

Rhodothermus marinus JCM9785 由来耐熱性セロビオース 2-エピメラーゼによるバイオリアクターを用いたエピラクトースの連続的生産系の構築

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野
佐藤 央基

(背景と目的) cellobiose 2-epimerase (CE) は β -1,4 結合からなるオリゴ糖の還元末端のグルコース残基をマンノース残基へ可逆的に異性化する。ラクトースを基質とした場合に生成されるエピラクトースは、プレバイオティクス効果を有する機能性オリゴ糖であり、食品素材としての利用が期待されている。これまでに報告されていた CE は耐熱性が低く、いずれも嫌気性細菌由来であったことから工業的利用には適さなかった。そこで好気性細菌に由来する CE が探索され、新たに好気性好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* JCM9785 より CE (RmCE) が見出された。本研究では RmCE によるエピラクトースの効率的合成法の確立を目的とし、固定化酵素の検討を行った。固定化条件を最適化し、固定化酵素の性能評価を行った。エピラクトースの合成反応における遊離酵素と固定化酵素の必要酵素量の比較から、酵素固定化の有効性を評価した。

(結果および考察) 大腸菌組換え RmCE を調製し、固定化条件の検討に用いた。Duolite XAD761 と比較し、酵素の吸着率および活性が共に高かった Duolite A568 を固定化樹脂に用いた。Duolite A568 1 g あたり組換え RmCE 9.6 mg を添加したときに、最大活性 187 U/g-resin が得られた。熱安定性の向上が期待されたため、グルタルアルデヒド (GA) による架橋形成処理を検討した。活性に影響がない 0.2% GA により処理した固定化酵素 (GA 酵素) は、60°C に 9 日間保持した後の残存活性が未処理のものより高かった。GA 酵素は pH 6.3, 80°C で最大活性を示し、pH 3.2-10.3, 70°C 以下で安定であった。遊離酵素と比較し、最適温度と温度安定域、および pH 安定域では大きな差は見られなかったが、GA 酵素は酸性 pH において遊離酵素より高い活性を示した。

活性の低下が穏やかな 50°C にて、バイオリアクターによるエピラクトースの連続的生成反応を検討した。酵素添加量 9.6 mg/g-resin で GA 酵素 20 g (添加酵素の総活性 7300 U) を調製し、カラムに充填してバイオリアクターとした。基質供給速度を検討した結果、1 時間あたりカラム容量の 8 倍に相当する流量 (2.66 ml/min) まではエピラクトースの最大変換率 (30%) が得られた。この流速時では 24 時間で 383 g のラクトースを処理できると見積もられた。本条件下では、13 日間最大変換率が維持された。

遊離酵素によるバッチ反応とバイオリアクターによるエピラクトースの生成に使用する酵素量を比較した。遊離酵素では、50°C, 24 時間の反応で 3.9 U/g-lactose 以上の酵素量で最大変換率が得られた。バイオリアクターでは同じ酵素を繰り返し反応させるため、必要酵素量は反応日数に応じて減少する。本研究で用いたバイオリアクターは 5 日間反応させたとする、酵素添加量は 3.7 U/g-lactose に相当し、遊離酵素の必要使用量とほぼ同等となる。変換率が維持された 13 日間の連続反応では、酵素使用量は 1.5 U/g-lactose となり、遊離酵素の 38% となる。以上のことから、RmCE の固定化はエピラクトースの生成において酵素使用量の削減に有効であることが示された。