

学位論文題名

糸状菌 *Scopulariopsis brevicaulis* による
フラクトオリゴ糖の生産

学位論文内容の要旨

この四半世紀の間に種々な糖、特にオリゴ糖の生産が開発され、その利用と用途は拡大している。先ず異性化糖(フラクトースシロップ)で、これはグルコースの約半分がフラクトースに変換された混合物で、甘味料として砂糖と拮抗する物質にまで進展した。

その後、低う蝕性及び抗う蝕性、低カロリー性及びノンカロリー性とともに整腸作用、機能性をもつ甘味料として、マルトオリゴ糖、シクロデキストリン、カップリングシュガー、フラクトオリゴ糖、パラチノース、ガラクトオリゴ糖、ラクトシュークロース、キシロオリゴ糖、エリスリトールの開発が行われ、現在いずれも微生物を利用して工業生産されている。

砂糖(ショ糖)は人類の消費する甘味料の中で昔から常用されてきた最も重要な物質であるが、最近ではその利用は横這いか減少の傾向がある。わが国では砂糖の使用量の35%はビートから生産している。

本研究では、ショ糖の現状と酵素利用技術の現状に鑑み、ショ糖から付加価値の高いオリゴ糖生産を行うという目的から、糸状菌を検索した。その結果、*Scopulariopsis brevicaulis* を見出し、この菌を用いて整腸作用を有する1-kestoseの発酵法による生産と、その工業的規模における発酵生産、精製(結晶化)に成功した。さらに同菌が、虫歯予防オリゴ糖として期待されるフラクトシルキシロシドを生産することをみつけ、その工業的生産、分離精製、結晶化にも成功した。また*S. brevicaulis* におけるオリゴ糖生産に関わる酵素、 β -フラクトフラノシダーゼを抽出、精製し、その性質も検討した。さらにこれらのフラクトオリゴ糖の利用についても検索した。本博士論文の構成とその概要は以下の通りである。

第1章では、本論文で原料として用いられているショ糖の利用の現状、特に日本における消費動向を述べ、過去15年間で工業生産されるようになった各種オリゴ糖の効能と生産についてまとめ、本研究の背景と目的につき論述した。

第2章では、ショ糖を原料として機能性オリゴ糖を生産する微生物の検索を行い、その結果見いだされた糸状菌による、1-kestoseの発酵生産法とその精製法について述べた。まずオリゴ糖生産菌を253株の糸状菌から分離し、その中でもN-01株が、フラクトオリゴ糖の内の三糖類を生産することを見つけた。このオリゴ糖を1-kestoseであると同定し、その生産菌を *Scopulariopsis brevicaulis* であると同定した。

さらに発酵法による1-kestrosの生産条件の検討を行い、ショ糖150 g/l の条件下で、72 時間培養を行うことにより、95.6 g/l の1-kestrosの生産結果を得た。これは1-kestrosの生成率が対ショ糖収率として 64%、理論収率 として85%に達していることを示していた。また培養上澄からの1-kestrosの精製法として酸化カルシウム添加による清浄処理、イオン交換樹脂による脱塩により、純度90%の1-kestros溶液を得た。これを85%(w/w) まで濃縮し、種結晶を添加して1-kestrosを結晶化し、総収率73%で純度98%の結晶を得ることに成功した。

第3章では、*S. brevicaulis* がショ糖以外の糖類の存在下で、1-kestros以外のオリゴ糖を生産する可能性につき検討した結果、ショ糖にキシロースを共存させることで、フラクトシルキシロシドとジフラクトシルキシロシドが生産された。同定したフラクトシルキシロシドの存在は知られていたが、ジフラクトシルキシロシドは新規な糖であった。この菌を用いるフラクトシルキシロシドの生産の最適条件を検討した結果、100 g/l のショ糖、80 g/l のキシロース、35 g/lのコーンステープリカーを含む培養液を用い、pH 7.0、30℃で 3 日間 の培養条件で、45.1 g/l のフラクトシルキシロシドと6.9 g/l のジフラクトシルキシロシドを生産した。更にこの培養生産されたフラクトシルキシロシドを、培養上澄からイオン交換樹脂（三菱CK08P）を用いるクロマト分離により分画し、種結晶を用いるフラクトシルキシロシドの結晶化法を検討した。その結果、総回収率 94%で、純度 99.8 %の結晶を得ることに成功した。

第4章では、以上の研究に使用された*S. brevicaulis* より、そのオリゴ糖生産酵素(β -フラクトフラノシダーゼ)を抽出精製し、酵素の性質を検討した。培養菌体を破碎後、遠心分離、硫酸塩析により粗酵素を得た。ブチルトヨパール650M 疎水カラム、DEAE-セファデックス A-50 イオン交換カラム、トーヨパール HW-55F ゲルろ過、そしてヒドロキシアパタイト吸着カラムによるクロマトグラフィー精製で、本酵素はSDS-PAGEで単一のバンドを示すまでに精製された。精製結果は、比活性 124 unit/mg で粗酵素から1,100 倍精製され、活性収率は 4.6%であった。

この酵素の反応速度定数を決定した。ショ糖からの1-kestros生成では $K_m=0.82$ M、 $V_m=1.71$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ 、1-kestrosからのニストース生成では $K_m=4.6$ M、 $V_m=10.85$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ であった。またニストース生成で0.4 Mのショ糖が存在すると1-kestros 0.25 M以下では殆ど生成されず、1-kestros 0.33 Mでも著しく阻害された。この酵素は低濃度のショ糖を加水分解するが、0.1 M以上のショ糖では阻害された。グルコースは1-kestros生成反応を拮抗的($K_i=0.33$ M) に阻害した。

ショ糖とキシロースからのフラクトシルキシロシド生成で、ショ糖存在下でのキシロースの増加で反応は促進されるが、ショ糖の増加では抑制された。フラクトシルキシロシドの生成速度は両基質の存在では1-kestrosの生成速度の2~70倍であった。

この微生物がショ糖からニストースをほとんど生産しないで専ら1-kestrosを生産すること、及びショ糖とキシロースからフラクトシルキシロシドの生産を1-kestros生産よりも優先することがこれらの反応速度定数の決定の実験から確認された。

第5章では、1-kestros、フラクトシルキシロシドを食品として利用する場合の特性を調査し、これらのオリゴ糖の課題について述べた。1-kestrosについてはほぼショ糖と同様の使用方法が可能であることを確認したが、キシロースが混在するキシロ

シルフラクトシドについては加熱による着色度が大きく、それにともない苦味が生じた。しかしクッキーに使用した時には好ましいソフト感が出た。また、フラクトシルキシロシドのラットによる長期投与試験を実施し、1日当たりの摂取量として、日本人の一日平均ショ糖使用量の5倍である4.5 g/kg まで安全性に問題がないことが確認された。

第6章では、以上の結果を総括し、今後の展望について論述した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 晋 一
副 査 教 授 高 井 光 男
副 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 助 教 授 大 井 俊 彦

学 位 論 文 題 名

糸状菌 *Scopulariopsis brevicaulis* による フラクトオリゴ糖の生産

近年、ショ糖以外の甘味料の開発、また甘味性以外の抗う蝕性及び低う蝕性、低カロリー性及びノンカロリー性とともに整腸作用等の機能性をもつオリゴ糖（マルトオリゴ糖、シクロデキストリン、カップリングシュガー、フラクトオリゴ糖、バラチノース、ガラクトオリゴ糖、ラクトシュクロース、キシロオリゴ糖、エリトリトール）の開発、並びに発酵法による工業生産が行なわれてきた。わが国ではショ糖の利用が漸減の傾向にあり、その価格上昇も期待できない。

本論文はこのような現況から、ショ糖の有効利用を考えて微生物による機能性フラクトオリゴ糖の生産と用途開発を目標としてなされた研究をまとめたもので、その内容は以下のように要約される。

ショ糖を原料としてフラクトオリゴ糖を生産する微生物の検索を行ない、オリゴ糖生産菌として253株の糸状菌を分離し、その中でもN0-1株（後に *Scopulariopsis brevicaulis* と同定）が主として三糖類（後に1-kestoseと同定）を生産することを見いだした。発酵法による1-kestoseの生産条件を検討し、150 g/lのショ糖、15 g/lの酵母エキス及び無機塩からなる培地でpH 7.0、30℃で72時間、通気培養し、95.6 g/lの1-kestoseを生産した。これは1-kestoseの対糖収率は64%で理論収率は85%に相当する。培養上清からの1-kestoseの精製は酸化カルシウム添加による清浄化、イオン交換樹脂カラムによる脱塩で純度90%の1-kestose溶液を得、これを濃縮後、種結晶を添加して結晶化し、収率73%で純度98%の1-kestoseの結晶を得た。再結晶により収率78%で純度99.8%の結晶を得た。これらの生産と精製プロセスは工業的な規模にまでスケールアップできた。

S. brevicaulis がショ糖以外の他の糖類の存在下で他のフラクトオリゴ糖を生産性を調べ、キシロースの共存でオリゴ糖（後にフラクトシルキシロシドとジフラクトシルキシロシドと同定）を多量に生産することを見いだした。前者は抗う蝕性をもつ糖として既知であるが、後者は新規な糖であった。フラクトシルキシロシドの発酵生産条件を検討し、80 g/lのキシロース、80 g/lのショ糖、35 g/lの

コーンステープリカーを含む培地でpH 7.0、30℃、3日間の通気培養で45.1 g/lのフラクトシルキシロシドと6.9 g/lジフラクトシルキシロシドを生産した。この培養液から清浄化と脱塩を行なった後、イオン交換樹脂（CK08P、三菱化成）カラムクロマトグラフィーによりフラクトシルキシロシドを分画し、濃縮後、種結晶を加えて結晶化した。結晶化の収率は94%で純度は99.8%であった。これらの生産と精製プロセスは工業的な規模までスケールアップできた。しかし、キシロースの完全な利用が期待されないので、精製プロセスではキシロースの変性ではなくて、回収が必要なことを指摘した。

フラクトオリゴ糖の生産でキーとなる酵素、 β -フラクトフラノシダーゼを*S. brevicaulis*の細胞を破碎して、抽出し、硫酸アンモニウムによる分画、ブチルトヨパール650M、DEAE-セファデックス A-50、トヨパールHW-55F、ヒドロキシアパタイトを用いるカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に均一にまで精製した。

精製酵素の比活性は124 unit/mgで粗酵素から1,100倍精製され、活性回収率は4.6%であった。この酵素の最適pHは6~9と広く、最適温度は40℃であった。

この酵素の種々な糖に対する反応速度定数を決定した。ショ糖からの1-kestose精製の K_m と V_m はそれぞれ0.82 Mと1.71 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{ml}$ で、1-kestoseからのニストース生成ではそれぞれは4.6 Mと0.85 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{ml}$ である。ニストース生成は0.4 Mのショ糖が存在すると0.25 Mの1-kestoseが存在しても殆ど生成されず、0.33 Mの1-kestose存在下でわずかに生成されただけであった。このことはこの酵素によるニストース生産は培養におけるショ糖と1-kestose濃度では非常に抑制されることを示唆し、この菌が主として1-kestoseを生産することをよく説明している。この酵素は低濃度のショ糖は加水分解するが、0.1 M以上では加水分解は著しく阻害される。培養中には高濃度のショ糖が存在するので、ショ糖の分解は問題ない。この酵素による1-kestose生産はグルコースにより拮抗的に阻害される ($K_i=0.33\text{M}$) が、実際の培養では遊離されたグルコースは細胞の生産に利用されるため培地中には蓄積しないので、1-kestose生産には殆ど影響しない。

ショ糖とキシロース存在下でのフラクトシルキシロシドと1-kestoseの生成はショ糖が増加するとフラクトシルキシロシドの生成を抑え、1-kestoseの生成を促進し、キシロースが増加するとフラクトシルキシロシドの生成を促進し、1-kestoseの生成を抑えた。しかし、フラクトシルキシロシドの生成速度は1-kestoseの生成速度よりも2~70倍高かった。このことは十分量のキシロースが存在すれば、フラクトシルキシロシドは優先的に生産することを説明している。

1-kestoseとフラクトシルキシロシドを食品として利用する場合の特性を調べ、前者は低う蝕性作用、後者は抗う蝕性作用があり、両方の糖とも整腸作用があることを確認した。1-kestoseはショ糖とほぼ同じような使用が可能であること、フラクトシルキシロシドは長期投与の動物実験から安全性を確認し、クッキー等の香を出すのに有効であることを認めた。

これを要約すると、著者はショ糖からの1-kestose及びフラクトシルキシロ

シドの生産方法を確立したもので、ショ糖の有効利用に新知見を得たものであり、生物工学の進展に対して貢献するところが大なるものがある。

よって著者は北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。