

新規異性体蔗糖“イソピラノスクロース”の酵素的生産

小野寺 秀一 [酪農学園大学 / 教授]
岡田 秀紀 [大高酵素 / 主任研究員]
上野 敬司 [光塩学園女子短期大学 / 講師]

背景・目的

現在までに多数の機能性食品素材が開発されている。それらの中で機能性オリゴ糖が多くを占めている。最近筆者らは、フルクトピラノシル基を構成単位とするノンカロリー、甘味性の蔗糖異性体(イソピラノスクロース)を天然(植物エキス発酵液)から初めて見出した。この糖の単離および構造解析を行ったところ、フルクトピラノースとグルコピラノースからなる新しい二糖類であった。このような糖がどのようにして合成されるのか全く不明である。本研究は、イソピラノスクロースの合成に関与する酵素を関連酵母から単離して、大量生産のための重要な知見を得ることを目的としている。

内容・方法

1) 酵素生産菌の単離と同定

植物エキス発酵液中には各種の酵母および乳酸菌が含まれ、それぞれ発酵に関与している。そこで、これらの微生物から、イソピラノスクロース合成に関与する微生物を単離・同定するとともに、イソピラノスクロース合成酵素を見出す。

2) イソピラノスクロース合成酵素の精製

予備的研究から、菌体を除去した発酵液中には酵素活性が認められなかった。そこで、イソピラノスクロース合成酵素を生産する微生物を大量に培養し、菌体抽出液より各種クロマトグラフィー操作を駆使して本酵素を高度に精製する。また、精製と平行して簡便かつ高感度の酵素活性測定法を開発する。

3) 精製酵素のキャラクタリゼーション

イソピラノスクロース生産の最適化のために、本酵素に対するpH、温度の影響を明らかにする。さらに、基質濃度および反応時間等の反応条件変えることによりイソピラノスクロース生産性を詳細に検討する。

結果・成果

1) 酵素生産菌の単離と同定

植物抽出液は、リンゴ、バナナ、ナシ等の果実類およびニンジン、ダイコン、キャベツ等の野菜類に同重量の蔗糖を加え、圧搾せずに21日間抽出を行うことにより得られた。このものを37℃で自然発酵させることにより発酵液が得られるが、この発酵液より微生物の分離を行った。その結果、複数の酵母、すなわち、*Saccharomyces* spp.、*Pichia* spp.、*Candida* spp.、*Hansenula* spp.、および複数の乳酸菌、すなわち、*Leuconostoc* spp.、*Bifidobacterium* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Streptococcus* spp.、*Pediococcus* spp.、*Lactococcus*

spp.が分離された。各菌株をそれぞれ液体培養してろ液および菌体について酵素生産菌を検索した。なお、菌体については超音波処理により菌体を破碎して菌体抽出液と細胞壁画分について活性を測定した。その結果、複数の酵母の菌体抽出液に活性が認められ、最も酵素活性が高い菌として*Pichia anomala*株を得た。

2) イソピラノスクロース合成酵素の精製

*Pichia anomala*株を大量培養したのち遠心分離により得られた湿菌体は、洗菌後、凍結乾燥処理を行って-40℃で保存した。凍結乾燥菌体3.0gを2mMのdithiothreitolを含む150mlのリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎したのち、遠心分離により粗酵素液を回収した。この粗酵素液をDEAE-Sepharose CL-6B、Toyopearl HW-65F、同HW-55S、Hydroxyapatite type-を用いた各種カラムクロマトグラフィー操作を行ってイソピラノスクロース合成酵素を精製した。また、反応生成物の定量法として、2種の方法、すなわち、糖をABEE(p-aminobenzoic acid ethyl ester)を用いて標識したのち、ODSカラムを用いて逆相HPLCにより定量する方法、および何ら糖に修飾を加えずにHPAEC-PAD法で定量する方法を開発した。いずれの方法でも高感度でイソピラノスクロースを定量することが可能であった。

3) 精製酵素のキャラクタリゼーション

精製酵素の分子量は、SDS-PAGEより75kDと算出された。本酵素は低濃度の蔗糖を基質として加水分解反応を触媒することから、 α -フルクトフラノシダーゼに分類されると考えられた。しかしながら高濃度のグルコース・フルクトース混合液を基質として用いるとイソピラノスクロースを合成し、基質濃度および反応時間の増加に応じて生成量が増大した。本酵素の最適pHは、5.4と算出された。また、酵素の安定性に関して検討したところ、pHに対しては5.4~8.5の範囲で安定であり、温度に対しては15分処理で40℃まで安定であることがわかった。本酵素の反応生成物中にはフルクトピラノースを含む三糖類もまた存在しており、植物エキス発酵液中で発見された二糖類および三糖類が本酵素によって合成されていることが確認された。

今後の展望

これまで、 α -フルクトフラノシダーゼの縮合または転移反応によるフルクトピラノースを含む糖の生成に関する報告はなく、酵素反応機構の解明が大いに期待される。また、各種の α -フルクトフラノシダーゼの遺伝子が数多く報告されており本酵素をコードする遺伝子との異同も大変興味深い。本酵素遺伝子の取得と組換え酵素の生産によりイソピラノスクロースの大量生産が現実のものになると容易に予想されるため、今後はイソピラノスクロースの食品・栄養機能の解析および開発とともに本酵素タンパクの大量生産法およびイソピラノスクロース合成能力の高い改変酵素の開発が急務であると考えられる。