-GL, 3'-GL を含んでおり、前述の目的を実現し、ビフィズス菌の利用性のスペクトラムを広げる工夫がなされている³³⁾。

GOS に関しては、世界規模ではヨーロッパのメーカーによるものが市場を席捲しているが、このオリゴ糖は、東南アジアで大規模なアレルギーの発症が報告された経緯があり、その原因がビオラクタの特性にあることが筆者らの研究から明らかにされている^{34,35)}。我が国で生産販売されているオリゴメイト 55N および日新製糖社のカップオリゴの 2 製品は共に、アレルギーリスクの無い、独自に選択された β -gal が利用されており、副反応が起こりにくく、乳糖の転移効率の高い酵素が選択されている点が高く評価されている。

4. おわりに

以上の様に、 β -gal には加水分解反応あるいは糖転移反応の特性があり、それらの酵素の種類を選ぶことで今後の産業に資する重要性はますます増加するだろうと思われる。そのためには益々 β -gal の世界市場での要求は増え、さらに最近では、遺伝子組換え微生物 (GMO) により生産される「GM ラクターゼ」も開発されるようになった。チーズ製造で使用される凝乳酵素であるキモシンは、現在の世界市場では GM キモシンが約 60% 以上を占め、天然物の子牛の第 4 胃から抽出した酵素 (カーフレンネット) は約 10% 以下へと大きく減少している。これは、カーフレンネットは子牛をと殺しなくては得られず、動物愛護の観点や貴重な生物資源の確保の観点からの減少傾向にある。我が国でも、遺伝子組換え酵母などから製造した GM キモシンは、国から安全だとして許認可されており、市販もされている。キモシンの遺伝子組換えホストとして利用されているのも *K. lactis* である。また、欧米では使

用する微生物は遺伝子組換え体でも、生産される酵素などの製品は安全であるという考え方が一般化しつつあり、日本でもこのような考え方が将来は広く認識されることが予想されている。

このような風潮の中で、すでにビフィズス菌から単離した β -gal を遺伝子組換え微生物 (酵母) で大量調製することに成功している海外の企業もあり、製造販売が開始されている。将来的には、世界の β -gal 市場も天然酵素と GM 酵素が共存する時代は、まちがいに来るだろう。

また、本稿では十分に触れられなかったが、ラクターゼは医療用に使用する場合もある。アメリカなど乳糖不耐症者の比率が高い国では、乳および乳製品を摂取した直後に、自らラクターゼのタブレットを服用して、不快症状を抑えるということは珍しくない。アメリカで市販されているラクターゼには「ラクトエイド」などの商品が良く知られており、薬局ではこれらのラクターゼ薬を簡単に購入することができ一般化している。日本ではまだこのような製品はない。

また、家庭で飼われる犬や猫などのペットも、高齢化が進んでいる。これらの高齢化した動物用のラクターゼ牛乳も開発され、市販されている。家庭で飼われているペットの数は膨大な数に上り、将来的にもこの市場で必要とされるラクターゼ酵素量も増大することが予想される。今後のラクターゼ市場の増大は大いに見込まれるので、将来的にも大変に期待できる分野であると考えられる。

その他、乳中の乳糖の分解を、固定化酵素法で行う場合もある。商業的に成功している例では、*K. lactis* のラクターゼをセルロースアセテート繊維中に固定化して使用する。この固定化酵素は約 100 日使用可能であり、乳中の約 75% 以上の乳糖分解率が確認されている。この手法では、酵素のコストを最小限にし、最終製品から酵素を除去することが最終目標である。

謝辞：

β -gal による乳糖転移反応に関するデータは、筆者（木村）らがヤクルト本社中央研究所において、実施した GOS 開発の経験をもとにまとめました。研究の機会を与えて頂きました、ヤクルト本社中央研究所所長に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 井本泰治, β -ガラクトシダーゼ, 酵素ハンドブック第3版 (八木ら編集), 朝倉書店, 581-582 (2008)
- 2) 齋藤忠夫, ラクターゼ, 酵素ハンドブック第3版 (八木ら編集), 朝倉書店, 604 (2008)
- 3) Richmond, M. L., Gray, J. I., and Stine C. M.: β -galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization, *J. Dairy Science*, 64, 1759-1771 (1981)
- 4) 重久 昇, ガラクトオリゴ糖, バイオインダストリー, (3), 20-31 (2017)
- 5) 多田周作, 酵素応用の技術と市場2009, シーエムシー出版, 11-18 (2009)
- 6) McCarter, J. D. and Withers, S. G.: Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 885-892 (1994)
- 7) Bultema, J. B., Kuipers, B. J. H., and Dijkhuizen, L.: Biochemical characterization of mutants on the active site residues of the β -galactosidase enzyme of *Bacillus circulans* ATCC31382, *FEBS Open Bio*, 4, 1015-1020 (2014)
- 8) Dujon, B. and Heinisch, J. J.: Genome evolution in yeast, *Nature*, 430, 35 (2004)
- 9) Rodicio, R., and Heinisch, J. J.: Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*, 30, 165-177 (2013)
- 10) 塩田一磨: *Kluyvermyces lactis* の β -ガラクトシダーゼ (ラクターゼ) の開発, 生物工学会誌, 94(5), 238-241 (2016)
- 11) Poch, O., L'Hote, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R., and Sodoyer, R.: Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase: Comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene*, 118, 55-63 (1992)
- 12) Becerra, M., Cerdan, E., and Gonzalez Siso, M. I.: Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetra-meric forms are active. *Biotechnology Techniques*, 12, 253-256 (1998)
- 13) Kim, C. S., Ji, E. S., and Oh, D. K.: Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letter*, 25, 1769-1774 (2003)
- 14) Crueger, A., and Crueger, W.: Carbohydrates, *Biotechnology*, 6A, 421-457 (1984)
- 15) 後藤真孝: 酵素利用技術大系, 株式会社エヌ・ティー・エス, 580-584 (2010)
- 16) Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, M., Yamaguchi, S., and Nakanish, K.: Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(2), 268-278 (2011)
- 17) Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, Katase, T., Hoshi, Y., Yamaguchi, S., and Nakanishi, K.: Cloning and expression of a β -galactosidase gene of *Bacillus circulans*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(6), 1194-1197 (2011)
- 18) 後藤京二: *Bacillus circulans* が生産する β -ガラクトシダーゼ製剤「ビオラクタ」および「ラクトレス」の開発と応用, ミルクサイエンス, 60(2), 105-109 (2011)
- 19) 濱口和廣: 酵母由来ラクターゼ, ミルクサイエンス, 60(2), 99-104 (2011)
- 20) Sako, T. Matsumoto, K., and Tanaka R.: Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides.,

- Inter. Dairy J.* 9, 69–80 (1999)
- 21) Park, A. R., and Oh, D, K.: Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current state and perspectives., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85(5), 1279–1286 (2010)
 - 22) Yamashita, K, and Kobata, A.: Oligosaccharides of human milk. V. Isolation and characterization of a new trisaccharide, 6'-galactosyllactose., *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 164–170 (1974)
 - 23) Kimura, K., Watanabe, Y., Ishihara, C., and Matsumoto, K.: Analysis of regio-specificity of trans galactosylation for same beta-galactosidase by pyridylamination, *XXIst International Carbohydrate Symposium (Caiens)* (2002)
 - 24) Kimura, K., Matsumoto, K., Ishihara C, Harada, K., and Miyagi, A.: Structure determination of galacto-oligosaccharides by pyridylamination and NMR spectroscopy. *Carbohidr. Res.*, 270, 33–42 (1995)
 - 25) 木村一雅・渡辺陽子・松本圭介・池田雅和・宮城昭彦・太江田和年・溝渕尚宏：3'-ガラクトオリゴ糖含有糖組成物の製造方法，特願平09-238696 (1996)：
 - 26) 木村一雅・渡辺陽子・松本圭介・宮城昭彦：市販牛乳中に含まれるガラクトオリゴ糖の分析，ヤクルト研究所研究報告集，17(1)，1–7 (1998)
 - 27) 長南 治・曾根春恵・高橋理恵・池田雅和・早川弘子・石川文保・木村一雅・松本圭介：ガラクトオリゴ糖の難消化性の検討，日本食品科学工学会誌，51，28–33 (2004)
 - 28) Osman, A., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D.: High yield production of a soluble bifidobacterial β -galactosidase (BbgIV) in *E. coli* DH5 α with improved catalytic efficiency for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides, *J. Agric Food Chem.* 61(9), 2213–2223 (2013)
 - 29) van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J. H., Dijkhuizen, L., Kamerling, J. P.: Development of a $(1)H$ NMR structural-reporter-group concept for the analysis of prebiotic galacto-oligosaccharides of the $[\beta\text{-d-Galp-(1}\rightarrow\text{x)]n\text{-d-Glcp}$ type, *Carbohydr Res.* 400, 54–58 (2014)
 - 30) van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J. H., Dijkhuizen, L., Kamerling, J. P.: $(1)H$ NMR analysis of the lactose/ β -galactosidase-derived galacto-oligosaccharide components of Vivinal® GOS up to DP5. *Carbohydr Res.* 400, 59–73 (2014)
 - 31) Akiyama, T., Kimura, K., and Hatano, H.: Diverse galacto-oligosaccharides consumption by bifidobacteria: implications of β -galactosidase—LacS operon., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 79(4), 664–672 (2015)
 - 32) Yamada, T., Akiyama, T., Hatano, H., and Kimura. In Vitro assessment of oligosaccharides assimilation by Intestinal Anaerobic Bacteria., *Milk science*, 64, 87–98 (2015)
 - 33) ヤクルト本社 Science Report No. 22 http://www.yakult.co.jp/institute/report/pdf/science_No22.pdf
 - 34) Ministry of Health, Singapore. Rare cases of allergic reactions linked to consumption of GOS. 12 JULY (2016). https://www.moh.gov.sg/content/moh_web/home/pressRoom/pressRoomItemRelease/2016/rare-cases-of-allergic-reactions-linked-to-consumption-of-gos.html
 - 35) Kaneko, K., Watanabe, Y., Kimura, K., Matsumoto, K., Mizobuchi, T., and Onoue, M.: Development of hypoallergenic galacto-oligosaccharides on the basis of allergen analysis, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 78(1), 100–108 (2014)