

食品産業に応用可能な新規低温性乳糖分解酵素の探索と開発

中川 智行 [東京農業大学生物産業学部食品科学科／講師]

背景・目的

ほとんどの成人日本人は乳糖を処理する能力が低い「乳糖不耐性」であるが、乳中の乳糖を事前に分解することで乳糖不耐症でも牛乳を安心して飲むことができる。また、チーズ加工中に生産される食品廃棄物の一つである乳清はそれに含まれる乳糖を新たな発酵原料として利用可能であり、乳清を産業廃棄物から再資源化できるものと考えている。

一方、牛乳、乳製品および乳清は常温で非常に劣化しやすいため、その加工は低温で迅速に行なうことが好ましい。つまり、上記の乳加工において低温条件下で機能する乳糖分解酵素は大きなメリットを持ち、これら酵素が北海道の乳産業に大きな利益を与えるものと考えている。

そこで、本研究では、牛乳、乳製品および乳清中の乳糖を低温下で充分に分解可能な新規低温性乳糖分解酵素の開発を目指した。

内容・方法

我々は低温下(5°C)で乳糖を唯一の炭素源として生育可能な*Arthrobacter psychrolactophilus* F2株を単離した(1)。F2株は0°Cにおいても十分な乳糖分解酵素活性を保持しており、本酵素が新規な低温性酵素である可能性を持っていた。

(1) Nakagawa, T. et al. 2003. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 154-157

① F2株由来低温性乳糖分解酵素の精製

乳糖を唯一の炭素源として生育させたF2株の菌体内粗酵素画分を、40%飽和硫酸沈澱、DE52、Butyl-TOYOPEARL 650SおよびTOYOPEARL HW-75Fゲル濾過クロマトグラフィーに供すことによりSDS-PAGEにて電気泳動的に单一な精製酵素を得た。

② F2株由来低温性乳糖分解酵素の一次構造の解析

精製酵素のN末端アミノ酸配列および他種由来乳糖分解酵素にて高い相同性を示す部位にてプライマーを設計し、F2株ゲノムを鋳型にPCRを行った。得られた乳糖分解酵素部分遺伝子の情報をもとにカセットPCR法にて全長遺伝子を獲得した。

結果・成果

① F2株由来低温性乳糖分解酵素の諸性質

A. psychrolactophilus F2株の菌体内画分から低温性乳糖分解酵素を精製した。本酵素は130kDaのサブユニットからなる4量体酵素であった。本酵素は10°Cに最大活性が

認められ、かつ0°Cにおいてもその80%以上の活性を有することから、低温性酵素であるものと判断した。また、本酵素のONPGおよびラクトースに対する親和性(K_m)は10°Cにおいて、それぞれ2.8mMおよび50mMであった。一方、本酵素はpH7.0-10.0の広い範囲で安定であるものの、45°C-10分、50°Cにおいては5分以内の処理で完全に失活した。食品への酵素製剤を添加する際、酵素反応後、速やかに添加酵素を失活させる必要があり、F2株由来低温性乳糖分解酵素は低温殺菌条件でも十分失活させることができるとおいても食品産業への応用が期待できる。

② F2株由来低温性乳糖分解酵素の一次構造の解析

A. psychrolactophilus F2株由来低温性乳糖分解酵素の精製タンパク質のN末端アミノ酸配列の情報をもとに、本酵素をコードする遺伝子**bgla**をF2株のゲノムDNAより獲得した。*Bgla*は3,084bpからなるORFを持ち、1,028アミノ酸残基をコードしていた。*Bgla*は、(1)F2株由来乳糖分解酵素のN末端アミノ酸配列を有すること、(2)推定分子量が精製酵素と一致すること(111kDa)などから、F2株の乳糖分解酵素をコードする遺伝子であることが示唆された。*Bgla*の遺伝子産物であるBglApは*Arthrobacter* sp.strain B7株^{isozyme 15}と77.5%、*Arthrobacter* sp. C2-2株由来酵素と79%、*Arthrobacter* SB株由来酵素とは62.5%の高い相同意を示し、アミノ酸配列の前半にGlycosyl Hydrolase Family 2(GH2)に関連したモチーフが、後半にはGH42に関連したモチーフが保持されており、GH2とGH42のキメラ構造をとっていると考えられた。また、ゲノムサザン解析により、*bgla*はF2株における唯一の乳糖分解酵素遺伝子であることが明らかになり、本株がアイソザイムを持たないという結果と一致した。

③ F2株由来低温性乳糖分解酵素の生乳中の乳糖分解能

A. psychrolactophilus F2株由来乳糖分解酵素の応用を目指して、部分精製酵素を用いて生乳中のラクトース分解を試みた。生乳1mlに対して1Unitの酵素を添加し、10°Cにて酵素処理を実施した結果、乳中のラクトースを24時間で20%まで低下させることができた。この結果は、本酵素が食品加工へ適用できる可能性を有することを示している。

今後の展望

本研究にて、牛乳、乳製品および乳清中の乳糖を低温下(10°C)で充分に分解可能な新規低温性乳糖分解酵素を*A. psychrolactophilus* F2株の菌体内画分に見出し、その酵素化学的諸性質およびその一次構造を明らかにした。本酵素は低温で充分な活性を示すのみならず、中温域での失活が可能であり、さらには1Unitの本酵素にて生乳1ml中のラクトースを10°C-24時間で20%まで低下させる能力を有していた。これらの性質からF2株由来低温性乳糖分解酵素は将来的に食品産業に応用できる可能性を秘めているものと考えている。