

乳糖発酵性酵母の β -ガラクトシダーゼ生産

村 松 圭・野 村 真 之・菊 地 政 則

Lactose-fermenting Yeasts Compared on Their Production of β -Galactosidase

Kei MURAMATSU, Masayuki NOMURA and Masanori KIKUCHI
(September 1999)

緒 言

β -ガラクトシダーゼ (β -D-galactoside-galactohydrolase, EC 3.2.1.23) は乳糖をブドウ糖とガラクトースに加水分解する酵素であり、多くの動物や微生物に存在し、乳糖の消化あるいは複合糖質の代謝に関与している。植物にも広く分布しているが、その役割についてはよく分かってはいない^{8,10)}。

近年、食品工業において β -ガラクトシダーゼは乳糖不耐症者のための乳糖分解乳の製造に用いられている。酵素源として実際に牛乳の乳糖分解処理に使用されているのは、中性付近に最適 pH をもつ β -ガラクトシダーゼを生産する酵母である⁴⁾。

乳糖を発酵する能力を持ち合わせている酵母、すなわち乳糖発酵性酵母を生乳あるいは伝統的発酵製品である乳酒中から分離し、その中の *Candida*³⁾、*Touloopsis*³⁾、*Kluyveromyces*^{5,7)} などの β -ガラクトシダーゼ活性の高い株について酵素生産性や酵素の性質などが調べられ、牛乳やホエーの有効的な利用が試みられている。

今回、乳糖発酵性酵母を乳糖を炭素源として培養し、その菌体内 β -ガラクトシダーゼ生産を経時的に調べた。さらに菌体内粗 β -ガラクトシダーゼを調製し、その性質について検討した。 β -ガラクトシダーゼを食品工業で利用する際、その乳糖分解能を評価することが重要であるが、 β -ガラクトシダーゼ活性は人工的に合成した基質である *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) を基質として、遊離する *o*-nitrophenol の色素を測定している場合が多い。そのため、ONPG 分解能を実際に牛乳中の乳糖分解能として応用できるのか疑問が持たれている⁵⁾。今回 β -ガラクトシダーゼ活性は、ONPG だけ

でなく、乳糖を基質として用い、酵素反応により遊離したガラクトースを定量することにより調べ、両基質に対する分解能の比較も合わせて行った。

また扱った乳糖発酵性酵母の β -ガラクトシダーゼの性質に、これまで報告のないユニークな知見が得られたため、それについても合わせて報告する。

実験材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

本実験に用いた乳糖発酵性酵母は、比較的アルコール生成能の高かった、*Kluyveromyces marxianus* IFO 0541 と *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* 1-2 株を用い、乳糖を炭素源とした YM 培地 (2%乳糖, 0.5%ポリペプトン, 0.3%酵母エキス, 0.3%麦芽エキス) に 1.5%の寒天を含む斜面培地に保存した。

両酵母の培養は、500 ml の坂口フラスコに炭素源を 1%乳糖とした YM 培地 200 ml に、前培養液を 2 ml 接種し 28℃で振とうすることにより行った。得られた培養液を 6,000×g, 20 分間遠心分離し、上清液および菌体を回収した。菌体はさらに 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて洗浄した。培養上清液、および菌体は -40℃で凍結保存した。

菌体の乾燥重量は凍結乾燥を行い計測した。

2. 粗酵素 (菌体抽出液) の調製

得られた菌体を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に懸濁し、さらに菌体 1 g (湿重量) に対しガラスビーズ 1 g を加えた。この混合液を超音波破砕機 (Branson model 450) を用いて 20 分間超音波処理することにより菌体を破砕した。破砕液を 28,000×g で 20 分間遠心分離し、上清液を 0.01 M リン酸緩

衝液 (pH 7.0) 中で一晚透析したものを粗酵素液とした。なお全ての操作は 4 °C で行った。

3. 酵素活性の測定

酵素活性は ONPG を基質とし、遊離する *o*-nitrophenol の吸光度をアルカリ性条件下 (pH 11.0) において 416 nm で測定算出した。標準反応液の組成は 0.5% ONPG 溶液 0.5 ml, 粗酵素液 0.1 ml, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.4 ml の計 1.0 ml とした。30 °C で 10 分間温浴し, 0.5 M ホウ酸緩衝液 (ホウ酸, KCl-Na₂CO₃, pH 11.0) 2 ml を混合し反応を止め, 生成した *o*-nitrophenol 量を測定した。

乳糖を基質とした酵素活性は, 遊離するガラクトースを酵素法¹⁾によって測定算出した。標準反応液の組成は 0.5% 乳糖溶液 0.5 ml, 粗酵素液 0.1 ml, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.4 ml の計 1.0 ml とした。30 °C で 10 分間温浴し, 100 °C で 3 分間加熱して反応を止めた後, 生成したガラクトース量を測定した。

酵素単位は上記の条件下において 1 分間に 1 μmol の反応生成物を生成する酵素量を 1 ユニット (U, unit) とした。

4. タンパク濃度の定量

タンパク濃度は, 銅-Folin 法 (Lowry 法) を応用した DC-プロテインアッセイキット (Bio-Rad 社) を用いて 655 nm の吸光度によって算出した。

5. エタノールの定量

培養上清液に同量のアセトン溶液を内部標準液と

して混和した試料を調製し, ガスクロマトグラフィ装置 (日立 G-3000) によりエタノールを定量した。なおカラム充填剤としてポリエチレングリコール 6000 (SHIMADZU 社) を用い, キャリヤガスを He, カラム温度を 60 °C とし, FID により検出した。

結果および考察

乳糖発酵性酵母の増殖とエタノール生成

乳糖発酵性酵母 6 株を少量の YM 液体培地中で培養し, 予備実験として, 乳糖からのアルコール生成能を確かめた (Table 1.)。どの菌株も培養 72 時間で最大のエタノール生成を示し, 中でも *K. marxianus* IFO 0541 株と内蒙古の牛乳・乳製品から分離した *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株が高いエタノール生成を示した。この 2 株を β-ガラクトシダーゼ生産の実験に用いた。

乳糖を炭素源とした YM 液体培地 200 ml を用いて振とう培養を行った際の乳糖発酵性酵母の増殖とエタノール生成について検討した (Fig. 1.)。 *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株は培養 24 時間後まで菌体重量が 0.014 g と増殖が認められなかったが,

Table 1 Production of Ethanol by Lactose-fermenting Yeasts.

Strain	Ethanol yield (%)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IFO 0541	0.72
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> 1-2	0.70
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IFO 0288	0.66
<i>Candida kefyr</i> IFO 0882	0.45
<i>Kluyveromyces marxianus</i> AHU 3174	0.45
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> AHU 3967	0.36

Lactose-fermenting yeasts were cultivated for 72 hours.

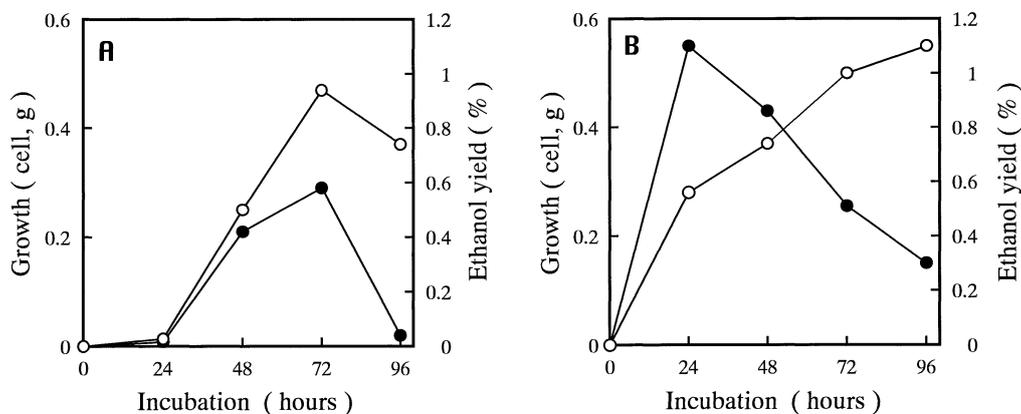


Fig. 1 Time course of Growth and Ethanol Production in Lactose-fermenting Yeasts.

Cultivation procedures are described in Materials and Methods.

(A) *K. marxianus* var. *lactis* 1-2; (B) *K. marxianus* IFO 0541.

○: growth as indicated by dry wt. of cells (g); ●, ethanol yield (%)

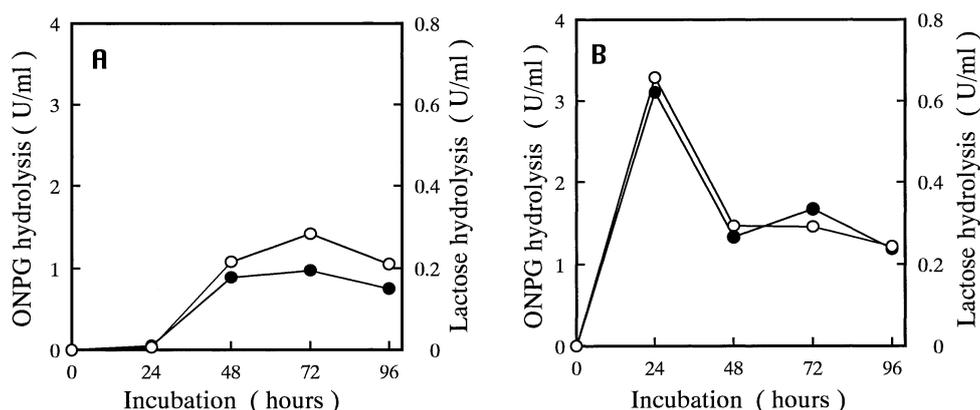


Fig. 2 Time course of β-Galactosidase Activity in Lactose-fermenting Yeasts. Measurement of enzyme reaction is described in Materials and Methods. (A) *K. marxianus* var. *lactis* 1-2; (B) *K. marxianus* IFO 0541. ○: ONPG hydrolysis (U/ml); ●: lactose hydrolysis(U/ml)

その後急激に増加し、培養72時間後で0.467gと最大となり、それ以降は菌体重量に変化はみられなかった。培養液中のエタノール濃度は72時間後で0.58%と最大であり、培養96時間後に0.04%まで急激に低下した。このことから今回の培養条件では *K. marxianus* var. *lactis* 1-2株の活発な増殖および代謝は72時間をピークとしてその後急激に低下することが確認された。*K. marxianus* IFO 0541株は培養24時間後で菌体が0.282gと急激に増加した後も96時間まで0.616gと増加し続けた。しかし培養液中のエタノール濃度は24時間後で1.10%と最大になり、それ以降の増加は認められず、0.30%まで減少した。

培養中のβ-ガラクトシダーゼ活性の推移

培養中の菌体内β-ガラクトシダーゼ活性の推移をONPGおよび乳糖を基質として調べた(Fig. 2.)。 *K. marxianus* var. *lactis* 1-2株は培養24時間までONPGおよび乳糖分解活性はほとんど確認されなかった。その後、培養48時間でONPG分解活性が1.1 U/ml、乳糖分解活性が0.18 U/mlと増加し、培養72時間後でONPG分解活性が1.4 U/ml、乳糖分解活性が0.20 U/mlと最大となり、培養96時間後では両分解活性ともに減少した。*K. marxianus* IFO 0541株は培養24時間後でONPGおよび乳糖分解活性ともに急激に増加し、ONPG分解活性が3.3 U/ml、乳糖分解活性が0.62 U/mlと最大となった。培養48時間後では両分解活性ともに急激に減少し、その後培養96時間までほぼ一定の値を示した。

酵素の誘導あるいは活性減少の機構を確かめるために培養中のβ-ガラクトシダーゼの比活性 (U/mg

Table 2 Specific Activity of β-Galactosidase from *K. marxianus* IFO 0541.

Culture period	ONPG Hydrolysis U/mg (U/ml)	Lactose Hydrolysis U/mg (U/ml)
24h	0.36 (3.3)	0.068 (0.62)
48h	0.27 (1.5)	0.050 (0.27)
72h	0.20 (1.5)	0.046 (0.34)
96h	0.24 (1.2)	0.047 (0.24)

ONPG: o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside.

of protein) についても検討した (Table 2.)。 *K. marxianus* IFO 0541株の培養中の菌体内酵素の比活性は培養24時間後で両基質ともに最大となったが、48時間後で急激に減少しその後96時間までほぼ一定の値を示した。これまで報告された乳糖発酵性酵母 *K. lactis* のβ-ガラクトシダーゼの比活性は1.67, 1.59 U/mg of proteinであり³⁾、それに比べかなり低い値であった。

ほとんど全ての酵母はβ-ガラクトシダーゼを乳糖存在下において誘導し、乳糖が消費されるとその誘導を停止することが知られている。菌の増殖とエタノール生成の結果から、 *K. marxianus* IFO 0541株は培養24時間で、エタノールを生成する嫌気的なアルコール発酵するエネルギー代謝から、生成しない好気的な代謝系への変換が考えられた。しかしながら培養48時間後のβ-ガラクトシダーゼの比活性の急激な減少は酵素の誘導の停止を示唆している。したがって菌が増殖しているにもかかわらず、培養48時間後のエタノール生成量の減少は、培養液中の乳糖のほとんどを酵母自身で消費したためと思われる。今回の実験では菌の乳糖消費量すなわち培養液中の乳糖量を調査しなかったが、今後さらに乳糖消

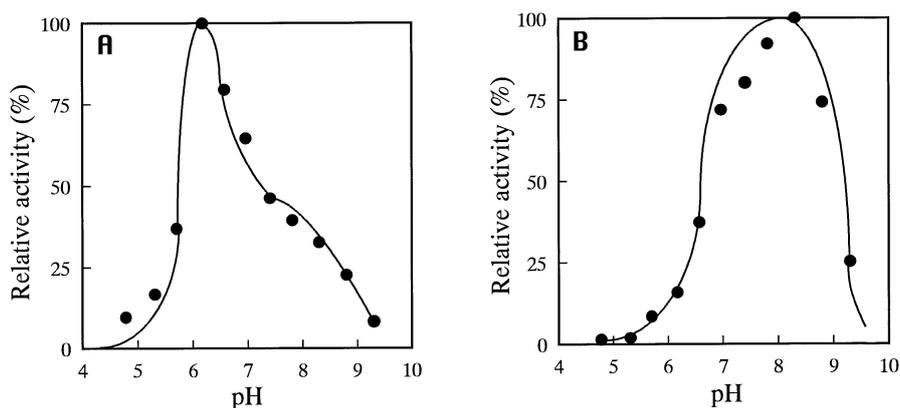


Fig. 3 Effects of pH on β -Galactosidase Production in Lactose-fermenting Yeasts.

The reaction mixture, containing 0.5ml of 0.5% ONPG, 0.4ml Briton-Robinson buffer (0.04 M H_3PO_4 , 0.04 M CH_3COOH , 0.04 M H_3BO_4 -0.2 M NaOH), and 0.1ml crude enzyme, was incubated at 28°C for 10min. (A) *K. marxianus* var. *lactis* 1-2; (B) *K. marxianus* IFO 4010.

費と酵素の誘導について検討すべきであろう。

ONPGおよび乳糖に対する分解能については Fig. 2.から明らかなように, *K. marxianus* var. *lactis* 1-2株あるいは *K. marxianus* IFO 0541株ともに同じような推移を経ており, 今回の実験では ONPG 分解能を乳糖分解能としてほぼ評価でき得る結果となった。しかしながら Kim ら⁵⁾の報告でも指摘されているように, 乳糖からのエタノール生成量の少なかった酵母, あるいは ONPG 分解活性が高いのにもかかわらず乳中で培養した時の増殖が弱い菌株等に関してあてはまるかどうか今後さらに研究すべきであろう。

β -ガラクトシダーゼの特性

K. marxianus var. *lactis* 1-2株と *K. marxianus* IFO 0541株の β -ガラクトシダーゼの至適 pH を調べた (Fig. 3)。緩衝液として Briton-Robinson buffer (0.04 M H_3PO_4 , 0.04 M CH_3COOH , 0.04 M H_3BO_4 -0.2 M NaOH) を用い, 37°C で 10 分間反応させ, 各 pH に対する相対活性を求め pH-活性曲線をプロットした。その結果 *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株の ONPG を基質としたときの至適 pH は 6.0 付近, *K. marxianus* IFO 0541 株は 8.0 付近であった。

これまで報告された乳糖発酵性酵母の β -ガラクトシダーゼの至適 pH は, *Saccharomyces lactis*, 7.2²⁾, *S. fragilis*, 6.8⁹⁾, *Tolulopsis versatilis* M6, 7.0³⁾, *T. sphaerica* J28, 7.0³⁾, *Candida psuedotropicalis*, 7.5³⁾ といずれも 7.0 あるいは 7.5 付近であり, 今回の *K. marxianus* var. *lactis* 1-2

株と *K. marxianus* IFO 0541 株は異なる結果となった。

各種金属イオンを 1 mM 添加した際の酵素反応への影響を調べた (Table 3)。緩衝液として 0.1 M MOPS [3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸] 緩衝液 pH 7.0 を用い, ONPG を基質として 37°C で 10 分間反応させ求めた。

乳糖発酵性酵母の β -ガラクトシダーゼ活性は金属イオン存在下で影響を受けることが報告されている。*T. versatilis* M6³⁾, *T. sphaerica* J28³⁾, *C.*

Table 3 Effects of Various Metal Ions on β -Galactosidase Activity.

Reagent (1mM)	Relative activity (%)	
	1-2 ^a	0541 ^b
None	100	100
MgSO ₄	97	330
MgCl ₂	130	280
MnSO ₄	72	200
MnCl ₂	100	160
CaCl ₂	390	25
NaCl	100	110
KCl	100	230
LiCl	100	98
H ₃ PO ₄	99	52
BaCl ₂	77	36
CoCl ₂	15	4.7
HgCl ₂	7.4	15
CuCl ₂	5.9	1.6
CuSO ₄	0	0
ZnCl ₂	0	0

^a *K. marxianus* var. *lactis* 1-2.

^b *K. marxianus* IFO 0541.

*psuedotropicalis*³⁾, *K. lactis*⁵⁾ の β -ガラクトシダーゼは Mg^{2+} , Mn^{2+} の 2 価の金属イオンにより活性が 1.1~1.2 倍ほど上昇することが報告されている。*K. marxianus* IFO 0541 株は Mg^{2+} , Mn^{2+} の 2 価の金属イオンにより β -ガラクトシダーゼ活性が 1.5~3 倍に上昇し、これまでの報告に比べ高い結果となった。また K^+ イオン添加により活性が 2 倍になることも確認された。*K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株の β -ガラクトシダーゼは Mg^{2+} , Mn^{2+} の影響をあまり受けなかった。しかしながら Ca^{2+} を添加した際に 4 倍の活性上昇が認められ、さらに H_3PO_4 添加で活性に影響がないことが確認された。乳製品製造時に大量に排出されるホエーには、乳糖が多く含まれるが、同時にカルシウムやリン酸が含まれ⁶⁾、これが β -ガラクトシダーゼを利用したホエー活用の妨げになっている。*K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株の β -ガラクトシダーゼはカルシウムやリン酸の影響を受けず、ホエー中の乳糖に作用し得る可能性があると思われる。今回粗酵素を用いた研究結果から、両株の β -ガラクトシダーゼはこれまで報告のなかったユニークな特徴を持つことがわかった。今後さらに酵素を精製し、これら至適 pH あるいは金属イオンによる影響の違いを、反応速度論的手法などを用いて詳しく調べる必要があると思われる。またホエーのような乳糖が含まれる食材、食品への応用に関する研究も合わせて必要であると考えられる。

要 約

乳糖発酵性の高い酵母 2 株 (*Kluyveromyces marxianus* IFO 0541, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* 1-2) について β -ガラクトシダーゼ生産力を比較するとともに両株から調製した β -ガラクトシダーゼの性質について調べた。*K. marxianus* var. *lactis* 1-2 に比べ *K. marxianus* IFO 0541 は高い β -ガラクトシダーゼ活性を示した。酵素 (菌体内抽出液) の至適 pH は 1-2 株が 6.0, 0541 株が 8.0 付近であった。金属イオンの影響を調べたところ 0541 株の酵素は Mg^{2+} , Mn^{2+} により大きく活性化され、 Ca^{2+} に阻害された。一方 1-2 株は Ca^{2+} により活性化され、 Mg^{2+} , Mn^{2+} による影響をあまり受けなかった。*K. marxianus* var. *lactis* 1-2 株の β -ガラ

クトシダーゼは Ca^{2+} により活性化されるユニークな性質を持ち合わせており、食品工業への応用が可能かもしれない。

文 献

- 1) Beutler, H. O., 1984. Lactose and D-galactose, In Methods of Enzymatic Analysis. (H. U. Bergmeyer, ed.), pp. 104-112. Weinheim: Verlag Chemie.
- 2) Biermann, L., and M.D. Glantz, 1968. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. Biochim. Biophys. Acta., **167**: 373-377.
- 3) Itoh, T., M. Suzuki and S. Adachi, 1982. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. Agric. Biol. Chem., **46**: 899-904.
- 4) 菊池俊彦, 1983. 乳製品と酵素, 食品工業と酵素. (一島英治・編) pp. 134-154. 朝倉書店.
- 5) Kim, S. H., K.P. Lim and H.S. Kim, 1997. Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. J. Dairy Sci., **80**: 2264-2269.
- 6) 桑田 有, 1980. ホエー成分の分離と利用. 酪農科学・食品の研究, **29**: A-1-9.
- 7) Mahoney, R. R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker. 1975. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci., **58**: 1620-1629.
- 8) 戸羽隆宏, 1985. β -ガラクトシダーゼ. 酪農科学・食品の研究, **34**: A-170-182.
- 9) Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada, 1972. Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. Agric. Biol. Chem., **36**: 570-577.
- 10) Wallenfels, K., and O.P. Malhotra, 1962. β -Galactosidase, the Enzyme. pp. 409-431. New York: Academic Press.

Summary

Two strains of lactose-fermenting yeast, namely *Kluyveromyces marxianus* IFO 0541 and *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* 1-2, were evaluated on their producibility of β -galactosidase. The β -galactosidase activity was higher in the extract of *K. marxianus* IFO 0541. Optimum pH of the two crude enzymes was found to be 6.0 for *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 and 7.5 for *K. marxianus* IFO 0541. The crude enzyme from

K. marxianus IFO 0541 was activated largely by Mg^{2+} and Mn^{2+} and inhibited by Ca^{2+} . Conversely, the crude enzyme from *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 was strongly activated by Ca^{2+} and minimally activated by Mg^{2+} and Mn^{2+} . These results suggest that *K. marxianus* var. *lactis* 1-2 is a potential source of β -galactosidase for possible use in the food industry.