Cryptococcus laurentii OKN-4 菌体及び固定化菌体による 4'-ガラクトシルラクトースの生産

小沢 修*・大塚耕太郎*・内田隆次*

Production of 4'-galactosyllactose by Intact and Immobilized Cells of *Cryptococcus laurentii* OKN-4

Osamu OZAWA*, Kotaro OHTSUKA* and Takatsugu UCHIDA*

* Nissin Sugar MFG. CO., LTD., 4-9-11 Toyosu, Koutou-ku, Tokyo 135

4'-Galactosyllactose (4'-GL) as a major product was produced from lactose by intact and immobilized cells of *Cryptococcus laurentii* OKN-4. The maximum yield of 4'-GL was about 30% against added lactose. By-products such as glucose and disaccharides were produced. Tetrasaccharides were detected at the late stage of the reaction. The pH range of the reaction was 3.0 to 7.0. The optimum temperature was 65 to 70°C. The formation of 4'-GL was independent of the lactose concentration in the reaction mixture. The immobilized cells were stable after more than forty times repeated batch reaction.

(Received Aug. 5, 1988)

ホエー中に多量に含まれる乳糖は、有効的な利用開発が期待されている。乳糖にガラクトース分子が結合したガラクトオリゴ糖は、ビフィズス菌増殖因子であると報告¹⁾され、各種起源のβ-ガラクトシダーゼにより乳糖から生成することは知られているが工業的製造方法はまだ開発されていない²⁾。著者らは、土壌から分離した酵母 *Cryptococcus laurentii* OKN-4 株をラクトースを炭素源として培養すると培地中に大量のガラクトオリゴ糖が蓄積することを見だし、そのガラクトオリゴ糖が4'-ガラクトシルラクトース *O*-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose (以下4'-GL) であると同定した³⁾。工業的生産を考えた場合、培養法よりも酵素法がいろいろな点で有利であると考えられる。本報告では、ラクトースと OKN-4 株の菌体自体を反応させることによる4'-GL の生産、及び菌体を更に固定化した固定化菌体法による4'-GL 生産法について検討した。

実 験 方 法

1. 使用菌株

土壌より分離した *Cryptococcus laurentii* OKN-4 株を用いた。

2. 培養条件

2.5% ラクトース (純正化学製, 特級), 0.2% NH₄Cl, 0.3% 酵母エキス (オリエンタル酵母製) 0.08% KH₂PO₄, 0.03% Na₂HPO₄・12H₂O, 0.002% MgSO₄・7H₂O から成る培地 (pH 6.0) 80 ml を 500 ml 三角フラスコに入れ殺菌した。上記菌株を一白金耳植菌後、温度 30°C, 3 日間, 160 rpm で回転振とう培養を行った。培養終了後、遠心分離にて菌体を回収し、2 回純水で洗浄して生菌体とした。

3. 固定化菌体調製法

生菌体を水で再懸濁し、OD₆₀₀=200 に調製した液 16 ml にアクリルアミドモノマー 3.0 g, N,N-メチレンビスアクリルアミド 0.16 g, 5.0% N, N, N', N'-テトラメチレンジアミン溶液 2 ml, 2.5% 過硫酸カリウム

* 日新製糖株式会社 (〒135 東京都江東区豊洲 4-9-11)

Fig. 1 Time courses of 4'-GL production

Substrate: 5% lactose (pH 5.5), Cell concentration: $OD_{660} = 50$,
Temperature: 60°C

溶液 2 ml を加え、0°C で 20 分反応させ、ポリアクリルアミドゲルを調製した⁴⁾。これをカッターで粉砕し、約 5.0 mm×1.0 mm φ の顆粒に成型した後、純水でよく洗浄して凍結乾燥したもの 1.8 g を固定化菌体として用いた。

4. 糖の定量

各糖の定量は、高速液体クロマトグラフィーによる面積法で求めた。ポンプは日立 633 型、RI 検出器は SE-31 (昭和電工製)、データー処理装置は日立 833 型クロマトプロセッサー、カラムはリクロゾルブ-NH₂ (5 μm) (Cica-Merk 製) を用い、溶媒はアセトニトリル: 水=65:35、流速 0.7 ml/min の条件で行なった。

実験結果

1. 生菌体及び固定化菌体による 4'-GL の生産

5% ラクトースと生菌体又は固定化菌体とを pH 5.5, 60°C で反応させたところ、いずれの場合も時間経過と共にラクトースが減少し、4'-GL が直線的に生成した。しかし、反応 3~5 時間目頃から 4'-GL の生成速度が遅くなった。4'-GL の生成量は、生菌体では 8 時間目 (含有量が 1.2%, 糖割合で 26%), 固定化菌体では 12 時間目 (含有量が 1.4%, 糖割合で 28%) で最大値を示し、それ以後は徐々に減少した (Fig. 1)。反応初期からグルコースを主としガラクトースも含む単糖の生成が見られ、又ラクトースと異なる二糖も副生した。図には

示さなかったが反応後期には四糖と思われるオリゴ糖が生成した。

2. ラクトース濃度の影響

生菌体を用い、基質ラクトース濃度 5~30% で反応させたところ、いずれの濃度でも 4'-GL の生成量が糖割合で 15% 過ぎるころから 4'-GL 生成速度は遅くなった。又基質濃度により 4'-GL の生成量は変化しなかった (Fig. 2)。

Fig. 2 Effect of substrate concentration on 4'-GL production by intact cells

Reaction volume: 20 ml, Cell concentration: $CD_{660} = 45$, pH: 5.0, Temperature: 60°C

Fig. 3 Optimum pH on 4'-GL production by intact and immobilized cells

Substrate: 3% lactose in McIlvaine buffer, Cell concentration, Reaction time and Temperature: $OD_{660} = 90$ for 18 h at 30°C in the case of intact cells and $OD_{660} = 50$ for 5 h at 60°C in the case of immobilized cells

Fig. 4 Effect of temperature on 4'-GL production by intact and immobilized cells

Substrate: 3% lactose in pH 5.5 McIlvaine buffer, Cell concentration: $OD_{660} = 50$, Reaction time: 4 h

Table 1 Effect of metal ions of 4'-GL production by intact cells

Metal ions (5×10^{-3} M)	Relative activity (%)	Metal ions (5×10^{-3} M)	Relative activity (%)
None	100	Fe^{2+}	99
Ca^{2+}	86	Zn^{2+}	92
Hg^{2+}	40	Ag^{+}	19
Al^{3+}	80	Ba^{2+}	93
Ni^{2+}	87	Co^{2+}	81
Mg^{2+}	104	Mn^{2+}	105
Fe^{3+}	88	Cu^{2+}	73
Mercaptoethanol	93	EDTA	84

Substrate: 3% lactase in pH 6.0 McIlvaine buffer, Intact cell concentration: $OD_{660} = 90$, Reaction time: 18h, Temperature: 30°C

3. pH と温度の関係

生菌体、固定化菌体のどちらを用いても、4'-GL は pH 3~7 でよく生成し、最適 pH は生菌体で pH 6.0、固定化菌体で 5.0 であった (Fig. 3)。最適温度は、生菌体で 65°C、固定化菌体では 70°C であった (Fig. 4)。

4. 金属イオンの影響

4'-GL 生成反応は Hg^{2+} 、 Ag^{2+} により阻害を受けた。又反応を促進させるものはなかった (Table 1)。

5. 固定化菌体バッチ繰り返し反応試験

固定化菌体 0.4 g に基質液として 10% ラクトース溶液 (pH 5.5) 2 ml を加え、60°C で 24 時間反応させた。反応終了後デカンテーションにより上澄液を除去し、新しい基質液 2 ml を加え再度反応を行った。この様な方法でのバッチ繰り返し反応試験では、4'-GL の生成率

Fig. 5 Reuse test of polyacrylamide-gel entrapped cells

20~25% の範囲を 40 回以上保持した (Fig. 5).

考 察

Cryptococcus laurentii OKN-4 生菌体または固定化菌体とラクトースを反応させると 4'-GL が生成し、その最高収率は約 30% (対ラクトース) で、グルコースなどの単糖やラクトースとは異なる二糖、四糖も副生した。各種微生物起源の β -ガラクトシダーゼによるガラクトオリゴ糖の生成では、数種類のガラクトオリゴ糖が生成すると報告⁵⁾⁻⁸⁾ されているが、本方法でも同じ結果であった。しかし β -ガラクトシダーゼによるガラクトオリゴ糖の生成では、基質ラクトース濃度によって転移オリゴ糖の生成割合が増減するのに対し、本方法が基質濃度の影響を受けない点では異なっていた。生菌体と固定化菌体では、4'-GL の生成についてほとんど違いはなかったが、ただ *Escherichia coli* をポリアクリルアミドゲルで固定化した報告⁴⁾ と同様、本固定化菌体では生菌体より耐熱温度が約 5°C 上昇し、最適 pH が 1 pH 単位酸性側に移動した。工業的生産、特に微生物汚染防止を考えると、既に報告されているガラクトオリゴ糖生産が、pH 4.5~7.3、温度 30~60°C の範囲で行われるのに対し、pH 3~4 でも 4'-GL の生成率が高く、60°C 以上で反応が最適である本方法は好ましい。又固定化菌体によるバッチ繰返し反応試験で、40 回以上 4'-GL を効率よく生産したことは、前報³⁾ の培養法と比較しても酵素の効率的使用上優れていると考えられ実用化が期待できる。今回固定化方法としてポリアクリルアミドゲルを検討したが、ガラクトオリゴ糖を食品として利用する場合の固定化方法として、アルギン酸や κ -カラギーナンなどの天然物の固定化剤を使用した検討が今後必要と考えられる。

要 約

土壌より分離した *Cryptococcus laurentii* OKN-4 の生菌体及びポリアクリルアミドゲル固定化菌体とラクトースを反応させ、4'-ガラクトシルラクトースの生産を試みた。反応時間経過とともに 4'-ガラクトシルラクトースを生産したが、グルコースを主としガラクトースも含む単糖、ラクトース以外の二糖及び四糖が副生した。その結果、4'-ガラクトシルラクトースの収率は基質ラクトースに対し 30% が限界であった。しかし、基質ラクトース濃度には依存しなかった。pH 3~7 で生産可能で、最適温度は 65~70°C であった。固定化菌体を用いたバッチ繰返し反応試験では 40 回以上安定に 4'-ガラクトシルラクトースを生産した。

文 献

- 1) 光岡知足編：腸内フローラと栄養（学会出版センター、東京）、p. 45-71 (1982).
- 2) 一島英治編：食品工業と酵素（朝倉書店、東京）、p. 68 (1983).
- 3) 大塚耕太郎・大木修一・小沢 修・内田隆次：醗酵工学, **66**, 225 (1988).
- 4) CHIBATA, I., TOSA, T. and SATO, T.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 878 (1974).
- 5) MOZOFFAR, Z., NAKANISHI, K., MATUNO, R. and KAMIKUBO, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3053 (1984).
- 6) PRENOSIL, J.E., STUKER, E. and BOURNE, J.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1019 (1987).
- 7) PRENOSIL, J.E., STUKER, E. and BOURNE, J.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1026 (1987).
- 8) GREENBERG, N.A. and MAHONEY, R.R.: *J. Food Sci.*, **46**, 684 (1981).

(昭和 63 年 8 月 5 日受理)