Penicillium oxalicum の生産するフラクトース 転移酵素とその培養条件

志 村 進*・伊 東 禧 男*

Fructose-transferring Enzyme from *Penicillium oxalicum* and Culture Conditions for Its Production

Susumu SHIMURA* and Yoshio ITOH*

* Central Laboratory, Lotte Co. Ltd., 3-1-1, Numakage, Urawa, Saitama, 336

A strain identified as *Penicillium oxalicum* was found to produce two kinds of triose from sucrose by transfructosylation. The characteristics of the enzyme in culture filtrate were as follows; optimum temperature was about 50°C, and optimum pH was 5.0. The enzyme was stable below 55°C for 15 min at pH 5.0, and below pH 7.9 for 20 h at 30°C. Culture conditions for production of this fructose-transferring enzyme were investigated. This strain produced the enzyme in large amount only when sucrose or isomaltulose was used as carbon source. Yeast extract or corn steep liquor was a favorable nitrogen source, while inorganic nitrogen sources were not favorable. As to inorganic salts, addition of iron (II) sulfate and manganese (II) sulfate was effective. Alternation of these factors resulted in about three times of the enzyme activity than that of basal medium.

(Received Oct. 12, 1984)

シュクロースから微生物酵素によって転移糖が生成することは古くより知られている。酵母のインベルターゼによってフラクトオリゴ糖が生成することはBLANCHARD¹⁾, BACON²⁾により, またカビの酵素による転移糖の生成はBEELING³⁾, 倉沢ら⁴⁾⁵⁾により報告されている。最近, 日高ら⁶⁾により1-ケーストース, ニストースを生成する *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger* のフラクトシルトランスフェラーゼが詳細に研究され, すでに本酵素は工業的に利用されている。イソマルチュロースを生成する酵素についてはWEIDENHAGEN⁷⁾により報告され, 清水ら⁸⁾は *Serratia plymuthica* の酵素による工業的製法を検討した。また本菌の糖転移作用については藤井ら⁹⁾が報告している。

著者らは, シュクロースをより付加価値のある糖へ転換することを目的に, 転移酵素を生産する菌の検索を行った。その結果, *Penicillium oxalicum* と同定した一菌株が2種類の三糖類を生成することを見出し, 本菌の酵素的性質と培養条件について検討した結果について報

告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

使用した菌株は, 狭山市所在の自社工場用地内の土壌より分離したもので, A Manual of the Penicillia¹⁰⁾ 記載の *Penicillium oxalicum* Curie and Thom と同定している。本菌の菌学的性質も含め, 関連菌株との比較対照は別途報告する。

2. 培養方法

500 ml 容肩付フラスコに 60 ml の培地をとり, 寒天

Table 1 Composition of basal medium

Sucrose	30 (g)	MnSO ₄ ·6H ₂ O	0.02
Yeast extract	10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
K ₂ HPO ₄	0.5	Distilled water	1 (1)
KH ₂ PO ₄	0.8	pH	5.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5		

* (株)ロッテ中央研究本部 (〒 336 埼玉県浦和市沼影 3-1-1)

斜面培地に生育した胞子を1白金耳接種し、30℃で120 rpm、振幅70 mmの振盪培養を行なった。培地にはTable 1に示したものを基本培地として使用し、通常6日間培養した。また胞子形成及び保存のための寒天斜面培地には、基本培地に寒天を2%加えたものを用いた。

3. 酵素活性の測定

小型試験管に11.25% シュクロース水溶液 0.4 ml, McILVAIN 緩衝液 (pH 5.0) 0.5 ml とし、これに培養液 0.1 ml を加え攪拌し、30℃で反応させた。一定時間後沸騰水中に10分間浸漬して反応を停止させ、生成した三糖類を定量した。酵素活性は培養液 1 ml により、1時間の反応で1 μ mol の三糖類を生成する力価を1単位 (U) とした。

4. 糖の分析

糖の分離には薄層クロマトグラフィーにより、ブタノール：メタノール：水が5:4:1の溶媒で展開し、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬¹³⁾により発色させた。また糖の定量は高速液体クロマトグラフィーにより行なった。分離用カラムには Shodex S-801, または島津ゲル SCR-101N, 移動層には水を用い、示差屈折計により検出した。なお、三糖類の標準にはメレジトースを用いた。

実験結果及び考察

1. 生成糖の性質

反応液の薄層クロマトグラムを Fig. 1 に示す。反応液にはシュクロースよりも R_f 値の低い2種のオリゴ糖 (Fig. 1, A, B) が生成している。これらはアルカリ性

Fig. 1 Thin layer chromatogram of reaction mixture

A, B: Oligosaccharide produced by the reaction.

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of reaction mixture

1: High molecular saccharide, 2: Triose
3: Sucrose, 4: Glucose, 5: Fructose

硝酸銀試薬には陰性であった。反応液の高速液体クロマトグラムを Fig. 2 に示す。Retention time が三糖類のピークの他により高分子のピークもわずかながら認められる。なお別に報告するが、生成オリゴ糖はシュクロースにフラクトースが結合した 1-kestose (Fig. 1, B) と、その構造異性体である neo-kestose (Fig. 1, A) であることを確認している。

本報では三糖類として一括し、その生成について調べた結果を報告する。

2. 酵素的性質

反応時間と糖組成の関係を Fig. 3 に示す。グルコー

Fig. 3 Change of sugar composition during the reaction

—●—: Sucrose, —○—: Triose, —△— Glucose
—□—: Fructose

Fig. 4 Effect of temperature on the enzyme activity

Fig. 5 Effect of pH on the enzyme activity

ス, フラクトース及び三糖類の生成は反応44時間までほぼ直線的に増加し, 各糖類の生成の割合は重量比で3:2:3であった。

三糖類の生成に及ぼす温度及びpHを調べた結果をFig. 4及びFig. 5に示す。三糖類の生成は50°C, pH 5.0のとき最大値を示した。

酵素の熱安定性を調べるため, 培養液とMcILVAIN緩衝液(pH 5.0)を1:1に混合し, 40~75°Cで15分間処理し, 残存活性を測定した。その結果をFig. 6に示す。本酵素は55°C以下では安定であったが, 65°Cの加熱により完全に失活した。また酵素のpH安定性を調べるため, 培養液と各pHの2倍希釈McILVAIN緩衝液, または50mM NH₄OH-NH₄Cl緩衝液とを1:2に混合し, 30°C, 20時間静置後残存活性を測定した。その

Fig. 6 Effect of temperature on stability of the enzyme

The experimental details are described in the text.

Fig. 7 Effect of pH on stability of the enzyme

—○—: McILVAIN buffer

—△—: NH₄OH-NH₄Cl buffer

The experimental details are described in the text.

結果をFig. 7に示す。本酵素はpH 3.2~7.9の範囲で安定であったが, pH 9.6では完全に失活した。

3. 培養条件の検討

(1) 振盪培養条件の影響

培養における好気条件の影響を知るために肩付フラスコにとる液量を変え, 培養日数8日目まで調べた。Table 2に示すように, 培養液量60ml, 培養日数6日間のときが最も酵素活性が高かった。各培養液量の場合とも, 菌体量が一旦最高値に達したのち減少し, それとともに酵素活性が増加してくることから, 本酵素は菌体の

Table 2 Effect of culture medium volume and cultivation time on the production of the enzyme

Culture medium vol. (ml)	Culture time (day)	pH after cultivation	Dry mycelium weight (mg/ml)	Activity (U)
60	2	2.5	15.7	2.13
	4	5.4	13.7	4.61
	6	6.1	9.3	6.02
	8	7.1	7.2	4.39
80	2	2.4	5.5	2.62
	4	6.0	17.3	3.47
	6	6.5	8.7	3.83
	8	6.9	4.0	4.96
100	2	2.6	11.0	0.29
	4	5.8	20.3	0.57
	6	5.6	9.7	2.77
	8	6.9	5.8	5.27

自己消化によって培養液中に放出されているものと思われる。これらの実験より基本条件として培養液量を 60 ml とし、培養時間 6 日間を採用している。

(2) 炭素源の影響

各種糖類について検討した結果を Table 3 に示す。シュクロース及びイソマルチュロースの場合に高い酵素活性を示した。グルコース、フラクトースの単糖類や、マルトース、ラクトースでは酵素活性はわずかであった。菌株はいずれの糖類でもほぼ同程度に増殖しており、本

Table 3 Effect of various carbon sources on the production of the enzyme

Carbon* sources	Dry mecerium weight (mg/ml)	Activity (U)
Glucose	6.9	0.68
Fructose	7.4	0.71
Sucrose	8.6	5.51
Isomaltulose	8.0	4.63
Maltose	7.9	0.44
Lactose	7.3	0.87

* Carbon sources: 30 g/l

Other conditions are the same as Table 1.

酵素は誘導的に生産されるものと思われる。

(3) 窒素源の影響

各種有機性及び無機性の窒素源について検討した結果を Table 4 に示す。同じ添加量の有機性窒素源においては酵母エキス及びペプトンが有効であった。窒素量として同量を用いた場合はコーンステーパーリカーが有効であることが認められた。無機性の窒素源では酵素活性はわずかあるいは認められず、酵素生産には有機性の窒素源が必要である。中村ら¹²⁾は *Penicillium* 属菌のイヌラーゼ生産に有機性窒素物の存在が必要であることを報じているが、本結果もこれによく類似している。

(4) 塩類の影響

基本培地中の無機塩類の添加量について検討した結果を Table 5 に示す。硫酸マンガン及び硫酸第一鉄は実験した濃度範囲では添加量を増大させることが有効であった。リン酸塩については無添加においても、基本培地

Table 4 Effect of various nitrogen sources on the production of the enzyme

Nitrogen sources	Added quantity (g/l)	Quantity of nitrogen (g/l)	pH after cultivation	Dry mecerium weight (mg/ml)	Activity (U)
Yeast extract	10	1.2	6.9	7.6	4.27
Peptone	10	1.2	6.0	10.3	3.92
Malt extract	10	0.08	2.7	3.6	0.63
Corn steep liquor	10	0.35	2.4	10.6	2.75
Corn steep liquor	34	1.2	3.7	13.0	4.32
NH ₄ NO ₃	3.4	1.2	2.3	2.2	0.36
NH ₄ Cl	4.6	1.2	1.6	9.4	ND*
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.7	1.2	1.9	3.6	0.36
NaNO ₃	7.3	1.2	2.8	2.4	0.04

* ND: Not detected.

Composition of culture medium is the same as Table 1 except for nitrogen source.

Table 5 Effect of salt concentration on the production of the enzyme

	Added quantity (g/l)	pH after cultivation	Dry mycerium weight (mg/ml)	Activity (U)
Basal medium	—	6.9	13.6	3.60
$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$	0	7.4	13.6	3.69
	1.0+1.6	6.4	14.6	3.68
	2.5+4.0	6.2	12.9	4.59
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	5.9	16.4	0.84
	1.0	4.9	12.8	2.75
	2.5	6.0	16.0	2.57
$MnSO_4 \cdot 6H_2O + FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0	6.0	15.0	2.41
	0.04+0.04	6.5	13.6	4.01
	0.1+0.1	6.5	14.4	5.57

Composition of culture medium is the same as Table 1 except for concentration of salts.

Table 6 Effect of sucrose and yeast extract concentrations on the production of the enzyme

Sucrose (g/l)	Yeast extract (g/l)	pH after cultivation	Dry mycerium weight (mg/ml)	Activity (U)	Activity of dialyzed sample (U)
10	5	7.8	3.5	2.68	2.44
	10	7.4	4.2	2.72	2.35
	20	8.1	6.8	1.87	1.58
30	5	3.0	12.7	3.39	2.96
	10	4.7	14.7	3.39	3.32
	20	6.4	15.8	2.16	1.64
50	5	2.6	14.4	5.02	5.12
	10	2.9	19.7	5.01	5.26
	20	3.7	17.5	6.19	6.29
100	5	2.5	15.5	8.58	8.60
	10	3.2	14.7	6.27	6.76
	20	3.8	17.5	6.34	6.68

Culture medium consist of K_2HPO_4 0.5 g, KH_2PO_4 0.8 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g and distilled water 1 l.

とはほぼ同じ酵素活性を示した。使用している酵母エキスには無機リンとして約 2.6% 含まれており、その必要量が酵母エキス由来のもので充足しているものと思われる。

(5) 炭素源及び窒素源濃度の影響

培地中の C/N 比の影響をシュクロース及び酵母エキスをを用いて検討した結果を Table 6 に示す。シュクロ

ースの濃度の増加とともに酵素活性が増大することが認められた。酵母エキスは水 1 l に対し 5 g の添加量で十分であることがわかった。また、培養液中の糖が酵素反応系に影響を及ぼすことも考えられたので、培養液を透析処理後活性を調べたが、透析処理による大きな活性変化は認められなかった。

(6) 培養経時変化

これまでの培養条件検討の結果から Table 7 に示す改良培地を選定し、培養日数との関係を調べた。その結果を Fig. 8 に示す。菌体は培養4日目まで急増し、それ以降はゆるやかに増加した。酵素活性は培養2日目に著しく高まり、それ以降増加し続けた。培養液中のシュクロースは培養2日目ではほとんど消失し、グルコースとフラクトースに分解され、2日目以降はグルコースが優先的に菌体に利用されていることが認められる。培養液中への三糖類の蓄積は認められなかった。培養2日目の培養液の著しい酵素活性の増加は、シュクロースの分解による糖濃度の増加、すなわち浸透圧の増加と関係し

ていることも考えられる。また培養液の pH の著しい低下が認められるが、これと本酵素の誘導とが関係している可能性もある。

以上、*P. oxalicum* による三糖類生成と酵素生産のための培養条件について調べた。塩見ら¹³⁾¹⁴⁾はアスパラガスにおいてシュクロースからの種々のフラクトオリゴ糖生成の機作について明らかにしているが、本菌の場合どのような機作により2種の三糖類が生成されるのか興味深い。この点については今後さらに検討の予定である。培養条件の検討により基本培地より約3倍の酵素活性を得ることが出来た。さらに酵素の誘導の解明やその他の因子の検討により酵素活性は改善されるものと思われる。

要 約

Penicillium oxalicum と同定された一菌株が、シュクロースからフラクトースを転移して2種類の三糖類を生成することを見出した。本菌の培養液を使用して三糖類生成の最適条件を検討したところ、温度は 50°C、pH は 5.0 であった。また本酵素の熱及び pH に対する安定性を調べたところ 15 分間処理では 55°C 以下で安定であり、pH 7.9 以下では 30°C、20 時間の放置でも安定であった。このフラクトース転移酵素の生産のための培養条件を検討した結果、炭素源としてはシュクロースあるいはイソマルチュロースを用いたときのみ、本酵素は多量に得られた。窒素源としては酵母エキスをコーンステープリカーが有効であり、無機性の窒素源は適していなかった。また無機塩としては硫酸第一鉄と硫酸マンガンの添加が有効であった。これらの諸因子を改変した結果、基本培地よりも約3倍の酵素活性を得ることが出来た。

本研究を行なうにあたり、御懇篤なる御指導御鞭達を頂いた早稲田大学理工学部宇佐美昭次教授に深く感謝いたします。そして実験を手伝って下さった森脇計欲君に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) BLANCHARD, P. H. and ALBON, N.: *Arch. Biochem.*, **29**, 220 (1950).
- 2) BACON, J. S. D.: *Biochem.*, **57**, 320 (1954).
- 3) BEALING, F. J. and BACON, J. S. D.: *Biochem. J.*, **53**, 227 (1953).
- 4) 倉沢文夫・斉藤昭三・本間伸夫・山本幸正: *農化*, **29**, 26, 211 (1955).

Table 7 Composition of modified medium

Sucrose	100 (g)	MnSO ₄ ·6H ₂ O	0.1
Yeast extract	5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5	Distilled water	1 (l)
KH ₂ PO ₄	0.8	pH	5.7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5

Fig. 8 Time course of cultivation

- (a): Change of sugar composition in culture broth.
 —●—; Sucrose, —▲—; Glucose,
 —■—; Fructose
- (b): Time course of enzyme production
 —○—; Activity, —△—; Dry mycelium
 weight, —□—; pH of culture broth

- 5) 倉沢文夫・斉藤昭三・本間伸夫・山本幸正: 農化, **29**, 336 (1955).
- 6) 日高秀昌: ネオシュガーの製造と性質, ネオシュガー研究会資料, **2** (1982).
- 7) WEIDENHAGEN, R. und LORENZ, S.: *Z. Zuckerind.*, **82**, 533 (1957).
- 8) SHIMIZU, J., SUZUKI, K. and NAKAJIMA, Y.: *Jpn. Patent*, 57-39794 (1982).
- 9) FUJII, S., KISHIHARA, S., KOMOTO, M. and SHIMIZU, J.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi*, **30**, 339 (1983).
- 10) RAPER, K. B. and THOM, C.: *A Manual of the Penicillia*, Williams & Wilkins, Baltimore (1949).
- 11) SCHWIMMER, S. and BEVENNE, A.: *Science*, **123**, 543 (1956).
- 12) 中村豊彦・梶足信一郎: 農化, **43**, 599 (1969).
- 13) SHIOMI, N., YAMADA, J. and IZAWA, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2233 (1979).
- 14) SHIOMI, N. and IZAWA, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 603 (1980).

(昭和59年10月12日受理)