

## 寒冷地植物の貯蔵多糖類から機能性オリゴ糖製造に関する研究 (第 1 報)

—DEAE トヨパール 650M を用いたエンド型イヌリナーゼの  
固定化と固定化酵素の諸性質の検討—

本堂 正明, 清水 條資, 塩見 徳夫\*

Preparation of functional Oligosaccharides from Inulinin Chikory Roots (PartI)  
—Immobilization of endo — type Inulinase with Toyoppearl 650 M gel and  
Characterization of Immobilized enzyme—

Masaaki HONDO, Jyohsuke SHIMIZU, Norio SHIOMI\*

## 抄 録

pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液下で, DEAE トヨパール 650M ゲル (乾燥粉末ゲル 2.5g) を用いて精製エンド型イヌリナーゼ (酵素蛋白量 2.55mg) を固定化した。本酵素は完全に担体に吸着され, 上澄液中に活性は認められなかった。native 酵素の活性は 20.4U であったが, 保持活性は 5.6U と約 26% の活性が保持された。固定化酵素の脱離 pH は 3 付近以下, 脱離酢酸緩衝液濃度は約 25mM 以上であった。至適 pH は pH5.0 付近で, native 精製酵素の至適 pH と一致した。至適温度は 40℃ 付近であった。pH 安定性は pH が 4 ~ 6 ぐらいで安定であった。保存安定性は 4℃ では, 約 1 カ月で活性がほぼ 1/4 に低下した。ゲルろ過・オリゴ糖分離用カラムを用いた HPLC 分析から, イヌリン分解物の溶出ピークは明らかに 6 個存在した。溶出順にピーク 1, 2, 3, 4, 5, 6 がそれぞれ 6, 5, 4, 3, 2, 単糖に相当すると考えらるが, 単糖, 2 糖は極微量で, 主要生成糖は 3, 4, 5, 6 糖であった。

## 1. 緒 言

チコリはキクイモやダリアと同様のキク科植物で, ショ糖型で結合したグルコースを末端にもち, そのフラクトース側に, フラクトースが  $\beta$ -2, 1 結合で 30 数個直鎖状に重合した貯蔵多糖類イヌリンを根部に多量に蓄積する。原産地は比較的寒冷地のヨーロッパで, 気候の類似した北海道の適性植物と考えられるため, チコリイヌリンの用途拡大や新規用途が開発されれば, 有望栽培作物となる可能性もある。これまでキクイモなどのイヌリンはフラクトース<sup>1) 2) 3) 4)</sup> やエタノール<sup>5) 6) 7)</sup> 製造用の原

料として考えられてきたが, 最近イヌリンの部分加水分解物であるイヌロオリゴ糖が難消化性食物繊維様の生理作用を有することが判明し<sup>8)</sup>, 新規甘味料素材として注目されている。従ってチコリイヌリンからイヌロオリゴ糖製造法が工業的に開発されれば, チコリイヌリンの低コスト化とイヌロオリゴ糖の食品素材としての利用の可能性が広がると考えられる。

これまでに微生物起源の酵素エンド型イヌリナーゼを用いたイヌロオリゴ糖調製法について幾つかの報告<sup>9) 10) 11) 12)</sup> が発表されており, またペニシリウム属菌起源のエンド型イヌリナーゼに関する一連の報告が小野寺と塩見<sup>13) 14) 15)</sup> によって明かにされている。更に小野寺らが,  $\kappa$ -カラゲニンによる同精製酵素の固定化<sup>16)</sup> を行い, 固

\* 酪農学園大 (Rakunou Gakuen University)

定化酵素を用いたイヌロオリゴ糖の調製法を検討している。

本研究は固定化酵素を充填したカラムリアクタ法で連続的にチコリイヌリンよりイヌロオリゴ糖を製造する基礎的技術を確認するため、引き続き新たな固定化担体として DEAE-トヨパール 650M ゲルを用いるイオン吸着法で同酵素を固定化し、バッチ式で固定化酵素の諸性質の検討を行った結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬

固定化担体は TOSOH 製の DEAE-トヨパール 650 M ゲルを用い、蒸留水で 2, 3 度デカンテーションを行い、ゲルを吸引ろ過しながら十分水洗後、乾燥し粉末 DEAE-トヨパール 650M を調製して使用した。

チコリイヌリンはシグマ製を用いた。その他の必要試薬は市販試薬特級を用いた。

### 2.2 供試酵素標品

高イヌリナーゼ活性菌株であるペニシリウム属菌を供試菌に用いた。振とう培養後、カラムクロマトグラフィ操作で分離・精製した<sup>16) 17)</sup> 酪農学園大学調製の精製エンド型イヌリナーゼを固定化酵素標品に用いた。本精製酵素を硫酸塩析沈殿し、供試するまで 4℃ で保存した。

### 2.3 高速液体クロマトグラフィ

TOSOH 製の高速液体クロマトグラフシステム (CCP&8010 シリーズ) を用いて、イヌリン分解物の溶出パターンを分析した。移動相溶媒として蒸留水、固定相カラム担体として、TOSOH 製の TSK gel G-oligo-PW (7.8mmID×30cm) を用いた。オリゴ糖などの分離に適した高速ゲルろ過クロマトグラフィ用担体で、これを 2 本連結し、先頭部に専用ガードカラム (6.0 mmID×4.0cm) を着けて使用した。流速は 1ml/min、カラム温度は 50℃、圧力 43kgf/cm<sup>2</sup> の条件で行った。標準糖として、単糖はフラクトース、2 糖はシュークロース、3 糖はラフィノースを用いた。

### 2.4 固定化エンド型イヌリナーゼの調製

硫酸塩析沈殿中の精製酵素を pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液で溶解後、同緩衝液中で、4℃、一日間透析し硫酸

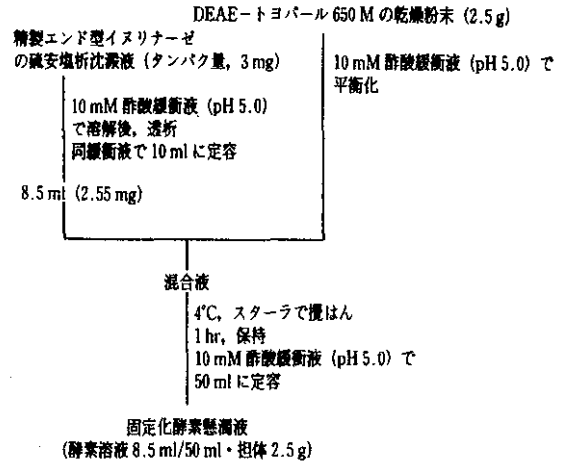


図1 エンド型イヌリナーゼの固定化

を除去した。最終的に同緩衝液 10ml で定容した。精製酵素液のうちの 8.5ml (酵素量として 2.55mg) を使用して、図 1 の要領で固定化した。すなわち、DEAE-トヨパール 650M ゲルの固定化担体乾燥粉末 2.5g に、同緩衝液約 30ml を加えた後、4℃ 下で、スターラで攪はんしながら、精製酵素液 8.5ml を添加した。一昼夜静置後、最終的に同緩衝液を加えて 50ml に定容し、5% DEAE-トヨパール 650M ゲル (w/v) の懸濁液とした。供試固定化酵素試料は 4℃ の冷蔵庫に保存した。

### 2.5 固定化エンド型イヌリナーゼの諸性質の検討

#### 2.5.1 イヌリナーゼ活性

37℃ に設定した振とう恒温水槽 (Eyela Bath5B-24, Eylashaker SS-8, 東京理化工器製) 中のラックに遠心分離用チューブ (10ml 容, キャップ付き) (以下チューブと略記) を入れ、固定化酵素懸濁液 0.7ml と 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) 0.7ml を添加して、30 分間、振とうしながら、酵素反応を行わせた。酵素反応終了後、速やかに、冷却高速遠心分離機 (KUBOTA KR-20000T 製) で遠心分離 (5000rpm, 5 分間) を行い、得られた上澄液を検液として、酵素反応によって生じる遊離の還元力をソモギー・ネルソン法<sup>18) 19)</sup> で測定した。酵素活性の単位は 37℃, 30 分間の酵素反応で、固定化酵素懸濁液 1ml 当り、1 分間に 1μ モルのフラクトースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1U とした。

## 2.5.2 一般的諸性質の検討

### 1) 固定化酵素の脱離に及ぼす pH と酢酸緩衝液濃度の影響

0.7ml の固定化酵素懸濁液と pH の検討の場合は 6.3ml の各 pH (2 ~ 12) に調整した 10mM 緩衝液 (所定の pH に応じて酢酸, リン酸, ホウ砂緩衝液を使用) を, 酢酸緩衝液濃度の検討の場合には 6.3ml の pH5.0 の各濃度 (5 ~ 100mM) に調整した酢酸緩衝液をチューブに添加した。また同時に 0.7ml の固定化酵素懸濁液と 6.3ml の 0.1M ー塩化ナトリウム溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) をチューブに添加し, これを固定化酵素が完全に脱離する脱離酵素活性の基準となる検液として用いた。4℃, 2 時間保持後, 遠心分離して上澄液を得, pH 試験の場合には, 上澄液の 5ml を採取し, 0.1N ー塩酸溶液 (または 0.1N ー水酸化ナトリウム溶液) で pH5.0 に調整後, 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加えて 6ml に定容した。塩濃度試験と脱離酵素のスタンダードの場合には直接上澄液を検液とした。脱離酵素検液を 0.5ml, 基質として 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10 mM 酢酸緩衝液) を 0.5ml 使用して, 各 pH と各塩濃度における脱離イヌリナーゼ活性を測定した。

### 2) 至適 pH と至適温度

至適 pH の検討の場合には, 固定化酵素懸濁液の pH が 5.0 であるため, これを 0.7ml と 3 ~ 10 の pH に調整した 10mM 緩衝液 (所定の pH に応じて酢酸, リン酸, ホウ砂緩衝液を使用) 6.3ml をチューブに添加し, 固定化酵素懸濁液の pH を調節した。pH を pH メータで測定後, チューブにあらかじめ印してある 0.7ml の標線のところまで上澄液を除去後, 恒温水槽中にセットして, 上記の同一の 10mM 緩衝液を用いて所定 pH に調整した 2% イヌリン溶液を 0.7ml 添加して, 各 pH におけるイヌリナーゼ活性を測定した。

至適温度の検討の場合には, 所定の温度 (30 ~ 60℃) に設定した恒温水槽のラックにチューブをセット後, 固定化酵素懸濁液 0.7ml と 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10 mM 酢酸緩衝液) 0.7ml を添加し, 各温度におけるイヌリナーゼ活性を測定した。

### 3) 熱安定性

所定の温度 (40, 45, 50℃) に設定した恒温水槽のラックにチューブを入れ, 0.7ml の固定化酵素懸濁液を添加して, それぞれ 10 ~ 60 分間保持した。急冷後, 再度, 同チューブを 37℃ に設定してある恒温水槽のラックに入

れ 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) 0.7 ml を添加して, 各種条件下加熱後の固定化酵素の残存イヌリナーゼ活性を測定した。

### 4) pH 安定性と保存安定性

pH 安定性の場合には, pH による脱離の検討の場合と同様の操作を行い, pH 調整 (pH4 ~ 12) のチューブを 4℃, 24 時間保持した。チューブにあらかじめ印してある 0.7ml の標線のところまで上澄液を除去後, 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を 6.3ml 添加し, pH を 5.0 に再調節した。遠心分離後, 再度上澄液を標線まで除去し, pH5.0 調整固定化酵素懸濁液 0.7ml を調製した。これを 37℃ に設定した恒温水槽のラックにセットし, 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) を添加して, 各 pH 処理後のイヌリナーゼ活性を測定した。

保存安定性では 4℃ に保存中の懸濁液 0.7ml を経時的に採取して, 37℃ に設定した恒温水槽のラックに入れたチューブに添加し, これに 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) を添加して, 保存中の固定化酵素のイヌリナーゼ活性を測定した。

## 2.5.3 イヌロオリゴ糖の調製と反応時間の影響

37℃ に設定してある恒温水槽中のラックにチューブをはさみ, 固定化酵素懸濁液 0.7ml と 2% イヌリン溶液 (pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液) 0.7ml を添加して, 振とうしながら, 所定の時間 (1 ~ 6 時間) 酵素反応を行わせた。酵素反応終了後, 遠心分離して上澄液を得, これを検液として HPLC 法でイヌロオリゴ糖の生成パターンを分析した。またイヌリン加水分解率は上澄液中の遊離の還元糖量をソモギー・ネルソン法で求め, 添加したイヌリン重量を 100% として算出した。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 エンド型イヌリナーゼの固定化

表 1 にエンド型イヌリナーゼの酵素活性に及ぼす DEAE-トヨパール 650M ゲルの固定化処理の影響を示した。

native 精製酵素液は低温下においても酵素活性の低下があり, 固定化時点での供試酵素液 8.5ml の酵素活性は約 20.4U であった。固定化酵素懸濁液中の上澄液中には活性がなく, pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液濃度下でエンド型イヌリナーゼが完全に同定化されたと考えられ

る。イオン交換体を用いた固定化法は固定化酵素の保持活性が高いと言われているが、保持活性は5.6Uであった。精製固定化酵素を基準にすれば27.5%の活性が保持された。

### 3.2 固定化エンド型イヌリナーゼの諸性質とイヌロオリゴ糖生成パターン

#### 3.2.1 一般的諸性質

##### 1) 脱離に及ぼす pH と酢酸緩衝液濃度の影響

図2に固定化酵素の脱離に及ぼす保持 pH の影響を示

した。固定化法が吸着によるため強固な結合ではない。そのため固定化酵素懸濁液の pH の変動の如何によっては固定化酵素の脱離が考えられる。2~12 付近までの検討では、4 から12 付近までは、酵素の脱離が起こらず上澄液中に酵素活性が認められなかった。しかし3 付近の低 pH 域で酵素の脱離が生じ0.1M の塩化ナトリウム濃度で完全に固定化担体から溶離する固定化酵素の活性を基準にすると、上澄液中には約 20% の活性が認められた。この結果から固定化酵素は極端な pH の変化がない限り、脱離しないと考えられる。

図3に固定化酵素の脱離に及ぼす酢酸緩衝液濃度の影

表1 エンド型イヌリナーゼの酵素活性に及ぼす固定化処理の影響

native エンド型イヌリナーゼ 8.5ml (2.25mg)	DEAE-トヨパール650M による固定化 8.5ml/50ml (10mM 酢酸緩衝液, pH5.0) ・ 2.5g 担体 酵素活性 (U)		
	上澄液 (未固定化)	懸濁液	0.1M-NaCl による懸濁液中の 固定化酵素の溶離
酵素活性 (U)  20.4 (100)	0	5.6 (27.5)	16.9 (82.8)

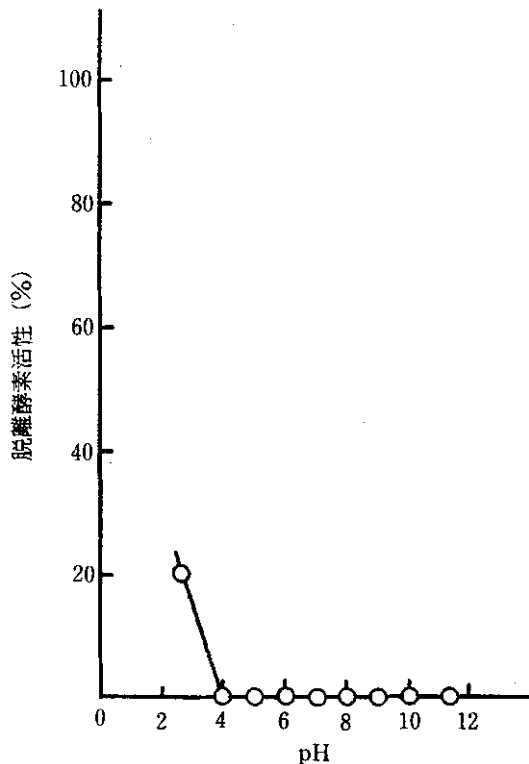


図2 固定化エンド型イヌリナーゼの脱離に及ぼす保持 pH の影響

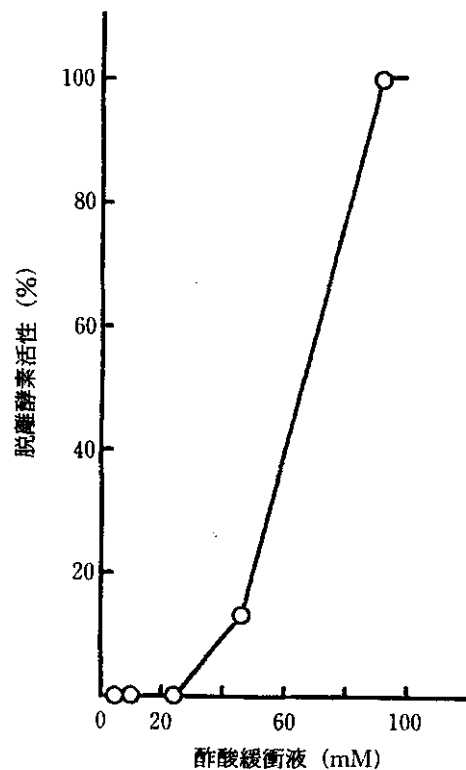


図3 固定化エンド型イヌリナーゼの脱離に及ぼす酢酸緩衝液濃度の影響

響を示した。イオン結合で担体と酵素がアットランダムに結合しているため、イオン強度の影響を著しく受けると考えられる。どの程度の塩濃度まで脱離をしないかの検討を行った結果、20mMではまだ脱離は認められなかった。それ以上の濃度で酵素の脱離が急激に進行し、約90mM濃度で酵素が完全に溶離した。

2) 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響

図4に固定化酵素の至適 pH を示した。その結果、固定化酵素の至適 pH は 5 付近にあり, native 精製エンド型イヌリナーゼの至適 pH とほぼ一致した。固定化により至適 pH のシフトはなかった。酵素活性は 5 を境にして急激に低下し, 4 付近で 50%, 8 付近で完全になくなった。

図 5 に固定化酵素の至適温度を示した。至適温度は 40℃ 付近にあった。比較的高温域での活性は低く, 60℃ の反応温度では 10% と極端に低下した。

3) 固定化酵素の熱安定性

図 6 に固定化酵素の熱安定性を示した。熱安定性は 40℃, 60 分保持で, 約 1/4 に活性が低下し, 本固定化酵素の熱安定性は比較的悪かった。

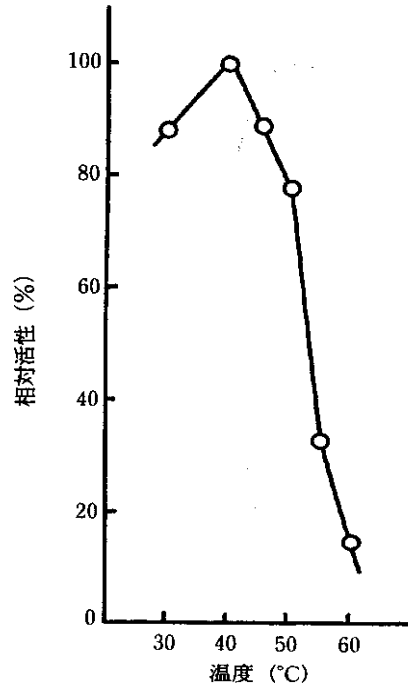


図 5 固定化エンド型イヌリナーゼの至適温度

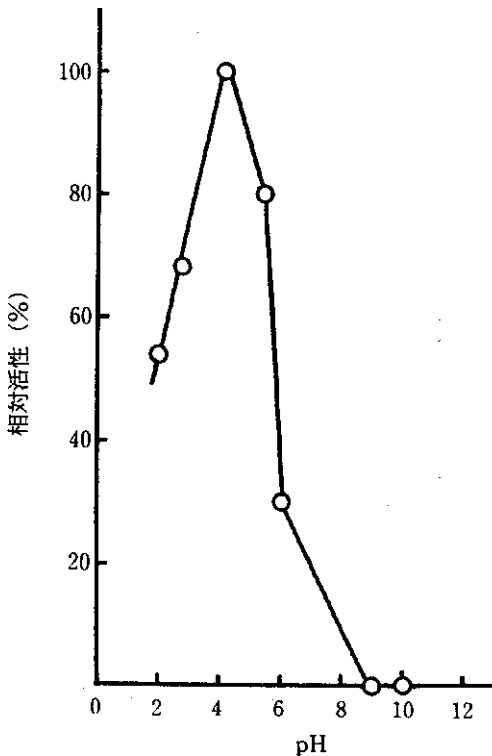


図 4 固定化エンド型イヌリナーゼの至適 pH

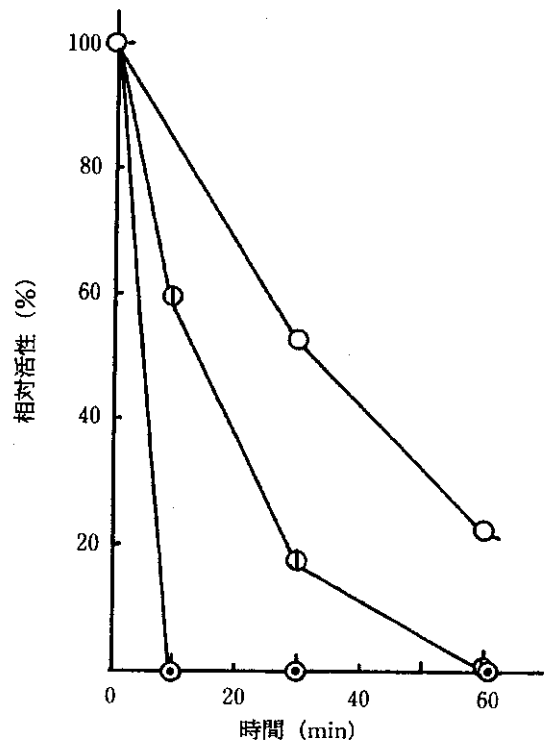


図 6 固定化エンド型イヌリナーゼの熱安定性  
 —○—: 40°C, —①—: 45°C, —●—: 50°C

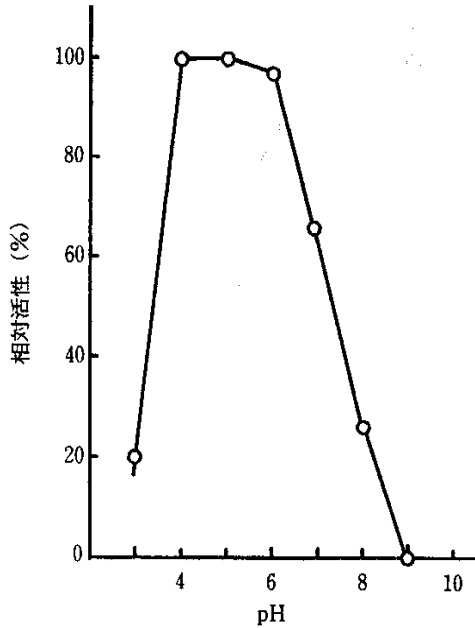


図7 固定化エンド型イヌリナーゼのpH安定性

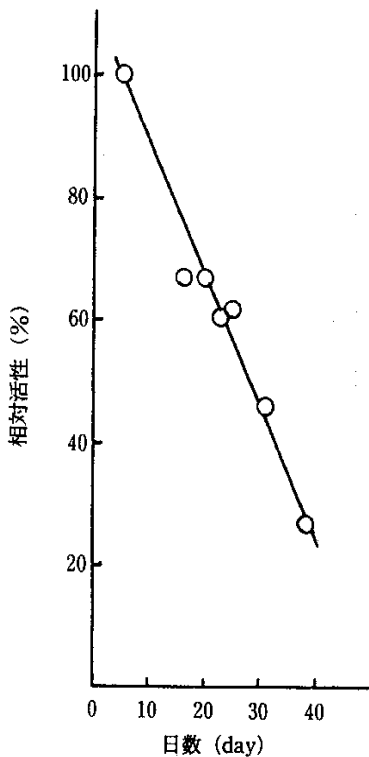


図8 固定化エンド型イヌリナーゼの保存安定性

4) 固定化酵素のpH安定性と保存安定性

図7に固定化酵素のpH安定性を示した。pHが4～6ぐらいの範囲では比較的安定であったが、7前後から固定化酵素の安定性が急激に悪化し、9付近で活性が消失した。

図8に固定化酵素の保存安定性を示した。約1カ月で活性が0.11U/mlから0.03U/mlまで低下した。

3.2.2 イヌリンの加水分解率とイヌロオリゴ糖生成パターン

図9にイヌリン加水分解率に及ぼす反応時間の影響を示した。この段階での調製固定化酵素懸濁液中のイヌリナーゼ活性が約0.05U/mlと非常に低かったため、加水分解率は6時間反応を経過しても約7.4%にとどまった。

図10にHPLC分析結果を示した。反応時間が短かったことと酵素活性が低かったことでイヌリンがかなり残存した。しかし反応時間とともにイヌリンは加水分解を受けて減少し、一方で主に3, 4, 5, 6糖類のイヌロオリゴ糖と思われるピークが認められ、時間とともに増加した。また極微量であるが、1, 2糖類も生成した。

図11に6時間酵素反応後のイヌリン加水分解物の高速液体クロマトグラムを示した。溶出順にピーク1, 2, 3, 4, 5, 6が認められ、それぞれ6, 5, 4, 3, 2, 単糖と考えられた。

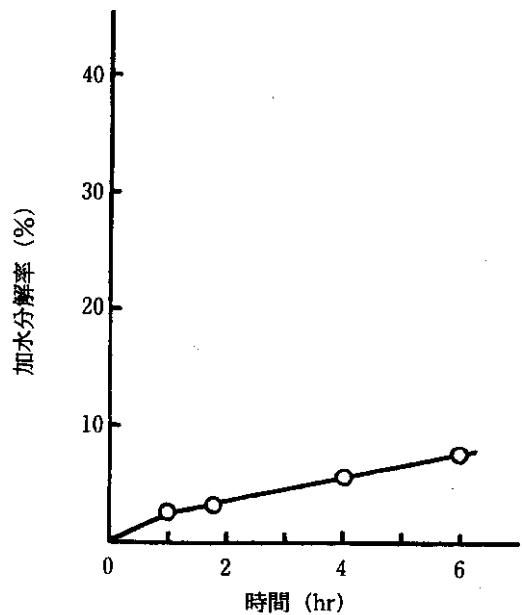


図9 イヌリン加水分解率の時間経過

4. 要 約

チコリイヌリンからイヌロオリゴ糖を固定化エンド型イヌリナーゼを用いて調製するため、DEAE-トヨパール 650Mゲルによる固定化法とカラムリアクタ法で使用するためバッチ式で固定化エンド型イヌリナーゼの諸性質を検討した結果を要約する。

1) 固定化処理と酵素活性

pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液で溶解した精製エンド型イヌリナーゼ溶液 8.5ml (酵素蛋白量 2.55mg) を pH5.0, 10mM 酢酸緩衝液で平衡化した DEAE-トヨパール 650M ゲル(乾燥粉末ゲル 2.5g を使用)懸濁液約 30m 中に添加し, 4℃下, 1 時間スターラで攪はんし固定化した。同緩衝液で 50ml に定容後, これを固定化酵素試料とした。この条件下でエンド型イヌリナーゼは完全に吸着固定化され, 上澄液中には活性が認められなかった。使用した native エンド型イヌリナーゼ活性は 20.4U であったが, 保持活性は 5.6U と約 26% の活性が保持された。

2) 固定化酵素の諸性質とイヌロオリゴ糖生成パターン

固定化酵素の脱離 pH は 3 付近以下であった。脱離酢酸緩衝液濃度は約 25mM 以上であった。至適 pH は pH5.0 付近にあり, native 精製酵素の至適 pH とほぼ一致した。至適温度は 40℃ 付近にあった。固定化酵素の熱安定性は比較的悪く, 40℃, 60 分保持で, 活性は約 25% に低下した。pH 安定性は pH が 4~6 ぐらいの範囲では比較的安定であった。保存安定性は 4℃ では, 約 1 カ月で活性がほぼ 1/4 に低下した。ゲルろ過分離モードでオリゴ糖分離用カラムを用いた HPLC 分析結果から, イヌリン分解物の溶出ピークは明らかに 6 個認められ, 3, 4, 5, 6 糖のオリゴ糖が主要生成糖と考えられた。

本研究は平成 1~2 年度の 2 年間, 酪農学園大学との共同研究で実施して得られた成果の一部をまとめたものである。

5. 引用文献

- 1) M. Kierstan, Process Biochem., 15, 2 (1980)
- 2) L. Zittan, Starch, 33, 373 (1981)
- 3) J. P. Guiraud, P. Galzy, Enzyme Microb. Technol., 3, 305 (1981)
- 4) S. R. Parekh, A. Margaritis, J. Food Sci., 51, 854

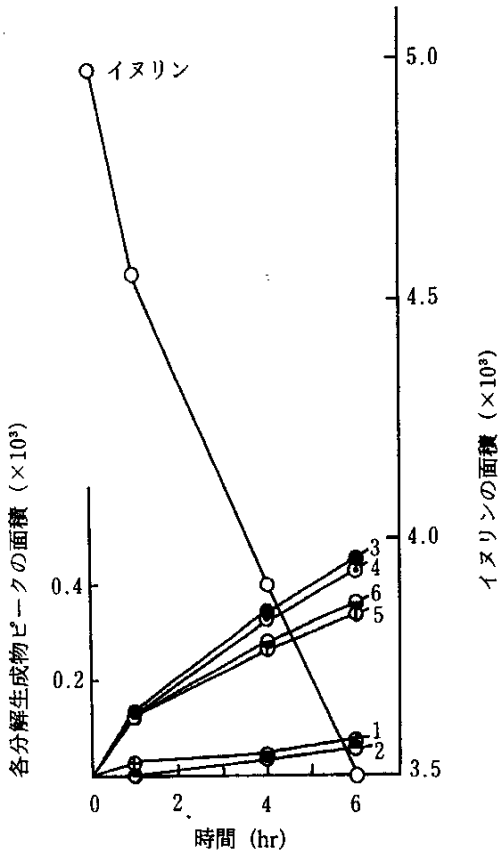


図10 高速液体クロマトグラフィによる加水分解生成物の分析

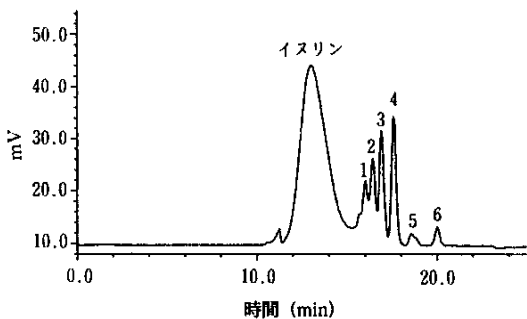


図11 イヌリン加水分解生成物の高速液体クロマトグラム

- (i) 反応時間 6 hr
- (ii) 反応温度 37°C
- (iii) 基質 2%イヌリン 0.7ml
- (iv) 固定化酵素 0.7ml



(1986)

- 5) J. P. Guiraud, J. Daurelles, *Biotechnol. & Bioeng.*, 23, 1461 (1981)
- 6) A. Margaritis, P. Bajpai, M. A. Lachance, 61, 533 (1983)
- 7) J-J .Allais, E. F. Torres, J. Baratti, *Biotechnol. & Bioeng.*, 29, s778 (1987)
- 8) 塩見徳夫, 牧田康志, 小野寺秀一, 桐山修八, 日農化東北・北海道支部昭和 62 年秋期合同学術講演会講演要旨, P.13
- 9) 中村豊彦, 滝沢登志雄, 加茂善弘, 平山匡男, 日高秀昌, 昭和 61 年日農化大会講演要旨集, P.251
- 10) 加茂善弘, 角奈生美, 平山匡男, 柴田利章, 日高秀昌, 農化(昭和 63 年日農化大会講演要旨, P.301), 62, 1988
- 11) 平山匡男, 加茂善弘, 柴田利章, 日高秀昌, 農化(平成 1 年日農化大会講演要旨, P.51), 63, 1989
- 12) 中村豊彦, 中津誠一郎, 澱粉科学, 35, 121 (1988)
- 13) B. E. Norman, B. H jer-Pederson, アミラーゼシンポジウム, Tokyo, Japan, 1988
- 14) 小野寺秀一, 塩見徳夫, 日農化北海道支部昭和 61 年秋期合同学術講演会及びシンポジウム講演要旨, P.4
- 15) 小野寺秀一, 塩見徳夫, 農化, 62, 532 (1988)
- 16) S.Onodera, N. Shiomi, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2569 (1988)
- 17) 小野寺秀一, 塩見徳夫, 酪農学園大学紀要, 14, 17 (1989)
- 18) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)
- 19) N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)