

博士論文

*Bacillus* sp. necolon-1 株由来のマンナーゼ

高知工科大学

工学研究科 基盤工学専攻

1096105

関 裕美

## 目次

	Page
要旨	1
序章	2
第1章 酵素の精製と定性	3
1-1 材料	3
1-2 実験方法	5
1-3 結果	9
第2章 酵素反応生成物の粘度と分子量	18
2-1 材料	18
2-2 実験方法	18
2-3 結果	19
第3章 酵素産生誘導物質	21
3-1 材料	21
3-2 実験方法	21
3-3 結果	23
第4章 酵素の食品工学的応用	26
4-1 材料	26
4-2 実験方法	26
4-3 結果	27
第5章 考察	28
5-1 酵素	28
5-2 酵素反応生成物の粘度と分子量	29
5-3 酵素産生誘導物質	31
5-4 酵素の食品工学的応用	32
第6章 結語	34
謝辞	35
参考文献	36

## 要旨

我々は 40℃で放置して腐敗したタマネギの水抽出液中にコンニャクゾル/ゲルの粘度を著しく低下させる成分を発見した。

この成分が熱 (80℃、10 分) により失活することや、その出現過程からタマネギを基質として微生物が産生・分泌する酵素ではないかと考え、崩壊タマネギに寄生した微生物のスクリーニングを試みて、コンニャクゾルに対して減粘作用をもつ物質を産生・分泌する微生物を単離した。この菌は 16SrDNA の塩基配列により *Bacillus velezensis* に近縁であることが判り、*Bacillus sp. necolon-1* として登録した。

*Bacillus sp. necolon-1* を、グルコースをタマネギ圧搾液で置き換えた Davis の最小培地で 48 時間培養した後、遠心分離して上清を回収した。コンニャクゾルに対する減粘効果を指標として、中空糸フィルターによる分画、硫酸アンモニウムによる塩析とゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを用いて酵素の精製を行った。

得られた酵素の SDS-PAGE による推定分子量は 42kDa であった。この酵素液の至適 pH=5.5、至適作用温度は 50℃、Mn<sup>2+</sup>によって阻害され、65℃で 15 分の熱処理により完全に失活した。pH=5.5、40℃での Km=5.18(mg/ml)、Vmax=7.8(μg/ml/min)であった。得られた精製酵素は LC-MS/MS によるタンパク質同定の結果、endo-β-1,4 mannanase と同定され、推定分子量は 41,893Da と算出された。

*Bacillus sp. necolon-1* をコンニャクなどのグルコマンナン類やグアガム、タラガムなどのガラクトマンナン類を培地に加え培養すると endo-β-1,4 mannanase が誘導された。また、オートクレーブ処理したタマネギ、ニンニク、ラッキョウなどのネギ類の圧搾液を加えるとより強い誘導を受ける事を見出した。そこでオートクレーブ処理をしたタマネギジュースからこの酵素産生誘導物質の単離を試みた。各種クロマトグラフィーで精製・分画したフラクションを *Bacillus sp. necolon-1* の培地に添加し、48 時間培養後の上清のコンニャクゾルに対する減粘効果を調べた。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画で高い誘導を示す 1 つのフラクションと小さな誘導を示す 2 つのフラクションを得た。糖マーカー (D(+)-Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltopentaose) を用いた場合の推定分子量はそれぞれ 281, 456 及び 655 であった。

コンニャクゾルの粘度は酵素添加後から急激に指数関数的に低下する。酵素によって一部消化され様々な分子量分布を持つようになったコンニャクゾルのサンプルを調製し、それらの各糖濃度での粘度を測定した。コンニャクゾルの粘度は、実験データを解析した結果  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  で実験式  $\eta = 0.25e^{-6.15C} M^{(2.39C + 0.36)}$  に従うと分析できた。

コンニャク溶液に酵素を添加した後にアルカリを加え熱により固化したゲルは、弾性を失ってユニークな食感/触感を持つようになる。このような酵素処理コンニャクは新しい食材として応用できる。

## 序章

コンニャクの成分は $\beta$ -1,4 結合のグルコマンナンでありマンノースとグルコースの比は 1.6 対 1 であるとされている[1]。また、32 個の糖残基につき 3 個の割合で主鎖マンノースから $\beta$ -1,3 結合による分岐があり[2]、約 19 の糖の単位のうち一つがアセチル化され[3,4]、その分子量は 1,000,000 から 2,000,000 であると言われている[5,6,7]。コンニャクグルコマンナンは水に分散、膨潤し、アルカリを加えると脱アセチル化が起こり、不可逆的なゲルが形成される[8]。アセチル基の含量は少ないにもかかわらず、その存在によってグルコマンナン分子の会合を妨げていると考えられていて、脱アセチル化が起こると、水素結合によりグルコマンナン分子が会合して、ゲルを形成すると考えられている[3,9,10,11,12]。このゲル化したコンニャクは独特の弾力のある食感を有しており、様々な料理に利用されてきた。コンニャクはヒトの消化管ではほとんど消化されないため、カロリーが極めて低い食品（100g あたり 5-7kcal）の一つとされ、低カロリー食品素材として多く利用されてきた。また、代表的な食物繊維で、解毒作用や血糖値や血中コレステロールを下げる効果や免疫増強活性があると言われている[13,14,15]。

我々の研究室ではこのようなコンニャクの利点に注目して、カロリーの低い新しいコンニャク食品造りを試みてきた。その過程において 40°C で放置したタマネギの水抽出液の中にコンニャクゾル/ゲルの粘度を著しく低下させる成分があることを発見し Geloosener-K と名付けた。

水抽出物の構成成分は大部分が糖であるが少量のタンパク質も含んでいることや、減粘効果が熱（80°C、10 分）により失われること等からこの成分は酵素ではないかと考えられた。更にこの成分は生のタマネギや高温で急速に乾燥させたタマネギの水抽出液の中には含まれていないこと、その出現過程の状況証拠からタマネギを基質として微生物が産生・分泌する酵素ではないかと考えられた。

本研究では 40°C で腐敗したタマネギから培地にコンニャクの粘度を低下させる物質を分泌する微生物のスクリーニングを試み、その 1 つを単離・同定した。次いで、この微生物が分泌するコンニャクゾルに対して減粘作用をもつ酵素の分離精製および定性を行ない、酵素産生誘導物質の検索を行った。また酵素反応によってコンニャクグルコマンナンの主鎖が切断されて様々な大きさになったコンニャクの分子量分布と、急激な粘度変化について調べ経験的に使用できる粘度と平均分子量の関係を表す式を導いた。更に酵素をコンニャク溶液に添加し成型したコンニャクゲルの特性についても調べ食品工学的な意義を検討した。

## 第1章 酵素の精製と定性

### 1-1 材料

#### ・コンニャク溶液

コンニャク精粉（特等粉，神戸万吉商店）（0.5～1.5g）を計り取り 100ml のイオン交換水に加えスターラーにて 2 時間攪拌したものをコンニャク溶液とした。

#### ・グルコマンナン溶液

Glucomanan, from Konjac (和光純薬工業株式会社: Wako) (0.5～1g) を計り取り 100ml のイオン交換水に加えスターラーにて 2 時間攪拌したものをグルコマンナン溶液とした。

#### ・タマネギジュース

市販の生タマネギを適当な大きさに刻み、ジュース（イキイキ酵素くん：Dong Ahind. Co., Ltd.）にて搾り汁と残渣とに分けた。搾り汁をガーゼで濾しオートクレーブ（(High-Pressure Steam Sterilizer BS-235, 株式会社トミー精工) 121℃、20 分）にて滅菌した。

#### ・微生物

タマネギを分離源とした *Bacillus sp. necolon-1* を使用した。

#### ・培地

M-1 : Davis の最小培地

$K_2HPO_4$ (シグマアルドリッチジャパン株式会社 : Sigma)	7g
$KH_2PO_4$ (Sigma)	2g
$MgSO_4$ (Wako)	0.1g
$(NH_4)_2SO_4$ (Wako)	1g
Trisodium Citrate Dihydrate (Wako)	0.5g
Glucose (Wako)	2g
Distilled water	1L

M-2 : タマネギ改変培地

Davis の最小培地のグルコースをタマネギジュースで置き換えた（培地 1 L に 100ml）ものをタマネギ改変培地とした。

M-3 : 無機塩培地

Davis の最小培地からグルコースを除いたものを無機塩培地とした。

#### ・緩衝液

B-1 : Tris-HCl buffer

10～20mM の Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma) を塩酸で pH=7 に調整した。

B-2 : Britton and Robinson's buffer

10～20mM のクエン酸 (Sigma)、リン酸二水素カリウム (Sigma)、ホウ酸 (Sigma)

溶液を調製し水酸化ナトリウム (Sigma) で pH を 3 から 9 まで調整した。

B-3 : 酢酸 buffer

10~20mM の酢酸 (Sigma) - 酢酸ナトリウム (Wako) で pH=5.5 の緩衝液を調製した。

・精製器具類

中空糸フィルター (孔径)

F-1 : Microza PSP-103 (0.1  $\mu$ m), 旭化成工業株式会社

F-2 : Lstep Fiber FB02-VC-FUS1582 (150,000Da), Daicn Membrems Ltd.

F-3 : Lstep Fiber FB02-VC-FUS0382 (30,000Da), Daicn Membrems Ltd.

F-4 : Microza AHP-1010 (3,000Da), 旭化成ケミカルズ

ゲル濾過クロマトグラフィー

パッキドカラム

Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200HR (1 $\times$ 10<sup>3</sup>~8 $\times$ 10<sup>4</sup>Da), Pharmacia  
ポンプ

P-1 : UF-3020P, Uniflows

検出器

D-1 : SPD-10A UV-VIS Detector, Shimadzu

D-2 : RID10-A Refractive Index Detector, Shimadzu

フラクションコレクター

SF-2120 Super Fraction Collector, Advantec

クロマトパック

C-R7A plus, Shimadzu

標準物質 (Da)

S-1 : Transferrin (81,000), Wako

S-2 : Ovalbumin (45,000), Calbiochem

S-3 : Myoglobin (17,600), Sigma

S-4 : Blue Dextran (2,000,000), Sigma

S-5 : Dextran (200,000~300,000), Sigma

S-6 : Dextran (40,000), Sigma

イオン交換クロマトグラフィー

カラム

Q Sepharose Fast Flow 1 $\times$ 5ml, Amersham Biosciences

・測定キット

タンパク定量

BCA Protein Assay Kit, Poerce

マンナーゼ活性

AZO-Carob Galactomannan, Megazyme International Ireland Ltd.

・その他器具類

SDS-PAGE

電気泳動装置 PowerStation 500VC AE-8270, ATTO Co., Ltd.

ミニスラブゲル作製キット, ATTO Co., Ltd.

泳動プレート 120mm(W)×102mm (L)

ゲルサイズ 90mm(W)×80mm (H)×1mm(D)

染色試薬 Coomassie brilliant blue R250,

薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層板 シリカゲル 60F<sub>254</sub> 20×20cm, Merck Ltd. Japan

展開溶媒 n-ブチルアルコール (Wako) : エタノール (Sigma) : 水=5 : 3 : 2 (v/v/v)

検出試薬 ナフトレゾシノール (Wako) 0.2g とジフェニルアミン (Wako) 0.4g を 95% エタノール 100ml に溶解 (A)。使用直前に濃硫酸 (Sigma) 4ml と A 96ml を混合。

分光光度計

A-1 : UV-mini 1240 UV-VIS Spectrometer, Shimadzu

遠心分離機 himac CR21E, Hitachi

ロータリーエバポレーター Eyela Rotary Evaporator N-100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.

超音波粘度計 ビスコメイト VM-1G, 山一電機株式会社

・試薬類

標準寒天培地, 日水 株式会社

透析膜 Dialysis Membrane, size 36, Wako

グアガム, Sigma

キサントタンガム, Sigma

タラガム (イナゲル), 伊那食品工業株式会社

カラヤガム From Sterculia Tree, Sigma

片栗粉 (馬鈴薯澱粉), 株式会社シジシージャパン

AgNO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, EDTA 2Na 以上 Wako

KCl, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, BaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 以上 Sigma

1-2 実験方法

コンニャクゾルに対する減粘効果の確認方法

(1) 確認法-1 ひっくり返し試験 (目視による確認方法)

0.75%コンニャク溶液を試験管に 5ml ずつ分注した。減粘効果を確認するサンプル 200  $\mu$ l を加えボルテックスにてよく攪拌した。室温に 30 分放置した後、試験管を一斉に逆さ

まにし (30 秒間) 元に戻したときの試験管に残っているコンニャク溶液の高さを測定した。試験管に残っているコンニャク溶液の高さは粘度計にて粘度を測定した値と相関が得られた (Fig.1-1) ので、多数の試料について相対的活性を知る時には便宜上この迅速・簡便な方法を用いた。

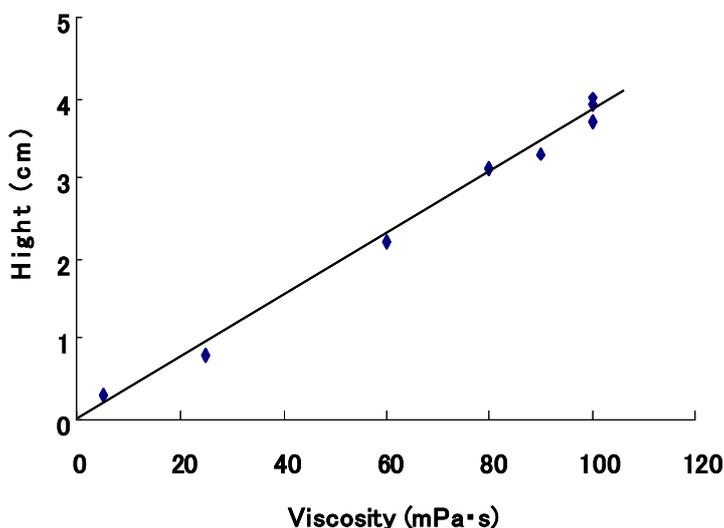


Fig.1-1. 試験管に残ったコンニャク溶液の量 (高さ) と粘度

## (2) 確認法-2 粘度測定による確認方法

0.5~1%のコンニャク溶液を 50ml のビーカーに 20ml~40ml 入れ超音波粘度計にて粘度を測定した。元のコンニャクの粘度を 0、水の粘度を 100%として相対減粘効果としてあらわした。

### タンパク定量

BCA Protein Assay Kit を用いて精製した酵素液のタンパク量を定量した。

### 全糖量測定

フェノール硫酸法により 490nm の吸光光度 (A-1) を測定しグルコース換算の全糖量を求めた。

### 還元糖量測定

ソモギネルソン法により 500nm の吸光光度 (A-1) を測定しグルコース換算の還元糖を求めた。

### マンナーゼ活性測定

AZO-CAROB GALACTOMANNAN 法を用いて endo-1,4- $\beta$ -Mannanase 活性を測定した。

### 微生物

### (1) 微生物のスクリーニング

40℃で放置、崩壊したタマネギを分離源とし、タマネギ改変培地 M-2 で作った寒天培地のプレートを使用して減粘効果のある成分を分泌する菌のスクリーニングを行なった。

(37℃, 24 時間, 静置培養) 得られたコロニーは標準寒天培地にて単離した。菌株のコンニャク減粘活性の有無は得られたコロニーをタマネギジュースの中で 37℃、48 時間培養した培養液のコンニャクゾルに対する減粘効果を確認することにより行った。

### (2) 菌株の同定

単離した菌株の同定は株式会社テクノスルガに依頼した。

### (3) 菌株の培養

5L マイヤーフラスコに培地 (M-2) 2 L、前培養を行った菌株 20ml 入れ 40℃にて 48 時間振盪培養を行った。培養物を遠心分離 (10,000× g, 15min) し、上清を回収し酵素の精製に使用した。

## 酵素

### (1) 酵素の精製

コンニャク溶液に対する減粘効果を指標として下記の手順で酵素の精製を行った。

#### ステップ 1

中空糸フィルターによる濾過

中空糸フィルター (F-1, F-2, F-3, F-4 の順で使用) を用いて回収した培養上清から減粘成分を分離、濃縮した。

#### ステップ 2

硫酸アンモニウムによる塩析

ステップ 1 により分離、濃縮した粗酵素液に 50%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、冷蔵庫にて一晩静置した。生じた沈殿を遠心分離 (10,000× g, 15min, 4℃) によって除き、上清に 75%飽和となるように更に硫酸を添加し冷蔵庫内に一晩静置した。遠心分離によって得られた沈殿物を水に溶解し透析膜を用いて水に対して透析して脱塩した。脱塩後の溶液をロータリーエバポレーター (液温 35℃以下) にて濃縮した。

#### ステップ 3

ゲルろ過クロマトグラフィー

パックドカラム (Sephacryl S-200HR) を用いて流速 1 ml/min で分画を行った。移動相には 0.15M NaCl を、標準物質として S-1~S-6 を用いた。溶出液は検出器 (D-1, D-2) とクロマトパックを用いてタンパクと糖をモニタリングしながらフラクションコレクターを用いて 3min/tube で分取した。減粘効果を確認し活性部を集め透析膜を用いて水に対して透析した。

#### ステップ 4

イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換カラム Q Sepharose (ポンプ P-1) を用いて分画した。移動相には 10mM の緩

衝液 (B-1) を用いた。溶出液は検出器 (D-1) とクロマトパックを用いてタンパクをモニタリングした。活性部は 0.05mM-NaCl によってイオン強度を変えることにより、流速 0.2ml/min で溶出させた。減粘効果を確認し、溶出した活性フラクションを 10mM の緩衝液 (B-1) に対して透析し粗酵素溶液を得た。

#### (2) 分子量推定

粗酵素液を Native PAGE (12% アクリルアミド) で分離し、泳動後のゲルを 1cm 幅で 5mm ずつ切り出し 0.75% のコンニャク溶液 5ml が入った試験管の中に入れよく攪拌し 30 分放置した。活性成分を含むゲルはコンニャク溶液の粘度を低下させるので、その様子を目視で確認することで活性位置を確認した。活性確認後の泳動ゲルは Coomassie brilliant blue R250 で染色し活性位置のバンドを確認した。活性部のゲルを切り出し SDS-PAGE (12% アクリルアミド) によって活性成分 (精製酵素) の分子量を推定した。

#### (3) 酵素の同定

精製酵素を SDS-PAGE で分離しシングルバンドを確認した。これを切り出し LC-MS/MS によるタンパク質同定を行なった (株式会社アプロサイエンスに依頼)。

#### (4) 反応至適 pH

1.5% コンニャク溶液 20ml と各 pH (pH=3~9) に調整した 20mM 緩衝液 (B-2) 20ml をビーカーに入れ 30 分攪拌した後、酵素液を 100  $\mu$ l 加え室温にて 30 分攪拌した。超音波粘度計にて粘度を測定した。

#### (5) 反応至適温度

1.5% コンニャク溶液 10ml と各 20mM 緩衝液 (B-2, pH=5.5) 10ml をビーカーに入れ各温度 (20~90°C) の湯浴中に攪拌しながら 10 分間保った。酵素液を 50  $\mu$ l 加え攪拌しながら各温度で 15 分保った。粘度を測定するために 20°C の水浴中に攪拌しながら 10 分間保った後、超音波粘度計にて粘度を測定した。

#### (6) 温度安定性

1.5% コンニャク溶液 10ml と各 20mM 緩衝液 (B-2, pH=5.5) 10ml をビーカーに入れ、各温度の湯浴中で 15 分間熱処理をした酵素液を 50  $\mu$ l 加え室温にて 30 分攪拌した後、超音波粘度計にて粘度を測定した。

#### (7) 基質選択性

0.5% のグアガム、キサントガム、タラガム、コンニャク、1% の片栗粉、1.5% のカラヤガム溶液を 20ml ずつ調製した。各基質溶液に酵素液を 100  $\mu$ l ずつ添加し室温にて 30 分攪拌した後、超音波粘度計にて粘度を測定した。

#### (8) 最大反応速度

グルコマンナン溶液 0.5ml (終濃度で 0.1~0.5%) と 20 mM 緩衝液 (B-2, pH=5.5) 0.5ml を試験管に入れよく攪拌した。酵素溶液を 0.1ml 加え攪拌しながら 40°C、10 分間反応させた。反応前後の全糖量と還元糖量を測定し Lineweaver Burk の逆数プロットより  $K_m$  と  $V_{max}$  を計算した。

### (9) 阻害イオン

0.5%グルコマンナン溶液 0.4ml、20 mM 緩衝液 (B-2, pH=5.5) 0.4ml と 10mM の金属イオン溶液 (NaCl, KCl, FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, EDTA 2Na) 0.1ml を試験管に入れよく攪拌した。酵素溶液を 0.1ml 加え攪拌しながら 40℃、10 分間反応させた。反応前後の全糖量と還元糖量を測定した。

### (10) 反応生成物の特徴

0.5%のグルコマンナン溶液 20ml をビーカーに入れ、酵素液を 50 μl 加え攪拌しながら 40℃の湯浴中で 2 時間反応させた。超音波粘度計にて粘度を測定した後、ビーカーを沸騰中に入れ 15 分煮沸し反応を停止させた。室温まで放置し、2ml サンプリング後、酵素液を 50 μl 加え上記の操作を繰り返した。サンプリングしたサンプルは薄層クロマトグラフィー (検出試薬 d-1) によって微小反応生成物を展開し、同時に全糖、還元糖を測定した。

## 1-3 結果

### 微生物

#### (1) 微生物のスクリーニング

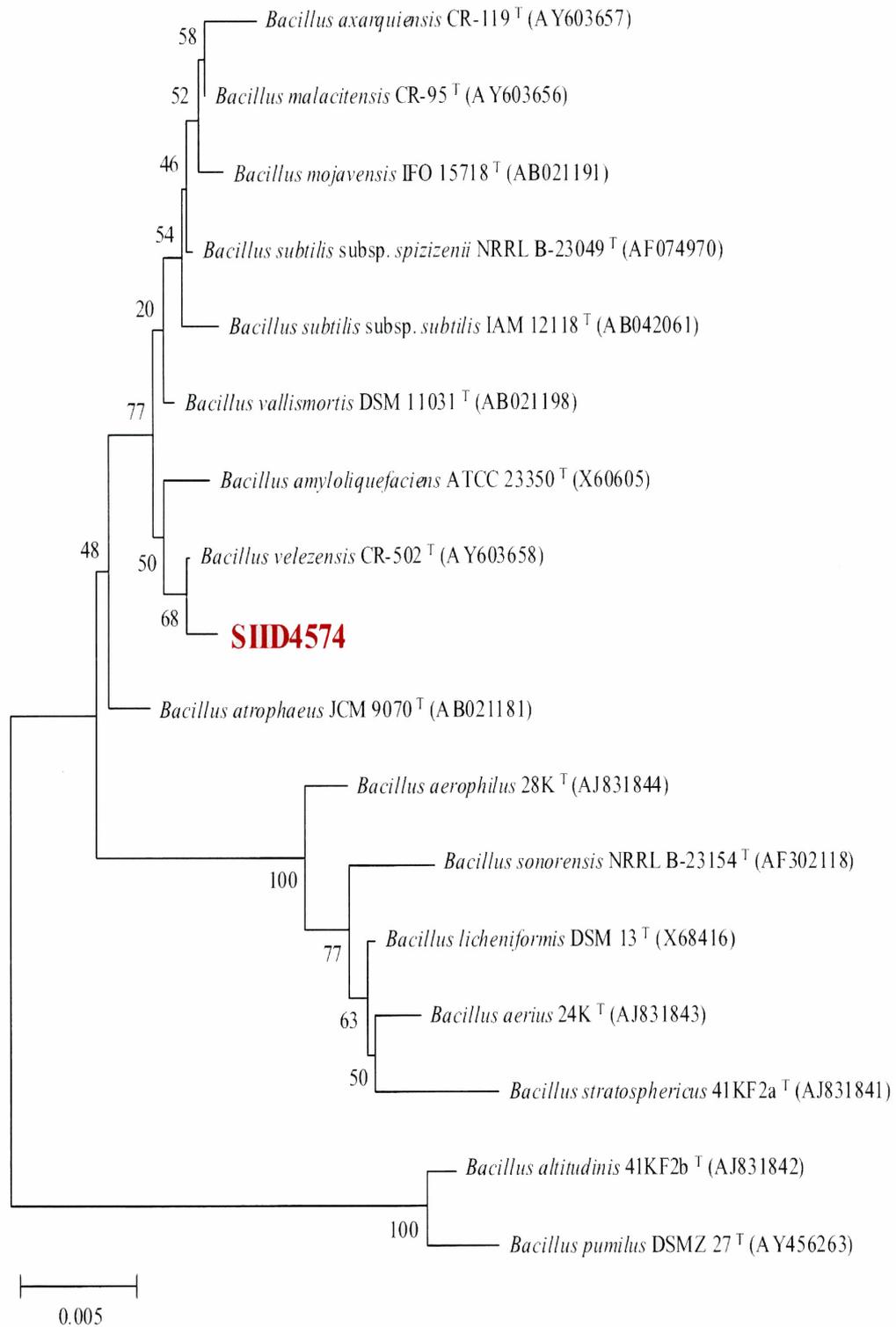
タマネギを分離源としてコンニャク溶液に対して強い減粘効果を持つ菌株 1 検体 (SIID4574) を得た。

#### (2) 菌体の同定

菌株のグラム染色顕微鏡写真を Fig.1-2 に、形態的特長を Table 1-1 に 16SrDNA の塩基配列より解析された系統樹を Fig.1-3 に示す。得られた菌株は好気培養条件下で芽胞を形成するグラム不定の桿菌で運動性を示し、カタラーゼ反応は陽性を示した。これらの特長より得られた菌株バチルス属であると推定された。さらに 16SrDNA の塩基配列により *Bacillus velezensis* に近縁であると解析され、新種の可能性のある *Bacillus sp. necolon-1* として特許生物寄託センターに登録、寄託された。



Fig.1-2. コンニャク減粘成分生産菌のグラム染色顕微鏡写真 (2000 倍)  
(株) テクノスルガ



**Fig.1-3.** コンニャク減粘成分生産菌の 16SrDNA による系統樹  
 枝の分岐付近の数字はブートストラップ値、左下の線はスケールバー、  
 株名の末尾のTはその種の基準株であることを示す  
 (株) テクノスルガ

Table 1-1. コンニャク減粘成分生産菌の形態的特長

(株) テクノスルガ

検体番号	SID4574	
培養温度 (°C)	30	
細胞形態	桿菌 (0.7-0.8×2.0-4.0 μm)	
グラム染色	不定	
孢子	+	
運動性	+	
コロニー形態	培地	nitrient agar
	培養時間	24hr
	直径	3.0-5.0mm
	色調	クリーム色
	形	不規則
	隆起状態	平ら
	周縁	波状
	表面の形状など	ラフ
	透明度	不透明
	粘稠度	バター様
培養温度 (°C)	37	+
	45	+
カタラーゼ	+	
オキシダーゼ	-	
酸/ガス産生 (グルコース)	-/ー	
O/ Fテスト (グルコース)	-/ー	
類似の性状を示す 分類群	<i>Bacillus</i>	

+ : 陽性 - : 陰性

## 酵素

### (1) 酵素の精製

*Bacillus sp. necolon-1* 培養上清からのコンニャク減粘作用を持つ酵素の精製過程を Table 1-2 に示す。

48 時間培養を行なった *Bacillus sp. necolon-1* 培養液上清の精製により 0.2mg の酵素液を得ることが出来た。

Table 1-2. 酵素の精製過程

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Sp act (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
培養上清	4863	8854	0.5	1	100
中空糸フィルター	416	453	0.9	2	8.6
硫酸アンモニウム	151	51	3.0	6	3.1
Sephacryl S-200HR	92	6	15.3	31	1.9
Q Sepharose	54	0.2	270	540	1.1

### (2) 分子量推定

ステップ 4 で得られた粗酵素液を Native PAGE (12%アクリルアミド) で分離し、泳動後のゲルを 1cm 幅で 5mm ずつ切り出し 0.75%のコンニャク溶液 5ml が入った試験管の中に入れよく攪拌し 30 分放置したところ、切り出したゲルの中でコンニャク溶液の粘度を下げたゲルは一枚だけであった。Coomassie brilliant blue R250 で染色されたバンドも 1 つだけであり、活性の位置と一致した。切り出した活性部分のゲルを SDS-PAGE による分離で得られたバンドを Fig.1-4 に示す。タンパクの単一バンドを確認することが出来、この精製酵素の分子量は約 42kDa と推定された。

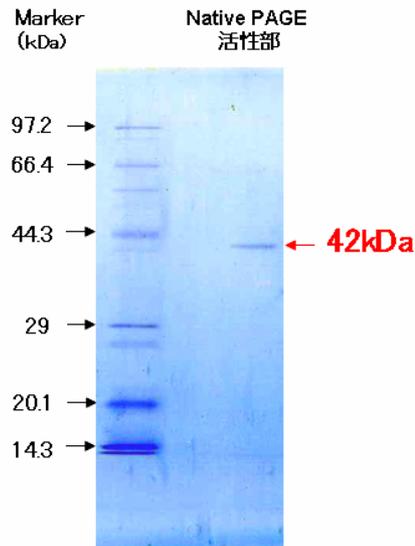


Fig.1-4. 精製酵素の SDS-PAGE

(3) 酵素の同定

得られたゲル上の精製酵素は LC-MS/MS で分析された。トリプシンで消化したサンプルを MS によって分析した結果をデータベースで類似配列を検索したところ、消化ペプチドの1つが *Pectobacterium carotovorum* 由来の endo- $\beta$ -1,4-mannanase の部分配列にヒットした。このペプチドの MS/MS スペクトルを Fig.1-5 に、*Pectobacterium carotovorum* 由来の endo- $\beta$ -1,4-mannanase の配列を Fig.1-6 に示す。スペクトルでは主にペプチドの C 末端系列のイオンピークである y イオンピークが強く検出され、MS の結果と同様に endo- $\beta$ -1,4-mannanase と同定された。酵素の MS から得られた分子量は 41,893 Da、PI=6.31 であった。

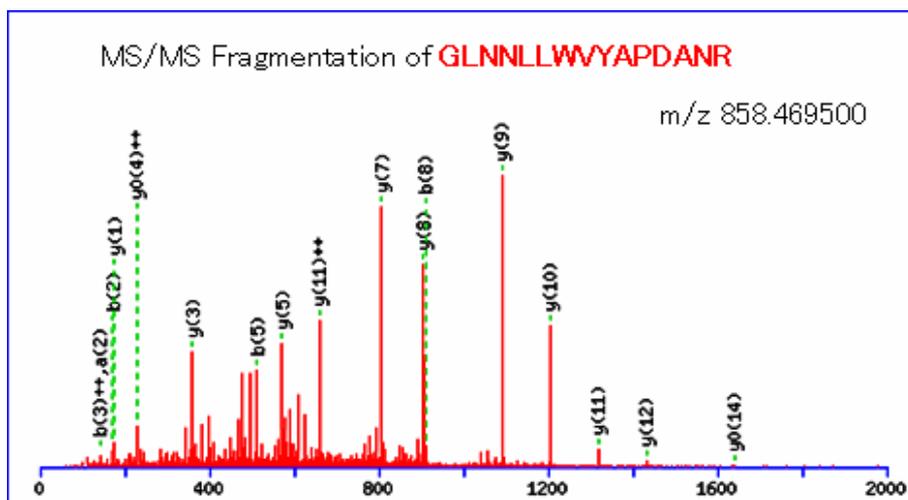


Fig.1-5. MS によって得られたペプチドの MS/MS スペクトル

```

1 MKRITYQLFRQ ISLAACLMTA TISQVGAHTV SPVTPNAMAT TRAIYNWMAH
51 LPNRSDSRLI SGAFGGYANI GGDDAFSLAE AENIAARTGQ YPAIYACDYA
101 RGWDRSAGN EADLVDYSCN STLIDYWKKG GLVQISHHLP NPVFAGNDPG
151 TGEGLKAV SNEQLAAVLQ SGTPERTRWL AILDKVAAGL MQLQQQGVV
201 LYRPLHEMNG EFWFWGATGY NTHDTTRMNL YIRLYRDIYT YFTQTKGLNN
251 LLWVYAPDAN RQDKTGFYPG DAYVDIAGLD MYLDNPANLS GYDEMLRLNK
301 PFALTEVGPS TTNQQFDYAR LVSIKSNFP KTVYFLPWNN VWSPVKNLNA
351 SAAVNDSSVV NRGGIWNGSQ LTPIVEAN

```

Fig.1-6. *Pectobacterium carotovorum* 由来の endo- $\beta$ -1,4-mannanase (ABC9519) の配列 (*Bacillus* sp. necolon-1 より得られた酵素と一致する部分を赤で示す)

(4) 反応至適 pH

反応 pH と相対活性を Fig.1-7 に示した。反応の至適 pH=5.5 であった。

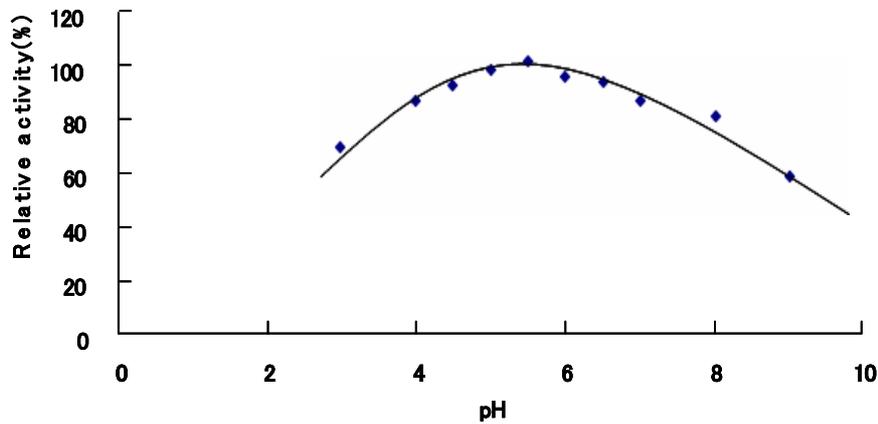


Fig.1-7. 反応至適 pH

(5) 反応至適温度

反応温度と相対活性を Fig.1-8 に示した。反応の至適温度は 40~60℃であった。

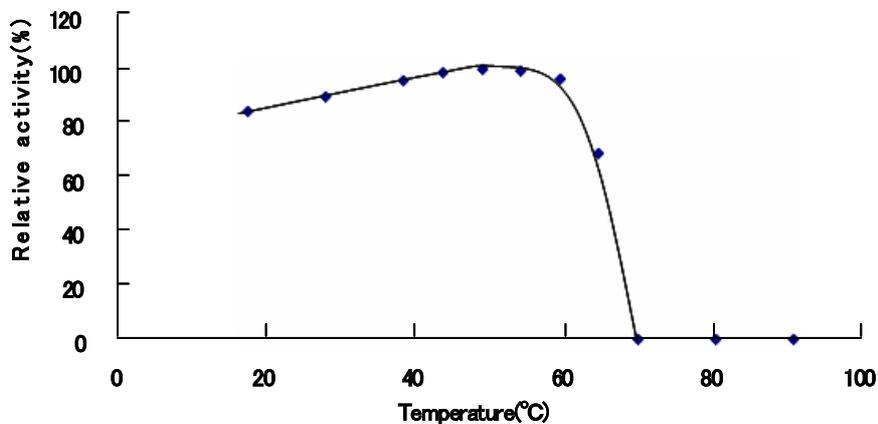


Fig.1-8. 反応至適温度

(6) 温度安定性

酵素に 15 分間前処理を行なった温度と相対活性を Fig.1-9 に示した。  
65°C、15 分間の熱処理で酵素は活性を失った。

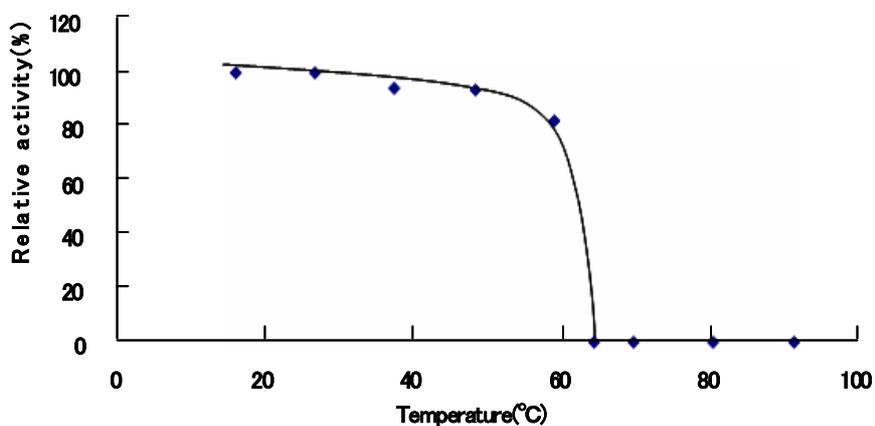


Fig.1-9. 温度安定性

(7) 基質選択性

各基質に対する相対活性を Fig.1-10 に示した。  
本酵素はコンニャク、タラガム、グアガムなどのマンナン類に対して活性を持つことが分かった。

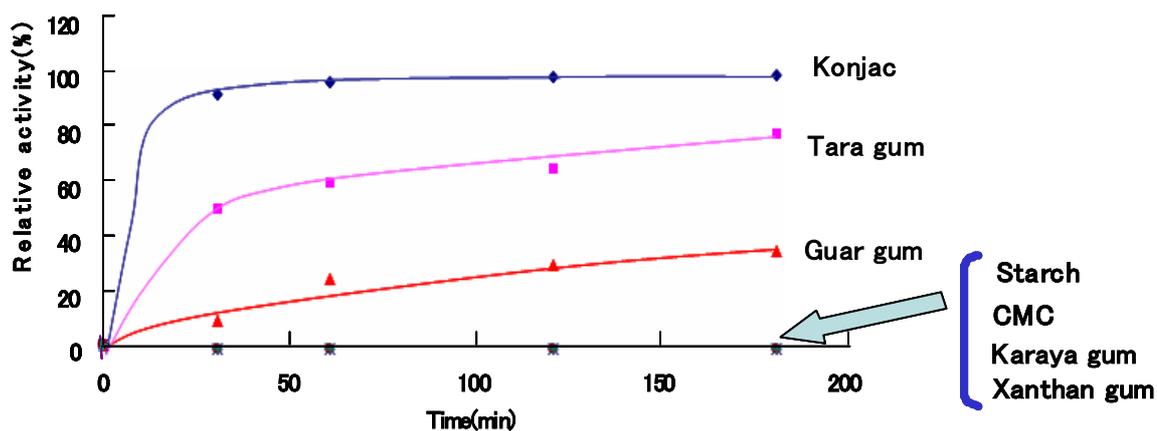


Fig.1-10. 基質選択性

(8) 最大反応速度

Lineweaver Burk の逆数プロットを Fig.1-11 に示した。この酵素液の pH=5.5、40°C での  $K_m=5.18\text{mg/ml}$ 、 $V_{max}=7.8\ \mu\text{g/ml/min}$  であった。

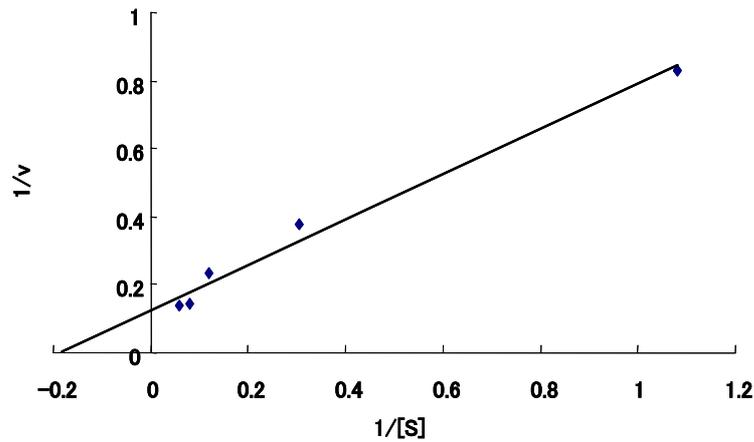


Fig.1-11. Lineweaver Burk の逆数プロット

(9) 阻害イオン

各金属イオンに対する相対活性を Fig.1-12 に示す。この酵素は塩化マンガンにおいて反応阻害が見られた。

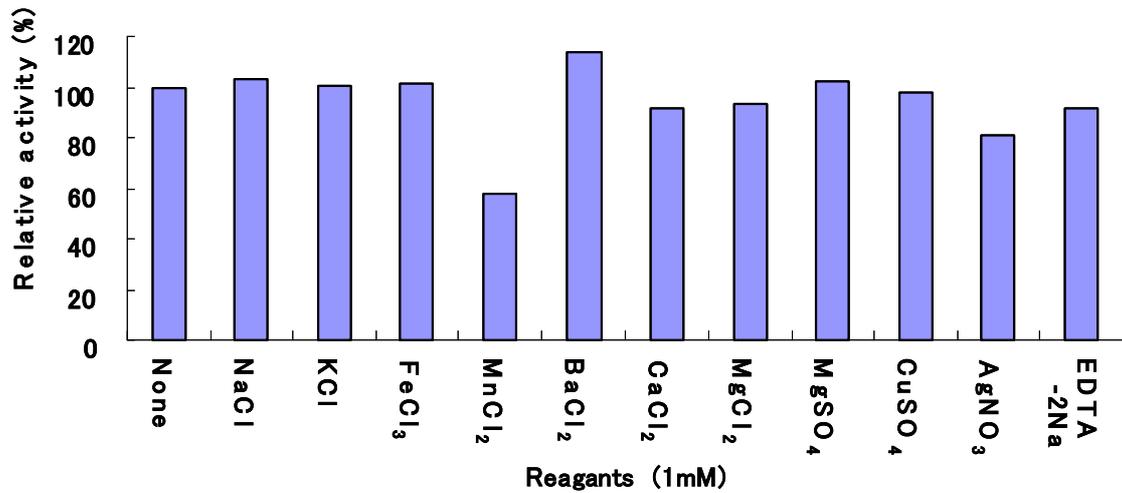


Fig.1-12. 阻害イオン

(10) 反応生成物の特徴

反応生成物の TLC の結果と全糖、還元糖測定より得られた平均重合度を Fig.1-13 に示した。酵素の失活を懸念して消化の操作の度に新鮮な酵素を追加した。酵素の添加回数を増やすことにより単糖に薄く、オリゴ糖付近に濃いスポットが確認でき、この酵素はグルコマンナンをランダムに加水分解し単糖、オリゴ糖まで加水分解することが分かった。

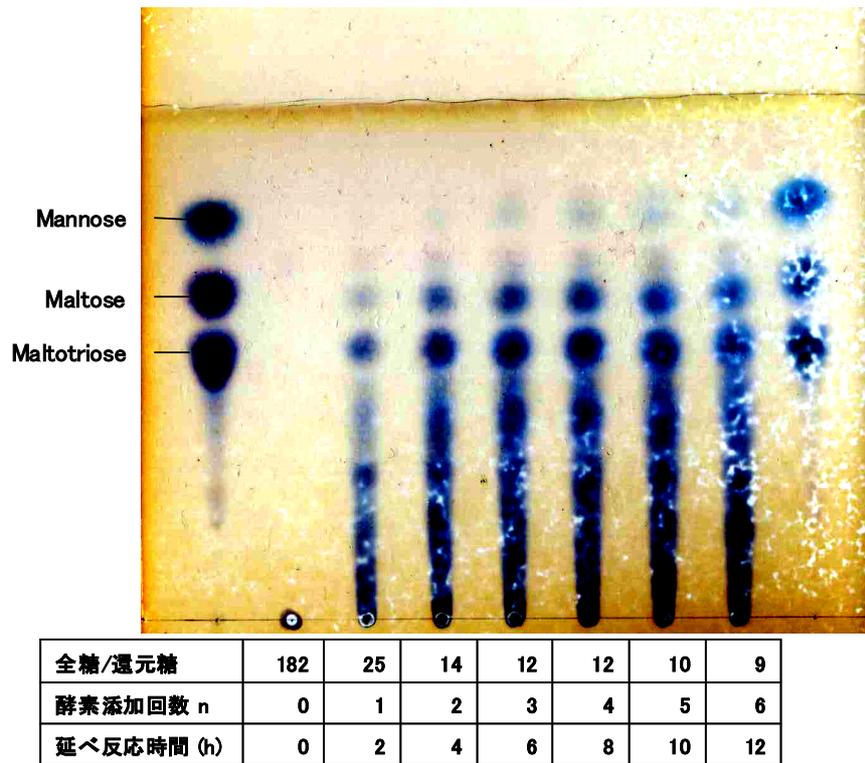


Fig.1-13. 酵素添加回数に対するグルコマンナン分解生成物の TLC による分析

## 第2章 酵素反応生成物の粘度と分子量

*Bacillus sp. necolon-1* より得られた endo- $\beta$ -1, 4-mannanase での酵素反応において、反応の時間経過で還元糖は直線的に増加するがグルコマンナンの粘度は酵素を添加した直後に急激に低下した (Fig.2-1)。この急激な粘度低下をする際のグルコマンナンの物理的性質について調べた。

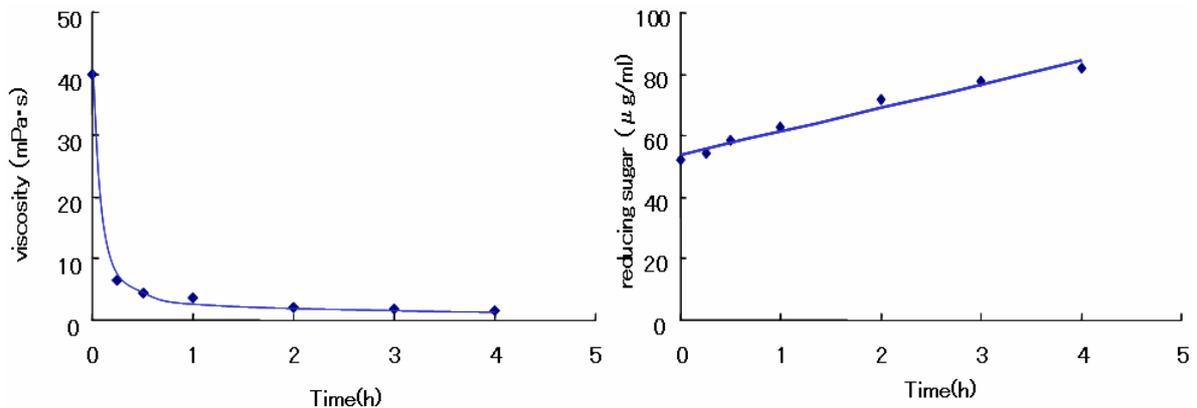


Fig.2-1. 酵素反応の時間経過に対するコンニャク溶液の粘度変化 (左) と還元糖量 (右)

### 2-1 材料

#### ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲル担体 (分画範囲)

G-1 : Sephacryl S-400HR ( $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6 \text{Da}$ ), Pharmacia

カラム:内径×長さ (cm)

C-1 : XK16/70 ( $1.6 \times 70$ ), Pharmacia

### 2-2 実験方法

1%のグルコマンナン溶液 30ml をビーカーに入れ、酵素液を加え (0~3ml) 攪拌しながら室温で 30 分反応させた後、各ビーカーを沸騰浴中に入れ 15 分煮沸し反応を停止させた。室温まで放置し超音波粘度計にて粘度を測定すると一方で、反応生成物を糖濃度が 0.1~1%となるように水で希釈しゲルろ過クロマトグラフィー (ゲル担体 G-1, カラム C-1, ポンプ P-1, 検出器 D-2, 標品 S-4, S-5, S-6) によって分子サイズの分布を測定した。

### 2-3 結果

反応後のグルコマンナンを各濃度に水で希釈した際の粘度とゲルろ過より得られた平均分子量を Table 2-1 に示す。酵素の添加量によりグルコマンナンの粘度は低下し、分子量も下がった。

各グルコマンナン濃度（代表的な 3 点：1%、0.5%、0.1%）のときの分子量に対する粘度変化を Fig.2-2 に示す。 $\eta = KM^\alpha$  が成立するとして各濃度での定数 K と  $\alpha$  を求めた。

グルコマンナン濃度と係数 K、及び  $\alpha$  の関係をそれぞれ Fig. 2-3、Fig.2-4 に示す。

定数 K、 $\alpha$  共にコンニャク濃度に対しリニアな関係が得られたので K、 $\alpha$  の濃度依存式から  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  の時の値として  $K=0.25e^{-6.15C}$ 、 $\alpha=2.39C+0.36$  を得た。

Table 2-1. 各濃度に希釈した反応後のグルコマンナンの粘度とゲルろ過より得られた推定分子量

反応後の グルコマンナン 濃度 (%)	酵素添加量 (ml/30ml)								
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1	2	3
1	500	350	100	80	60	40	30	4	3
0.9	300	200	70	60	50	30	15	3.3	2.6
0.8	200	100	60	50	40	25	10	2.8	2.2
0.7	100	60	40	35	21	14	6	2.4	2.1
0.6	60	30	21	17	16	11	4.5	2.2	1.8
0.5	40	20	13	11	9.5	7	3.2	1.8	1.6
0.4	20	11	9	8	7	4.5	2.3	1.6	1.4
0.3	10	7.5	6	4.2	4.1	3	2	1.4	1.2
0.2	5	4.8	4	3.1	2.8	2	1.5	1.2	1.1
0.1	2.5	2.4	1.9	1.8	1.5	1.3	1.1	1	1
推定分子量 (×万)	150	100	90	80	78	73	53	26	20

粘度を黒字で示す (mPa・s)

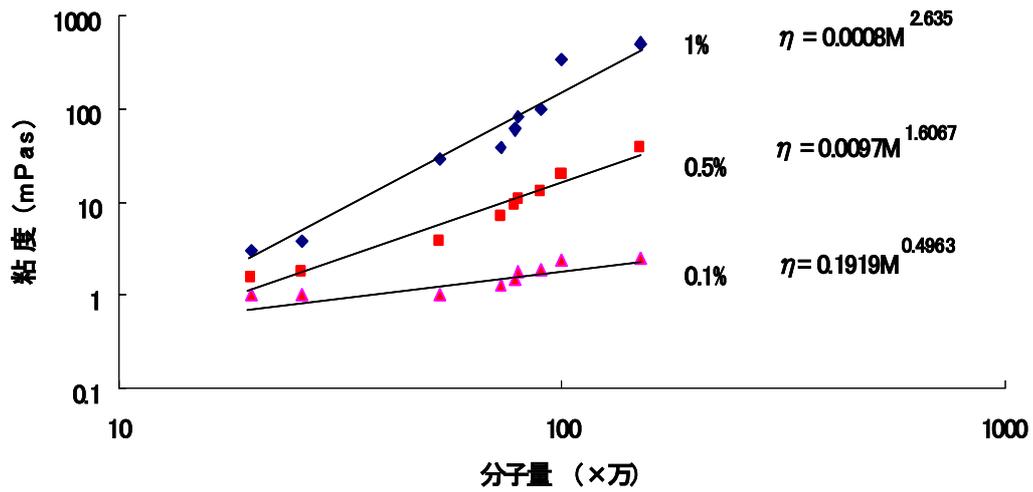


Fig.2-2. 各グルコマンナン濃度の分子量と粘度

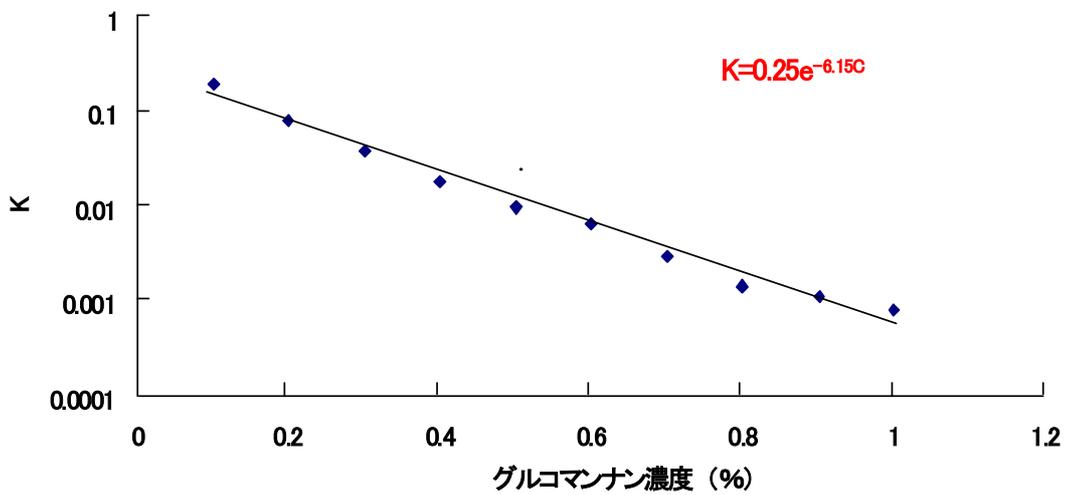


Fig.2-3. グルコマンナン濃度に対する定数 K (20°C±1°C)

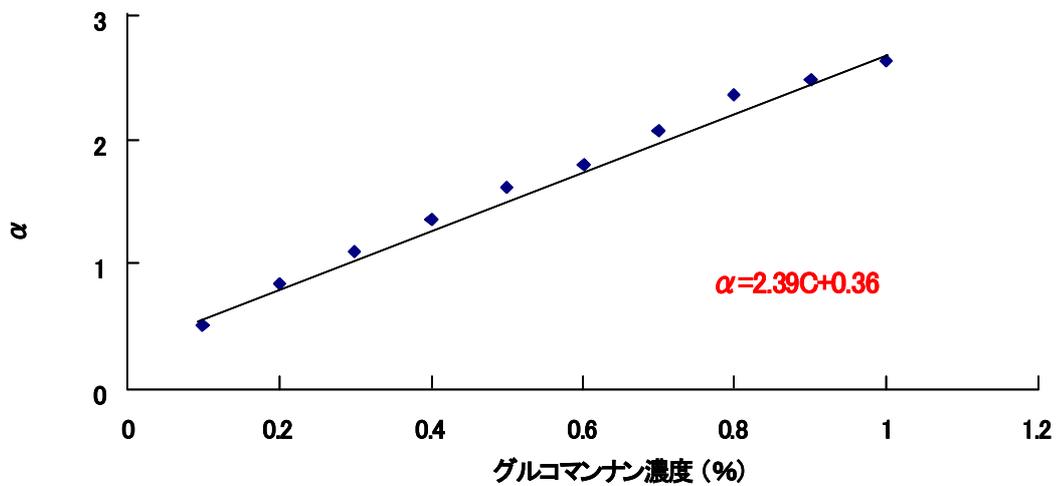


Fig.2-4. グルコマンナン濃度に対する定数  $\alpha$  (20°C±1°C)

## 第3章 酵素産生誘導物質

### 3-1 材料

#### ・ニンニクジュース

市販のニンニクを適当な大きさに刻み、ミルサー (IFM-180G, 岩谷産業株式会社) にてすりつぶし、遠心分離 (10,000×g, 15min) によって残渣と分けた。得られた上清をオートクレーブ (121°C, 20min) にて滅菌した。

#### ・ラッキョウジュース

市販の水洗いラッキョウを適当な大きさに刻み、ミルサーにてすりつぶし、遠心分離 (10,000×g, 15min) によって残渣と分けた。得られた上清をオートクレーブ (121°C, 20min) にて滅菌した。

#### ・精製器具類

##### ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル担体 (分画範囲)

G-2 : Sephadex G-25 ( $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ Da), Pharmacia

G-3 : Sephadex G-10 ( $\sim 7 \times 10^2$ Da), Pharmacia

カラム:内径×長さ (cm)

C-2 : XK26/40 (2.6×40), Pharmacia

標準物質(Da)

S-7 : Maltopentaose (823.73), Wako

S-8 : Maltotriose (504.44), Wako

S-9 : Maltose (360.32), Wako

S-10 : D(+)-Glucose (180.2), Wako

S-11 : D(+)-Mannose (180.2), Sigma

##### HPLC

カラム

C-3 : Senshu Pak, Senshu Scientific Co., Ltd.

ポンプ

P-2 : SSC-3465, Senchu Scientific Co., Ltd.

##### 分光光度計

A-2 : Multi Spec-1500, Shimadzu

### 3-2 実験方法

#### (1) 誘導確認試験

生理的食塩水に懸濁した *Bacillus sp. necolon-1* を 0.5ml、培地 (M-1) 20ml、誘導を確認するサンプル溶液 (0.5~2ml) を 50ml の三角フラスコに入れ 40°C で 48 時間振とう培養

した。培養液の濁度を分光光度計 (A-1) の 660nm で測定した。10,000×g、15min 遠心分離した培養液上澄みのコンニャクゾルに対する減粘効果を確認した。

#### (2) 誘導物質のスクリーニング

生理的食塩水に懸濁した *Bacillus sp. necolon-1* を 0.5ml、培地 (M-3) 20ml にタマネギジュース、ニンニクジュース、ラッキョウジュース、コンニャク、グアガム、タラガム、片栗粉、CMC、マンノースそしてグルコースをそれぞれ糖量として 40mg 加えて 50ml の三角フラスコで 40°C、48 時間振とう培養した。培養液の菌体の増殖とコンニャクゾルに対する減粘効果の確認方法-1 (1 章に記載) で確認した。

#### (3) 誘導物質の精製

*Bacillus sp. necolon-1* 培養上清のコンニャクゾルに対する減粘効果を指標にしてタマネギジュースから誘導物質の精製を下記の手順により行なった。

##### ステップ 1

ゲルろ過クロマトグラフィー

タマネギジュースをゲルろ過 (ゲル担体 G-2, カラム C-2, ポンプ P-1, 標準物質 S-6~S10) によって分画した (移動相; イオン交換水, 流速 2ml/min)。溶出液を検出器 (D-1, D-2) とクロマトパックを用いてタンパクと糖をモニタリングしながら分画し、各分画の酵素の誘導確認試験を行い、活性分画をロータリーエバポレーターで濃縮した。

##### ステップ 2

ゲルろ過クロマトグラフィー

ステップ 1 によって得られた活性分画をゲルろ過 (ゲル担体 G-3, カラム C-1, ポンプ P-1, 標準物質 S-7~S10) によって分画した (移動相; イオン交換水, 流速 1ml/min)。溶出液を検出器 (D-1, D-2) とクロマトパックを用いてタンパクと糖をモニタリングしながら 2min/tube でフラクションコレクターにて分取した。酵素の誘導確認試験を行い活性フラクションはロータリーエバポレーターで濃縮した。

##### ステップ 3

イオン交換クロマトグラフィー

ステップ 2 によって得られた活性部をイオン交換カラム (ポンプ P-1) にてイオン交換水を移動相として分画した。溶出液は検出器 (D-1) とクロマトパックを用いてタンパクをモニタリングした。1M-NaCl によってイオン強度を変え流速 0.2ml/min で溶出させることにより、イオン交換カラムに吸着しないものと吸着するものに分け減粘効果を確認した。

##### ステップ 4

HPLC

ステップ 3 によって得られた活性分画を HPLC (カラム C-3, ポンプ P-2, 標準物質 S-7~S-11, 移動相; 80%アセトニトリル (v/v), 流速 1ml/min) によって精製した。溶出液を検出器 (D-1, D-2) とクロマトパックを用いてタンパクと糖をモニタリングしながら 2min/tube でフラクションコレクターにて分取した。各フラクションをエバポレーターによ

って濃縮乾固し、イオン交換水に再溶解したものについて酵素の誘導確認試験を行った。

#### (4) 誘導物質の推定

酵素誘導フラクションの紫外線吸収スペクトルを分光光度計 (A-2) で測定した。

### 3-3 結果

#### 誘導物質のスクリーニング

スクリーニング結果を Table 3-1 に示す。

*Bacillus sp. necolon-1* は片栗粉と CMC を除くすべての炭素源で生長した。しかしタマネギ、ニンニクやラッキョウなどのネギ類のジュースやコンニャク、タラガム、グアガム等のマンナン類を用いた時にのみ菌体外にこの酵素を産生した。

Table 3-1. 各炭素源を使用したときの *Bacillus sp. necolon-1* の増殖と培養液上清のコンニャク溶液に対する減粘効果

無機培地に添加した有機物	菌体の増殖	培養液の減粘効果
タマネギジュース	○	◎
ニンニクジュース	○	○
ラッキョウジュース	○	○
コンニャク (グルコマンナン)	○	○
タラガム (ガラクトマンナン)	○	○
グアガム (ガラクトマンナン)	○	○
片栗粉	×	×
CMC	×	×
マンノース	○	×
グルコース	○	×

#### 誘導物質の精製

ステップ2のゲルろ過クロマトグラフィーによって得られたクロマトグラムと各フラクションを培養に用いた際の菌体量と相対減粘活性を Fig.3-1 に示す。0分から60分までの溶出液をフラクションコレクターに 2min/tube で分取し、*Bacillus sp. necolon-1* の培地に加えて誘導確認試験を行なった。糖マーカでの推定分子量 655、456 及び 281 付近に酵素活性を誘導する成分が含まれていた。

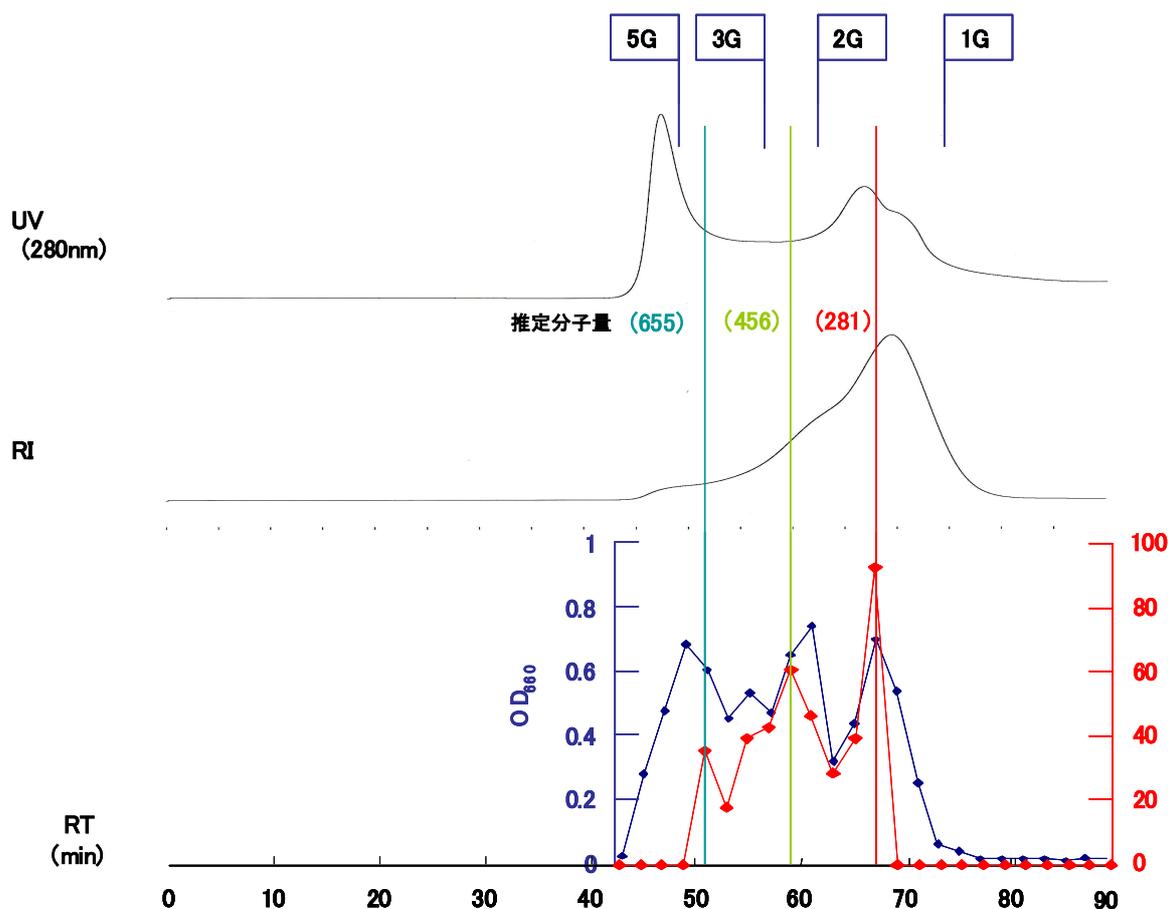


Fig.3-1. Sephadex G-10 によって得られたクロマトグラムと  
各フラクションの酵素産生誘導効果

UV デテクター (上)、RI デテクター (中) によるクロマトグラムと分取した各フラクションを  
使用して培養した際の 48 時間後の菌体濁度と培養液上清の相対活性 (下)

1 G : D(+)-Glucose, 2 G : Maltose, 3 G : Maltotriose, 5 G : Maltopentaose

ステップ 2 で得られた、分子量 281 付近のフラクションについてステップ 3 の精製をした。移動相にイオン交換水を使用しイオン交換カラムにサンプルをのせ、50ml のイオン交換水を流した (フラクション 1)。その後、移動相を 1M-NaCl に置き換えカラムに吸着しているものを溶出させた (フラクション 2)。フラクション 1, 2 の誘導確認試験を行なったところ、フラクション 1 において酵素産生誘導が認められた。

ステップ 3 で得られたフラクション 1 についてステップ 4 の HPLC による精製をした。得られたクロマトグラムと各フラクションを用いた誘導確認試験の結果を Fig.3-2 に示した。6, 7, 9 のフラクションで誘導が確認できた。

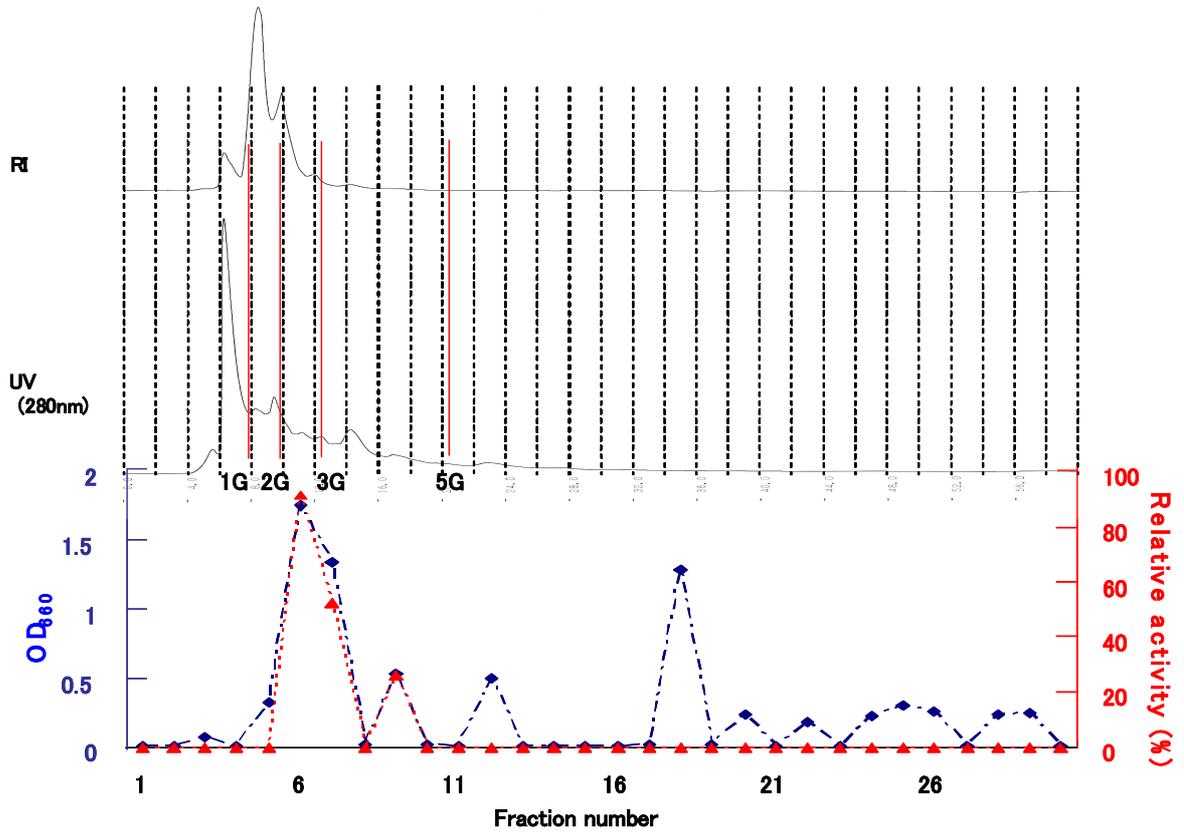


Fig.3-2. HPLC によって得られたクロマトグラムと各フラクションの酵素産生誘導効果  
 UVディテクター（上）、RIディテクター（中）によるクロマトグラムと分取した各フラクションを  
 使用して培養した際の48時間後の菌体濁度と培養液上清の相対活性（下）  
 1 G : D(+)-Glucose, 2 G : Maltose, 3 G : Maltotriose, 5 G : Maltopentaose

### 誘導物質の推定

精製した誘導物質の UV スペクトラムを Fig.3-3 に示す。

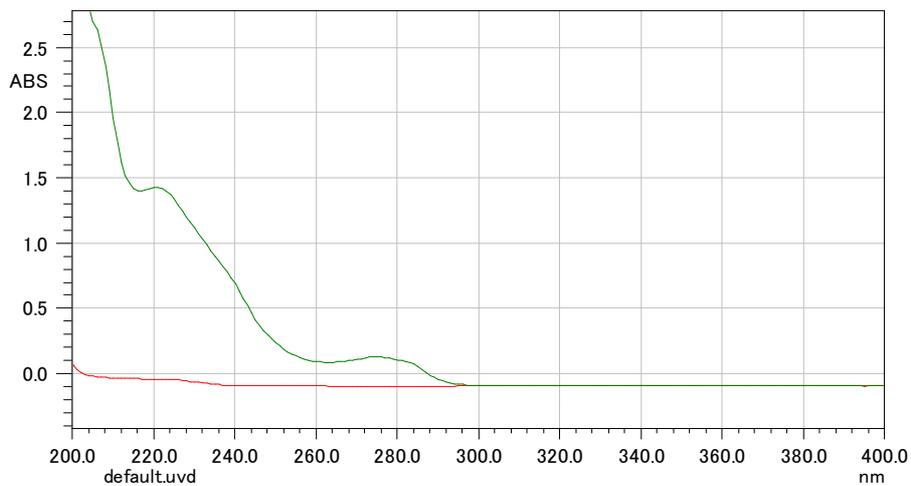


Fig.3-3. 酵素産生誘導物質の UV スペクトラム

## 第4章 食品工学的応用

### 4-1 材料

Geloosener-K とは下記の方法で調製される粗酵素液で、前述の方法でタマネギから誘導され *Bacillus sp. necolon-1* で産生・分泌されるマンナーゼと同等のものである。

#### ・ Geloosener-K

生タマネギを 50°C で重量が 10 分の 1 になるまで乾燥した。乾燥タマネギ 100g に 1L の水を加え冷蔵庫中、一晚放置した。抽出液と残渣をガーゼで濾別し遠心分離 (10,000 × g, 15min) を行なった。上清を中空糸フィルターによって分画・濃縮を行なった。濃縮液に対して 70%EtOH 沈殿を行なった後遠心分離 (10,000 × g, 15min) を行なった。上清をロータリーエバポレーターにて 100ml まで濃縮したものを Geloosener-K として使用した。

#### ・ 噛み込み試験

EZ-Test, SHIMADZU

### 4-2 実験方法

#### ・ コンニャク成型

5% のコンニャク溶液 300g ずつに Geloosener-K を 0~2ml 加え 30 分攪拌した。少量の水に溶いた 300mg の水酸化カルシウムを加えた後 15 分攪拌した。四角い型に圧入し沸騰水中で 30 分間保ち固化させた。

#### ・ 噛み込み試験

成型したコンニャク及び市販のコンニャク (白、黒) を 5.0cm 角、厚み 2.5 cm に裁断し噛み込み試験を行なった。

試験には Fig.4-1 の形状、寸法の歯を使用した。

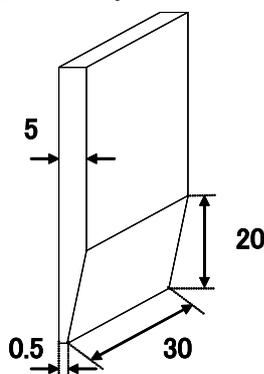


Fig.4-1. 歯の形状と寸法 (mm)

### 4-3 結果

3%前後の市販のコンニャク、Geloosener-K 添加有無の 5%コンニャクに対する噛み込み試験の結果を Fig.4-2、4-3 に示した。市販のコンニャクや Geloosener-K を添加していないコンニャクでは歯による圧迫とともに弾性的反撥を示し10数ミリのところで破断がおき噛み込みが生じた。これがコンニャク特有の歯ごたえ、食感につながる。一方、Geloosener-K を用いたコンニャクでは Geloosener-K 添加量に応じてコンニャクのこの特性が失われ軟らかくなった。

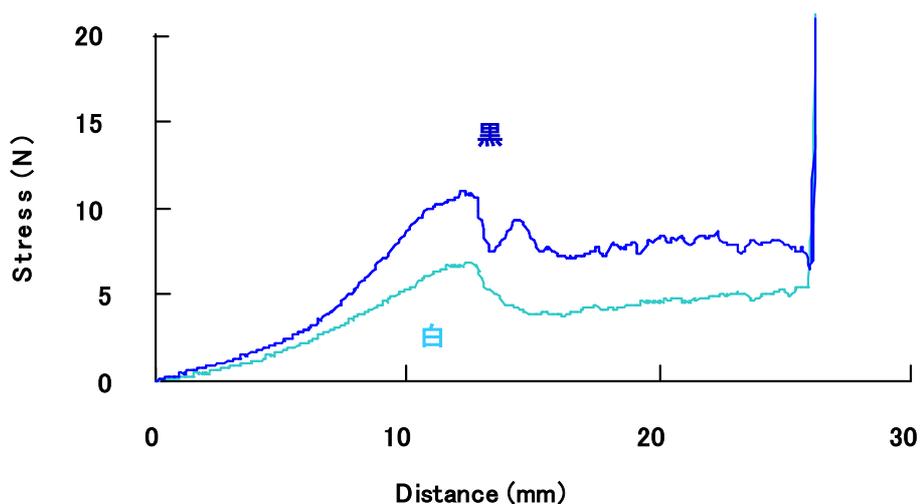


Fig.4-2. 市販のコンニャクの噛み込み試験

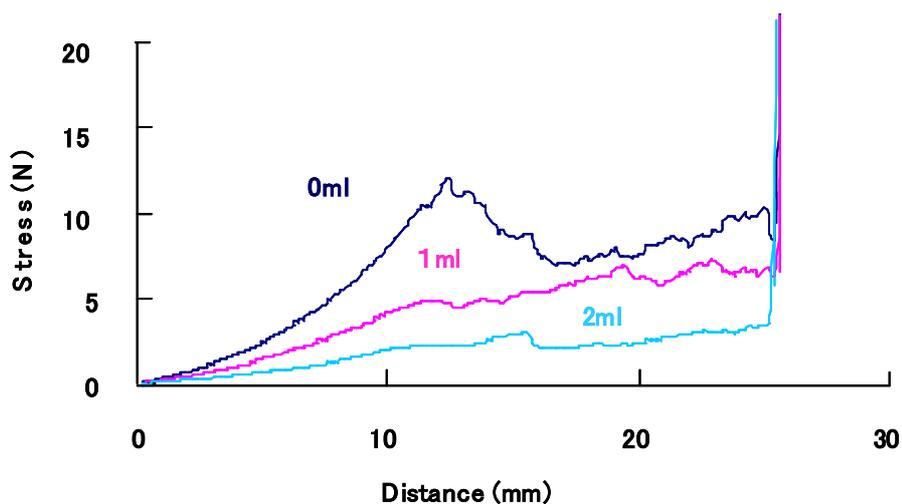


Fig.4-3. 5%コンニャクに対する Geloosener-K 添加の効果

## 第5章 考察

### 5-1 酵素

$\beta$ -Mannanase (Endo- $\beta$ -1,4-D-mannanase, EC3.2.1.78) は $\beta$ -1,4-マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンの $\beta$ -1,4-マンノシド結合のランダムな加水分解を促進する酵素として知られ、様々なバクテリア、菌類さらに高等植物から分離・精製が報告されている。いくつかのマンナーゼの特徴、及び *Bacillus* sp. necolon-1 由来のマンナーゼについて Table 5-1 にまとめた。

Table 5-1. 様々なマンナーゼの特徴

Specees	pH optimum	Temp. optimum (°C)	Thermal stability (°C)	Mr (kDa)	PI	Inhibitor	Reference
<i>Bacillus</i> sp. necolon-1	5.5	40-60	65(15min)	42	6.31	Mn <sup>2+</sup>	Present study
<i>Bacillus</i> sp. AM-001	9	60	50	58	5.9		[16]
<i>Bacillus</i> sp. M50	6	50				Fe <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup> , EDTA, Hg <sup>2+</sup>	[17]
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	5	55	55	38	4.8	Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>2+</sup>	[18]
<i>Bacillus</i> sp. strain JAMB-750	10	55		130		NBS, Fe <sup>3+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	[19]
<i>Bacillus subtilis</i> KU-1	7	50-55	60 (1h)	39		Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cr <sup>2+</sup>	[20]
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	6	75	45-85	67			[21]
<i>Bacillus</i> sp. NTT33	9.0-10.0	80		38.9	3.0-4.0	Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	[22]
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	60	70 (pH6, 1h)				[23]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6.5	70	65 (24h)	73±6			[24]
<i>Vibrio</i> sp. MA-138	6.5	40		49	3.8	Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	[25]
<i>Enterococcus casseliflavus</i> FL2121	6	50	40 (0.5h)	142		NBS, Hg <sup>2+</sup>	[26]
<i>Nocardioform actinomycetes</i>	8	75		41	4.8	Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	[27]
<i>Aspergillus aculeatus</i>	5	60		45	4.5		[28]
<i>Aspergillus fumigatus</i> IMI 385708	4.5	60	55	60	4.9-5.2		[29]
<i>Hordeum vulgare</i> L.	4.75			43	7.8		[30]
<i>Sesbania virgata</i>	3.5-5			26	4.5		[31]
<i>Mytilus edulis</i>	5.2	50-55		39	7.8		[32]

多くの $\beta$ -マンナーゼは分子量 30-80kDa で至適反応温度は 40-70°C、至適 pH は 3.5-9、等電点は 4-8 である[16-32]。今回 *Bacillus sp. necolon-1* から得られた酵素は LC-MS/MS より endo- $\beta$ -1,4-mannanase であると同定されたが、これは基質選択性 (Fig.1-10) や反応生成物の特徴 (Fig.1-13) などの実験データともよく一致した。酵素の至適 pH は 5.5 (Fig.1-7) であり至適反応温度は 40°C から 60°C (Fig.1-8) とヨーロッパイガイ *Mytilus edulis*、由来のマンナーゼに近い性質を持っている[32]。また 65°C 15 分の熱処理で完全に失活するが (Fig.1-9) 40°C で 1 時間加熱しても活性は変わらなかった (データ不記載)。さらに塩化マンガンで反応阻害が起こる (Fig.1-10) が、塩化マンガンでの反応阻害は *Bacillus subtilis* KU-1 [20]、*Bacillus sp. NTT33* [22]、海洋性バクテリア *Vibrio sp. MA-138* [25] や古細菌 *Nocardioform actinomycetes* [27] 由来の酵素でも見られている。今回得られた酵素ではその他のイオンによる強い阻害は見られなかった。反応基質の選択性はコンニャク>タラガム>グアガムの順で高かったが、*Lenzites sapiaria* NRCC 5910、*Polyporus versicolor* NRCC 5909、*Schizophyllum commune* NRCC 5911 など由来のマンナーゼにおいてもグルコマンナンに対する反応性の方がガラクトマンナンに対する反応性より高いことが報告されている[33]。

MS から得られた分子量は 41,893Da で SDS ページより求めた推定分子量 42kDa (Fig.1-4) とよく一致し、この分子量は多くのマンナーゼと同程度の大きさであった。しかし、MS から得られた PI 値は 6.31 でほぼ中性付近であったがほとんどのマンナーゼは酸性、もしくは 7.8 付近のものが多い。このように由来、分子量、PI 値、至適反応条件などの酵素の特徴において本マンナーゼと一致するマンナーゼは報告されていない。また今回得られた *Bacillus sp. necolon-1* は形態的に *Bacillus* 属であると同定されたが 16SrDNA での解析では一致する種は登録されていない。これらのことから新種の可能性の高い *Bacillus sp. necolon-1* より得られた endo- $\beta$ -1,4-mannanase は新規のものであると考えられる。

## 5-2 酵素反応生成物の粘度と分子量

コンニャク溶液のレオロジーについても多くの研究がなされてきた。しかしコンニャク溶液のレオロジーはコンニャク精粉の純度、溶液の濃度、溶媒の種類、酵素による分子量分布と平均分子量の変化の程度によって異なるため、その結果については研究者によって相違がみられる。Guangji Li らはアルカリ性 *Bacillus sp.* 由来のマンナーゼによって酵素処理した 1~2% コンニャク溶液において  $[\eta] = 5.06 \times 10^{-4} M_w^{0.754}$  が成立すると報告している[34]。

コンニャク溶液の極限粘度  $[\eta]$  と Huggins 定数  $k'$  は実験より得られる還元粘度 ( $\eta_{sp}/C$ ) より下記の Martin の式より求められる[35]。

$$\ln(\eta_{sp}/C) = \ln[\eta] + k' [\eta] C \quad (1)$$

(1) 式は酵素反応を行なう前のコンニャク溶液及びある程度の分子量サイズをもつコンニャク溶液には当てはまり、今回の実験での酵素反応前のグルコマンナン溶液は

$$[\eta]=13.25 \quad (2)$$

$$k'=0.27 \quad (3)$$

であった。

極限粘度は報告されているコンニャク溶液の $[\eta]=10\sim 20$ に近い値であったが、Huggins定数 ( $k'=0.5\sim 1$ ) [35,36,37,38]は低かった。

(1) 式は高分子で分子量分布の狭いものに対しては成立するが、酵素反応が進み分子量分布が広くなり低分子化した溶液には当てはまらない。そこで実験値より酵素反応後のコンニャク溶液に対して実際に使用できる式を実験的に求めることとした。

多くの合成高分子溶液の粘度と分子量の間には

$$[\eta]=KM^\alpha \quad (4)$$

という Mark-Houwink-桜田の式が成立するがこの  $K$  と  $\alpha$  は高分子と溶媒の種類、温度などによって決まる定数である。この式の極限粘度を測定粘度に置き換えたとき、酵素分解によって色々な分子量サイズにしたグルコマンナン溶液にも当てはまると仮定して各グルコマンナン溶液濃度  $C$  (%) の分子量  $M$  (×万) と粘度  $\eta$  (mPa・s) をプロットし (Fig.2-1) 定数  $K, \alpha$  を求めた。得られた各グルコマンナン濃度での  $K$  と  $\alpha$  の濃度依存性についてプロット (Fig.2-2, Fig.2-3) したところ、 $K, \alpha$  共に濃度依存性がありそれぞれグルコマンナン濃度に直線的な関係であったので、それぞれの近似式より下記の  $K$  と  $\alpha$  に対する濃度依存式を得た。

$$K=0.25e^{-6.15C} \quad (5)$$

$$\alpha=2.39C+0.36 \quad (6)$$

(5) と (6) の式を (4) 式に当てはめ、グルコマンナン濃度と粘度より分子量を概算するため下記の式を導き出した。

$$\eta=0.25e^{-6.15C}M^{(2.39C+0.36)} \quad (7)$$

この (7) 式の確かさを確認する為に実際に酵素反応を行なった既知の濃度のグルコマンナンの粘度を測定し (7) 式より推定分子量を求めゲル濾過で得た推定分子量と比較した結果を Table 5-2 に示す。

Table 5-2. 酵素反応後のグルコマンナンの実験式から得た推定分子量とゲル濾過より求めた推定分子量

	(7)式より求めた 推定分子量 (万)	ゲル濾過より求めた 推定分子量 (万)
1%グルコマンナン, 粘度 3mPa・s	23	20
0.5%グルコマンナン, 粘度 11mPa・s	81	80
0.1%グルコマンナン, 粘度 2.4mPa・s	120	100

一組の実験データから導いた(7)式は他の条件下に酵素反応が進み様々な分子量サイズになったグルコマンナン溶液に対しても当てはまった。

今回得られた酵素を実際に工業的に使用する場合、コンニャクゾルの濃度と粘度を測定することによりおよその分子量を知ることが出来、酵素反応のモニタリング等に用いることが出来る。

### 5-3 酵素産生誘導物質

マンナーゼを菌体外に大量に放出させる方法や酵素誘導物質については様々な研究がなされている。Mia Md. Zakaria らは好冷菌の一種である *Flavobacterium* sp. の培養条件の最適化についての検討の中で窒素源として Yeast extract、Casitone、Soyton、Trypton、NZ - amine、Bacto-peptone や Proteose-peptone を、炭素源として Guar gum や Locust bean gum の添加で、菌体培養液中のマンナーゼ活性が増加することを示した [39]。また *Bacillus subtilis* JS-1 は lactose や Locust bean gum の培地への添加によってマンナーゼ活性が誘導され [40]、*Trichoderma harzianum* E58 は Locust bean gum を添加した場合に最も高く活性が誘導され、マンノースなどの単糖類の添加で誘導がなくなることが報告されている [41]。

*Bacillus* sp. necolon-1 はグルコマンナン、ガラクトマンナン、ネギ類のジュース、グルコースやマンノースを含む培地で増殖するもののグルコースやマンノースといった単糖類のみを炭素源とした培地では培養液中にコンニャクゾルに対する減粘効果が認められない。このことから *Bacillus* sp. necolon-1 はネギ類のジュースやグルコマンナン、ガラクトマンナンを培地に含む場合にマンナーゼが誘導されることが分かった (Table 3-1)。この中で特にタマネギで強い活性が誘導されることを発見した。

タマネギの栄養学的な特徴としては糖質にオリゴ糖、特にフラクトースが多いこと [42]、表皮に多量に含まれるケルセチンは塩基と糖のフラノース環のグリコシド結合で共有結合しているフラボノール類であり [43]、タンパク質はすべての必須アミノ酸を含み、とくに硫黄を含むアミノ酸が多いことなどが知られている [44,45]。

タマネギに含まれている *Bacillus* sp. necolon-1 に酵素産生を誘導する物質はオートクレーブで処理をしてもその効果は変わらなかったことから熱に強い成分であること、比較的分子量のものであること、複数成分 (少なくとも 3 成分) 含まれていることが分かった (Fig.3-1)。今回確認できた 3 つの成分の推定分子量が比較的等間隔であることから同じ作用部位を持つ重合度の違う物質の可能性もある。*Schizophyllum commune* においてセルロースに由来した低分子物質が誘導物質となっているという報告 [46] や、コンニャク精粉を水で軽く洗い膨潤する前に両者を分け、多糖類が溶け込んでいない状態 (TLC で確認、データ不記載) の溶液を添加した場合にも誘導が確認されたので (データ不記載)、少糖類が誘導物質として働いている可能性がある。また精製した誘導物質の一つの UV スペクトラムでは 280nm 付近の吸収があること (Fig.3-4) や培地 polypepton を加えた場合にも誘導されたこと (データ不記載) から Tyr, Trp などを含む物質である可能性もある。

#### 5-4 食品工学的応用

コンニャクマンナンには食物繊維的作用のほかにも血清コレステロール上昇抑制作用があることが研究されてきた[47,48,49]。しかしコンニャクマンナンをゲル化した場合、生理作用のほとんどは消失してしまう[49]ことから、コンニャクマンナンの調製法や、利用法が種々検討されている。その中の一つに酵素を用いたコンニャクマンナンの低分子化がある。そのためにコンニャクマンナンの食物繊維を十分に維持しつつ、食品として取り扱いが容易な状態にまでコンニャクゾルの粘度を低下させることのできる酵素が求められている。

コンニャクグルコマンナンの加水分解酵素については古くから様々な研究がなされてきた。大槻はコンニャクが *Takadiastase* の酵素反応によって液化と糖化を起こし単糖まで加水分解すること、コンニャクマンナンの分解酵素が広く植物界、動物界に分布すること等を示した[50,51,52]。またコンニャクグルコマンナンが *Trechoderma viride* 由来のセルラーゼによって加水分解を受けオリゴ糖にまで分解することも報告されている[53]。その他にもコンニャクを低分子化する酵素にはマンナーゼ、マンノシダーゼなどが知られている[26,54,55]。

これらの酵素の食品への応用は大変興味深く、食品工学の分野でも注目されこれらの酵素を利用した加工食品について多くの特許が申請、公開されている。例えば、成型後のコンニャクに酵素処理し微粒子コンニャクを製造する方法（特許 3523568）、酵素を加え液化したコンニャク飲料の製造方法（特開平 08-336375）などがある。これらの特許において広く利用されているのは食品添加物として認められているセルラーゼである。

湿潤乾燥したタマネギの水抽出液であり、タマネギで誘導され *Bacillus sp. necolon-1* で生産・分泌される endo- $\beta$ -1, 4 mannanase と同等の粗酵素液である Geloosener-K を使用して軟化させたコンニャクゾルをアルカリで固化することにより通常より柔らかいコンニャクゲルを作ることが出来た (Fig. 4-2, 4-3)。 *Bacillus sp. necolon-1* から得られたマンナーゼは大量に加えたり、長時間反応すれば単糖まで分解する (Fig.1-13) が、5%のコンニャクゾル 300g に対して Geloosener-K を 1ml 添加し室温にて 30 分反応させることで取り扱いが容易な程度に粘度は低下し、固化に十分な分子量を持ちながら、コンニャクゲルの特性を失った新しい食感のコンニャクが得られる。

この酵素処理したコンニャクゲルを試食したところ、コンニャク特有の歯ごたえや噛み切り難さは無くワラビ餅のような食感になっていた。酵素の添加量を増やすとコンニャクゾルは液化しアルカリを加えてもまばらにしか固化せず、粥状になる。また液化したコンニャクゾルを噴霧乾燥すると、水に容易に分散して溶ける粉コンニャクを得ることが出来る。更に Geloosener-K はコンニャクゲルにも作用しゲル表面から液化させることも出来る。

市販のコンニャク入りのゼリーは普通のゼリーに比べて弾力性が強く、口の中で砕け難い為、幼児や高齢者がのどに詰める事故が起りやすく 2006 年に 1 件、2007 年に 2 件の死亡事故が報告されている[56]。EU ではゼリー菓子の食品添加物としてコンニャクの使用は禁止されており、オーストラリアでもコンニャクは食品添加物として認められていない。

Geloosener-K によって酵素処理を行なったコンニャクであれば弾性を失っているため、このような問題もクリアできる。

また、高齢者の死因の1つに誤嚥性の肺炎があるが、防止策として食品にとろみをつければよいことが経験的に知られている[57]。また、咀嚼と連動した嚥下は誤嚥を起し難いので、老人が噛み切れて溶ける程度の軟らかいコンニャクのゼリーやプリンを作ったり、液化させた、わずかにとろみのあるコンニャクを用いてスープなどを作って摂取すれば通常のコンニャクが食べにくい人も同量の食物繊維を取ることが出来る。このように Geloosener-K をコンニャクゾル/ゲルに作用させ、適度に低分子化させたコンニャクは加工食品の分野での広い利用が考えられ、粗酵素液 Geloosener-K 及び、今回同定した Geloosener-K の主成分マンナナーゼの様々な用途での利用が期待できる。

## 第6章 結語

40°Cで放置、崩壊したタマネギから粘性の高いコンニャク溶液に対して減粘効果を持つ酵素を菌体外に出す *Bacillus sp. necolon-1* を得た。この *Bacillus sp. necolon-1* は新種の可能性があり特許生物寄託センターに登録、寄託された。*Bacillus sp. necolon-1* から得られた菌体外酵素が単離され *endo-β-1, 4 mannanase* と同定され、その特性が明らかになり新規マンナーゼとして様々な分野への利用が期待できる。しかし、今回得られた酵素は540倍に精製できたが、収率が1.1%と低いので、この酵素を精製酵素として実用的に利用する為には精製方法の検討を行なう必要がある。

*Bacillus sp. necolon-1* においてこの酵素はグルコマンナン、ガラクトマンナン、ネギ類のジュースなどで誘導され、特にタマネギジュースを用いた培地において強く誘導されることが分かった。様々な炭素源、窒素源を用いた培地を用いて色々な微生物を培養しマンナーゼの産生を高める研究がなされているが、タマネギジュースを使用した培地を用いて菌体を培養しマンナーゼを得る方法についての報告はない。タマネギジュースの中に含まれる誘導物質は低分子のもので、少なくとも3種類あることが確認でき、そのうちの1種類を単離することが出来た。今後、この成分の同定、他の誘導成分の単離・同定、更には誘導の作用機構の解明を行なう必要がある。

酵素を作用させたコンニャク溶液には急激な粘度低下が起こり、成分のグルコマンナンが低分子化し分子量分布が広がる。この酵素を作用させたコンニャク溶液の粘度と分子量を調べることにより、既知濃度のコンニャク溶液の粘度を測定することで分子量を推定出来る実験式を得た。

コンニャクは日本固有の伝統食品であり、その効用は広く知られている。しかしその強い弾性の為に独特の食感を持ち、どのような加工をしてもその食感は変わらない。また原料であるコンニャク精粉は一般に水に溶解し難く、膨潤した後は高い粘性を持つ為に取り扱い、加工が容易ではない。本研究で単離・同定された *endo-β-1, 4 mannanase* を主成分とする *Geloosener-K* で処理をしたコンニャク溶液は粘度が下がるので取り扱い加工が容易で、液化後噴霧乾燥すれば水に溶解しやすいコンニャク粉を得られる。更に、*Geloosener-K* で適当な分子量まで切断処理をしたコンニャクゾルをアルカリで固化することにより、通常より柔らかく、簡単に噛み切れ、口の中で容易にすりつぶせる、もしくは溶けるコンニャクゲルを得ることが出来た。*Geloosener-K* で処理したコンニャクを様々な加工食品に応用することにより、ダイエットや健康を気にかける人だけでなく、幼児や高齢者も安心して食べられる食物繊維のコンニャク食品が出来る。

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、実験から論文作成に至るまで絶えず豊かな才学と豊富な経験で御指導と御助力を賜った高知工科大学 総合研究所 特任教授 向畑恭男教授に深く感謝し御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり惜しめない御協力と御助言をいただいた 高知工科大学 榎本恵一教授、松本信也教授、大濱武教授、細川隆弘教授、有賀修准教授ならびに堀沢栄准教授に深く感謝いたします。

本研究を行なうきっかけとなる発見をし、有益な知見を与えてくださった神戸隆介氏、本研究遂行の為に数々の有益な御助言をいただいた山崎朋人氏の両氏に心より感謝し御礼申し上げます。また、常にご協力いただいた大石裕史君、環境生物工学研究室の卒業生及び在籍する諸君に深く感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Kato, K. and Matsuda, K. : Agr. Biol. Chem., 33, 1446(1969); 34, 532 (1970); 36, 639 (1972)
- [2] Smith, F. and Srivastava, H.C. : Constitutional studies on the glucomannan of konjac flour, Journal of the American Chemical Society 81 (7), pp. 1715-1718 (1959)
- [3] Maekaji, K. : The mechanism of gelation of konjac mannan, Agricultural and Biological Chemistry 38 (2), pp. 315-321 (1974)
- [4] 岸田典子 : 広島女子大学家政学部紀要, 11, 45 (1976)
- [5] Sugiyama, N., Shimahara, H., Andoh, T., Takemoto, M. and Kamata, T. : Agr. Biol. Chem., 36, 1381 (1972)
- [6] Koshida, N., Okimasu, S. and Kamata, T : Agric. Biol.Chem., 42, 1645 (1978)
- [7] Kishida, N. : Agric. Biol.Chem., 43, 2391 (1979)
- [8] 畑敏雄, 大野泰雄, 戸田茂 : 工化, 54, 105 (1951)
- [9] Maekaji, K. : Determination of acidic component of konjac mannan, Agricultural and Biological Chemistry 42 (1), pp. 177-178 (1978)
- [10] 前梶健治 : 農化, 52, 251 (1978)
- [11] 前梶健治 : 農化, 52, 485 (1978)
- [12] 前梶健治 : 農化, 52, 513 (1978)
- [13] Onishi, N., Kawamoto, S., Ueda, K., Yamanaka, Y., Katayama, A., Suzuki, H., Aki, T., Hashimoto, K., Hide, M., Ono, K. : Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71 (10), pp. 2551-2556 (2007)
- [14] Loening-Baucke, V., Miele, E., Staiano, A. : Fiber (glucomannan) is beneficial in the treatment of childhood constipation, Pediatrics 113 (3 Pt 1), pp. e259-264 (2004)
- [15] Doi, K., Matsuura, M., Kawara, A. : Treatment of diabetics with dietary fibers (IV). The effect of high viscosity of dietary fibers on the postprandial blood glucose, Journal of the Japan Diabetes Society 25 (3), pp. 197-203 (1982)
- [16] Akino, T., Nakamura, N., Horikoshi, K. : Production of  $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp., Applied Microbiology and Biotechnology 26 (4), pp. 323-327 (1987)
- [17] Chen, Y., Long, J. et al. : Study on the production of beta-mannanase by *Bacillus* M50, Wei sheng wu xue bao Acta microbiologica Sinica 40 (1), pp. 62-68 (2000)
- [18] N. S. Mendoza, M. Arai, T. Kawaguchi, T. Yoshida and L. M. Joson : Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*, WorldJournal of Microbiology & Biotechnology 10, 551-555 (1994)

- [19] Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W.D., Ito, S., Horikoshi, K. : Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme, *Extremophiles* 9 (6), pp. 497-500 (2005)
- [20] M. M. Zakaria, S. Yamamoto and T. Yagi : Purification and characterization of an endo-1,4- $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1, *FEMS Microbiology Letters* 158 (1), pp. 25-31 (1998)
- [21] Min, D. S., Chung, Y. J., Hahm, B. K., Yu, J. H. : Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase from a *Bacillus* sp. YA-14, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 6 (2), pp. 86-91 (1996)
- [22] Yang, Q., Cao, J. : The purification and properties of alkaline  $\beta$ -mannanase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33, *Wuhan Daxue Xuebao/Journal of Wuhan University* 44 (6), pp. 764 (1998)
- [23] Jun Zhang, Zhimin He and Kun Hu : Purification and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus licheniformis* for industrial use, *Biotechnology Letters* 22:1375-1378 (2000)
- [24] Talbot, G., Sygusch, J. : Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology* 56 (11), pp. 3505-3510 (1990)
- [25] Y., Tamaru, T., Araki, H., Amagoi, H., Mori, and T., Morishita : Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -1,4-Mannanase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain MA-138, *Applied and Environmental Microbiology*, p.4454-4458 Dec. (1995)
- [26] Oda, Y., Komaki, T., Tonomura, K. : Production of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed Konjac, *Food Microbiology* 10 (4), pp. 353-358 (1993)
- [27] Wu, J., He, B. : Purification and properties of beta-D-mannanase from *Nocardioform actinomycetes*, *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 40 (1), pp. 69-74 (2000)
- [28] Christgau, S., Kauppinen, S., Vind, J., Kofod, V., Dalboge, H. : Expression cloning, purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*, *Biochemistry and Molecular Biology International* 33 (5), pp. 917-925 (1994)
- [29] Puchart, V., Vršanská, M., Svoboda, P., Pohl, J., Ögel, Z.B., Biely, P. : Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly

- Thermomyces lanuginosus IMI 158749), Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1674 (3), pp. 239-250 (2004)
- [30] Hrmova, M., Burton, R.A., Biely, P., Lahnstein, J., Fincher, G.B. : Hydrolysis of (1,4)- $\beta$ -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- $\beta$ -D-mannan endohydrolase and  $\beta$ -D-mannosidase, Biochemical Journal 399 (1), pp. 77-90 (2006)
- [31] Lisboa, C.G.S., Tonini, P.P., Tiné, M.A.S., Buckeridge, M.S. : Endo- $\beta$ -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): Purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth, Brazilian Journal of Plant Physiology 18 (2), pp. 269-280 (2006)
- [32] Xu, B. : endo- $\beta$ -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis* : Purification, characterization, and mode of action, Journal of Biotechnology 92 (3), pp. 267-277 (2002)
- [33] K. G. Johnson : Exocellular  $\beta$ -mannanases from hemicellulolytic fungi, World Journal of Microbiology and Biotechnology 6, 209-217 (1990)
- [34] Li, G., Qi, L., Li, A., Ding, R., Zong, M. : Study on the kinetics for enzymatic degradation of a natural polysaccharide, Konjac glucomannan, Macromolecular Symposia 216, pp. 165-178 (2004)
- [35] 前梶健治 : 九州大学農学部学位請求論文, p37 (1981)
- [36] 鳥瀉博敏 : 日本化学会誌, 73, 157 (1952)
- [37] 平井西夫, 西村範生 : 日化, 75, 248 (1954)
- [38] 渡瀬峰男 : 食工誌, 22, 488 (1975)
- [39] Mia Md. Zakaria, Makoto Ashiuchi, Shinpei Yamamoto, and Toshiharu Yagi : Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(4), 655-660 (1998)
- [40] Yim, J.-S., Jung, J.-W., Lee, J.-S., Kang, D.-K., Kim, H.-K. : Optimization of  $\beta$ -mannanase production from *Bacillus subtilis* JS-1, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology 31 (1), pp. 57-62 (2003)
- [41] Torrie, J.P., Senior, D.J., Saddler, J.N. : Production of  $\beta$ -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58, Applied Microbiology and Biotechnology 34 (3), pp. 303-307 (1990)
- [42] Shiomi, N., Onodera, S., Sakai, H. : Fructo-oligosaccharide content and fructosyltransferase activity during growth of onion bulbs, New Phytologist 136 (1), pp. 105-113 (1997)
- [43] Tsushida, T., Suzuki, M. : Content of flavonol glucosides and some properties of enzymes metabolizing the glucosides in onion (Flavonoid in fruits and vegetables, part II), Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 43 (5), pp. 642-649 (1996)

- [44] Schwerdtfeger, E., Schuphan, W : Protein and amino acids in food plants - Evaluating the results of 38.000 analyses (1951-1973) of the Bundesanstalt für Qualitätsforschung pflanzlicher Erzeugnisse, Geisenheim/Rheingau, *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition* 26 (1-3), pp. 29-70 (1976)
- [45] Block, E. : The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angewandte Chemie - International Edition in English* 31 (9), pp. 1135-1178 (1992)
- [46] Haltrich, D., Steiner, W. : Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: Effect of medium components, *Enzyme and Microbial Technology*, pp. 229-235 (2007)
- [47] Terasawa, F., Tsuji, K., Tsuji, E., Oshima, S., Suzuki, S. and Seki, M. : 栄養学雑誌, 37, 23 (1979)
- [48] 渡辺孝, 生方茂雄, 柳沼碧, 山口員男, 菅井芳郎, 大沢孝治, 湯浅和夫, 山田結子 : 日本医事新報, No.2829, 43 (1978)
- [49] 辻啓介, 大島寿美子, 辻悦子, 鈴木慎次郎, 印南敏, 中村敦子, 平山昌子, 手塚朋通 : 栄養学雑誌, 31, 152 (1973)
- [50] 大槻虎男 : マンナンの研究 (第十報) 蒟蒻マンナンの酵素分解に就いて, *日本化学会誌*, 61, 531 (1940)
- [51] 大槻虎男 : 植物学雑誌, 46 (1932) , 461; 51 (1937)
- [52] 大槻虎男 : 動物学雑誌, 42 (1939) , 379; 42 (1930)
- [53] 佐藤利夫, 森谷昭彦, 水口純, 鈴木周一 : コンニャクグルコマンナンの酵素分解, *日本化学会雑誌*, 91, 11, 1071 (1970)
- [54] 辻坂好夫, 桧山圭一郎, 竹西繁行, 福本寿一郎 : 農化, 46, 155 (1972)
- [55] Emi, S., Yamamoto, T. : Purification and properties of several galactanases of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (11), pp. 1945-1954 (1972)
- [56] 食品安全委員会 : 食品安全委員会が自ら食品健康影響評価を行なう案件の候補について, (2007)
- [57] 西成勝好, 大越ひろ, 神山かおる, 山本隆 編 : 「食感創造ハンドブック」, サイエンスフォーラム (2005)