

未利用多糖イヌリンの有用物質への変換

(研究課題番号：08660401)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者：太田一良
(宮崎大学農学部助教授)

は し が き

イヌリンは、 β -2,1結合によるD-フルクトースの重合度30~40の直鎖状ポリマーで、還元末端にグルコース1分子がスクロース型の結合をしている。天然には、チコリの根茎やダリア、キクイモなどの塊茎に貯蔵性多糖として存在し、それらの乾燥重量の約80%を占めている。特にキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) は、気候に対する適応性が極めて大であり、寒冷な地方にも適し、また病害に対しても強い。そのため、至る所に栽培できる未利用生物資源である。微生物由来のイヌリン分解酵素イヌリナーゼは、通常誘導的に産生されるエキソ型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.80) であり、イヌリン分子の非還元末端から順次フルクトース単位で切断する。研究分担者は、初めてはエキソ型とともに、エンド型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.7) を菌体外に構成的に産生する新規な黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株を発見した。以来、エンド型イヌリナーゼの存在は糸状菌 *Chrysosporium pannorum* と *Penicillium purpurogenum* に報告されているのみである。当研究室では、さらに *A. niger* No. 12 株からエンド型イヌリナーゼ活性が増強された変異株 *A. niger* No. 817 株を取得し、イヌリンからの燃料エタノールの発酵生産および低カロリー甘味料としてのフルクトース・シロップの連続生産に応用し、顕著な成績を得た。これらのエンド型イヌリナーゼは、共通してイヌリン内部のフルクトフラノシド結合を切断し、重合度3~5のイヌロオリゴ糖を生成する。近年、イヌリンは、成人病予防のための機能性イヌロオリゴ糖生産の安価な原料として注目を集めている。

これまでの研究成果を踏まえて、本研究では、次の研究成果を得た。

- 1) エンド型イヌリナーゼ高生産変異株 *A. niger* 817 と高いエタノール耐性を示す酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 1200 を使用する並行複発酵系を組立て、イヌリンを貯蔵多糖として含有するキクイモから直接、短時間に高濃

度のエタノールを生産した。

- 2) *A. niger* No. 12 株の生産するエキソ型イヌリナーゼ P-I を精製し、その酵素化学的諸性質を先に報告した同菌株由来のエキソ型イヌリナーゼ P-II と比較検討した。
- 3) *A. niger* No. 12 株由来のエンド型イヌリナーゼを電気泳動的に単一に精製し、アミノセルロファインによるカルボジイミドカップリング法で固定化し、その固定化酵素について諸性質を明らかにした。
- 4) 誘導的にエンド型イヌリナーゼを産生する *Penicillium* sp. TN-88 株を土壌中から新たに分離し、その酵素化学的諸性質と N 末端アミノ酸配列を明らかにした。
- 5) *A. niger* No. 12 株由来のエンド型イヌリナーゼ遺伝子をクローニングし、その遺伝情報を解析した。

研究組織

研究代表者 太田 一良 (宮崎大学農学部助教授)
研究分担者 中村 豊彦 (宮崎大学農学部教授)

研究経費

平成 8 年度	1,700 千円
平成 9 年度	500 千円
計	2,200 千円

研究発表

ア. 学会誌等

Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S., and Ohta, K.: Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Ferment. Bioeng., 81 (6), 564-569 (1996).

中村豊彦、浦川智博、水光正仁、太田一良：*Aspergillus niger* の生産する細胞外エキソ型イヌリナーゼ (P-I) の性質について。
宮崎大学農学部研究報告、43 (2), 93-101 (1997).

中村豊彦、藤田 平、太田一良：*Aspergillus niger* の生産する細胞外エンド型イヌリナーゼ (P-III) の固定化と性質。
宮崎大学農学部研究報告、43 (2), 103-109 (1997).

Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M., and Ohta, K.: Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose.
J. Ferment. Bioeng., 84 (4), 313-318 (1997).

イ. 口頭発表

T. Nakamura and K. Ohta: Properties and applications of *Aspergillus niger* endoinulinase, Third International Fructan Symposium, 平成8年7月22日、Logan, Utah, USA.

松尾忠洋、太田一良、中村豊彦：*Penicillium* sp. TN-88 株由来の固定化イヌリナーゼによるイヌロオリゴ糖の連続生産、日本農芸化学会西日本支部大会、平成8年10月12日、宮崎

松田周作、太田一良、中村豊彦：イヌリナーゼ高生産性変異株 *Aspergillus niger* 817 の生産する細胞外エンド型イヌリナーゼの構造解析、日本農芸化学会西日本支部大会、平成8年10月12日、宮崎

松田周作、秋元秀俊、太田一良、中村豊彦：糸状菌 *Aspergillus niger* の生産する細胞外エンド型イヌリナーゼにおけるアスパラギン結合糖鎖除去の影響、日本農芸化学会大会、平成9年4月2日、東京

阿部 学、松田周作、太田一良、中村豊彦：*Penicillium* sp. TN-88 株の生産する細胞外イヌリナーゼの諸性質、日本農芸化学会関西・西日本支部合同大会、平成9年10月12日、佐賀

秋元秀俊、利光大助、松田周作、太田一良、中村豊彦：*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと構造解析、日本農芸化学会大会、平成10年4月2日、名古屋

研究成果の概要

回分式の並行複発酵によりイヌリンを貯蔵多糖として含有するキクイモからエタノールを生産した。まず、エキソ型とエンド型イヌリナーゼを生産する変異株 *A. niger* 817 をスクロースを炭素源とするイヌリナーゼ生産用液体培地で 30℃、120 時間振盪培養した。糖化剤として培養液 (68.5 U/ml) を直接、または培養ろ液のエタノール沈殿物を乾燥させた粗酵素 (3.0 U/ml) を用いた。生キクイモ破碎物 (全糖量 17.8%) と搾汁濃縮液 (全糖量 45.0%) を基質とする場合には、その 150 ml に乾燥酵素 0.4 g と 1.6 g を加え、エタノール耐性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 1200 を 10^8 /ml となるように接種し、30℃で発酵させた。生成エタノール濃度は、生キクイモ破碎物から15 時間で 10.4% (v/v)、搾汁濃縮液から 72 時間で15.0% であった。キクイモ乾燥粉末 (全糖量 77.4%) を基質とする場合には、*A. niger* 817 の液体培養150 ml と混合し、*S. cerevisiae* 1200 を接種後、30℃で発酵させた。15 および24 時間発酵後にさらに 30 g と20 g のキクイモ乾燥粉末を追加した結果、120 時間で 20.1% の高濃度エタノールを生成した。キクイモは未利用資源であり、大量栽培が可能であることから、今後キクイモを原料とした低コストの燃料エタノール生産の産業化が期待される。

A. niger No.12 株由来の細胞外エキソ型イヌリナーゼP- I をDEAE-Celluloseカラムによるイオン交換クロマトグラフィーおよびSephadex によるゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製した。本酵素の分子量は、Sephadex G-200 ゲル濾過クロマトグラフィーおよびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、それぞれ72.0 kDa および 70.0 kDa と算出され、本酵素はモノマーと推察された。本酵素は、イヌリンを 100% 加水分解し、イヌリンに対する作用機構は、イヌリン分子のフルクトース末端からフルクトース単位に single chain mechanism で作用するエキソ型酵素であった。至適 pH は4.0、至適温度は 50℃であった。また、

pH 4.0 ~ 7.0 の範囲で安定であり、50℃の熱処理でもほぼ活性を保持した。基質特異性について、検討した結果、イヌリン、スクロースおよびラフィノースに作用したが、レバンおよびメレチトースには作用しなかった。本酵素のイヌリンおよびスクロースに対する K_m 値は、0.4 mM、7.14 mM を示した。金属イオンおよび阻害剤の影響については、酵素活性は Mn^{2+} で賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} でほとんど完全に阻害され、 Fe^{3+} および *p*-chloromercuribenzoate で強く阻害を受けた。EDTA に対しては、34%の低活性を示した。

A. niger No.12 株由来の細胞外エンド型イヌリナーゼP-IIIをアミノセルロファインによるカルボジイミドカップリング法で固定化した。本酵素の固定化率は85.5%、活性収率は35.5%を示した。固定化酵素の至適 pH は5.2を示し、固定化による変化は認められなかった。至適温度は固定化により45℃から40℃へ低下した。固定化酵素のpH安定性は、酸性側、アルカリ側の両領域で安定化され、広くなり、熱安定性も40℃から50℃へ上昇した。 Mn^{2+} で賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} およびN-ブロムコハク酸イミドによって顕著に阻害された。 Fe^{3+} および *p*-chloromercuribenzoate による阻害に対して抵抗性が増大した。本酵素によるイヌリン最終分解限度は47.3%で、主要加水分解産物は重合度 3 ~ 6 のイヌロオリゴ糖であった。今後、*A. niger* 817 の強力なイヌリン分解酵素系を利用して、イヌリンを含有するキクイモなどの植物から機能性食品素材としてのイヌロオリゴ糖の連続生産への応用とビフィズス菌によるイヌロオリゴ糖の選択的利用について明らかにすることを計画している。

イヌリナーゼ高生産性糸状菌 TN-88 株を大分県の土壌から分離、選出し、ペニシリウム属と同定した。本菌株を炭素源の異なる種々の液体培地で30℃、4日間振盪培養すると、イヌリンを炭素源とした場合のみ誘導的にイヌリナーゼを細胞外に生産した。その培養液のイヌリナーゼ活性は9.9 U/ml、インベルターゼ活性に対する比 (I/S) は11.2であった。細胞外エンド型イヌリナーゼを DEAE-セルロファイ

ンA-500 およびQ-セファロース HP カラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一に精製した。分子量は 68.0 kDa、比活性は 105 U/mg であった。本酵素は pH5.2、50℃ で最大活性を示した。イヌリンに特異的に作用し、スクロース、ラフィノース、レバンには作用しなかった。またイヌリンに対して 70% の分解限度を示し、その主要な加水分解産物はイヌロトリオースであった。イヌリン（平均分子量、6,100）に対する K_m 値は 0.20 mM であった。N末端アミノ酸配列は 1-DDYRPAFHFC PAENXMNEPN GLIQIXSTXH-30 であった。

A. niger No.12 株由来の細胞外エンド型イヌリナーゼを電気泳動的に単一に精製した。本酵素のアミノ末端がブロックされていたため、精製酵素をリシルエンドペプチダーゼ、プロムシアン、又は V8 プロテアーゼで切断後、ペプチドを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。分離されたペプチドは P V D F 膜にブロッキングし、6 個のペプチドについてそのアミノ酸配列をプロテイン・シークエンサーで決定した。本酵素の内部アミノ酸配列を基に合成した 2 種のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR でエンド型イヌリナーゼ遺伝子の一部 (648 bp) を増幅した。次いで、ゲノム DNA を制限酵素 *Eco*RI、*Xba*I、または *Hind*III で消化し、アガロース・ゲル電気泳動で分離後、この PCR 産物をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、3 種のいずれの消化物にも 2 本のハイブリダイゼーション・バンドが認められた。このことから、エンド型イヌリナーゼ遺伝子は *A. niger* No.12 株のゲノム DNA 上に 2 コピー存在することが示唆された。したがって、*Eco*RI 由来の 3.9 kbp と 5.9 kbp の断片をゲルから抽出し、プラスミド pUC18 にライゲーションして作成したそれぞれのライブラリーからエンド型イヌリナーゼ遺伝子を単離した。両遺伝子とも Open Reading Frame には介在配列は認められず、23 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを含む 516 個のアミノ酸をコードした。また、本酵素遺伝子を導入した大腸菌の無細胞抽出液でイヌリナーゼ活

性が認められた。さらに、既報の*Penicillium purpurogenum* 起源の同酵素と72%の相同性を示した。今後、本イヌリナーゼ遺伝子上流領域の構造を決定することにより、遺伝子発現制御機構を明らかにしたい。