

Kluyvermyces lactis の βガラクトシダーゼ（ラクターゼ）の開発

塩田 一磨

ミルクは栄養豊富な食品であり、また原料としてさまざまな食品（チーズやヨーグルトなど）に加工される形で古来、世界中の人々に親しまれてきた。ミルクには約5%（1L中に50g）もの乳糖が含まれ、体質によってはおなかに影響が出る場合もあり、乳糖を酵素的に分解した処理乳が開発されてきている。

合同酒精株式会社では、長年の酒造りの経験をベースに、発酵技術を利用した製品を作り続けており、1964年に千葉県松戸市に中央研究所（現酵素医薬品研究所）を開設以来、これまで、医薬品原料、医療用診断薬、健康食品素材、産業用酵素などを開発し、商品化してきた。中でも特に、微生物由来の産業用酵素の研究に古くから取り組み、これまでに、セルラーゼ、グルコースイソメラーゼ、ラクターゼなど多くの製品を商品化している。

本稿では、*Kluyvermyces* 属酵母 *K. lactis* の生産するβガラクトシダーゼ（ラクターゼ：合同酒精の商品名 YNL）について記述したい。

Kluyvermyces lactis について

K. lactis は古くは *Saccharomyces* 属に属し、のちに分属している。出芽酵母であり、遺伝学的に *Saccharomyces* 属に近いことから、遺伝子工学的な手法は共通して利用できる場合が多い。*K. lactis* は乳酵母とも呼ばれるように、乳製品よりよく分離され、乳糖を分解できないことが多い他の酵母とは異なり、乳糖を資化することができる。なお、*K. lactis* の遺伝子については、2004年に全塩基配列が決定されている¹⁾。図1に *Saccharomycetaceae* 科酵母の系統図と *Kluyvermyces* 属の位置を示した。

現在、*Kluyvermyces* 属の産業的利用として重要なのは、キモシンの組換え発現ホストとしての利用と、ラクターゼの生産菌株としての利用である。

チーズ生産に用いられるレンネット（凝乳酵素キモシンとペプシンを含む）については、長年、牛やヤギなどの反芻動物の胃由来のものが用いられてきたが、世界的なチーズ需要の増加に伴う使用量の増加や、動物から調製する諸問題から、代替酵素が望まれてきた。1960年代頃から、ケカビ由来の微生物レンネットが登場し代替が進んできたが、動物由来酵素への要求が強かったため、

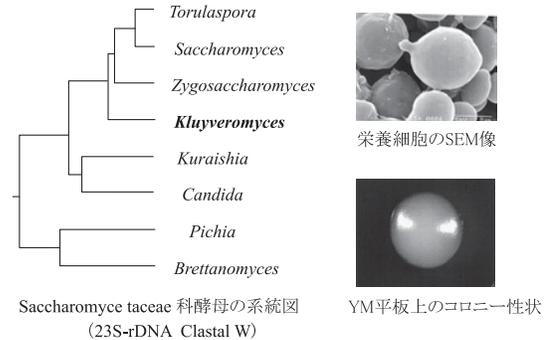


図1. *Kluyvermyces* の分類上の位置

1990年より、動物由来のキモシンを組換え発現する方法が検討された。異種酵素の生産性や食経験からの安全性を評価された結果、*K. lactis* をホストとして生産されるキモシンが現在世界中で広く利用されている²⁾。遺伝子組換えにより生産された食品産業用酵素としてはもっとも利用が進んでいる酵素として大変興味深い。

βガラクトシダーゼ（ラクターゼ）について

乳糖（ラクトース）はグルコースとガラクトースがβ1-4結合している二糖であり、多量に摂取すると乳糖不耐症状が生じるとされている。ミルク中の乳糖のみを物理的に除去することは、かなり困難で、UF膜により低分子を除去する処理法や、乳タンパク質に低分子栄養成分を添加する再構成ミルクの製造などが試みられているが、ミルク本来の風味を壊さずに達成することは容易ではない。ラクターゼはミルクに添加するだけで穏やかな条件下で効果的に乳糖を分解できるため、乳糖分解によりグルコースが生じることで甘味は増加するが、ミルク本来の風味に与える影響は少ない。

微生物由来のラクターゼ研究の歴史は古く、1953年には大腸菌からのラクターゼ、1957年には枯草菌由来のラクターゼが報告されており、ざっと検索しただけでも100種を超える生物からのラクターゼが報告されている。酵素コードはEC3.2.1.23。古くから乳幼児の乳糖不耐に対し、ラクターゼを経口投与する治療がなされている。また、ラクターゼのアプリケーションや使用方法に

著者紹介 合同酒精株式会社酵素医薬品研究所（担当部長） E-mail: k-shiota@oenon.jp

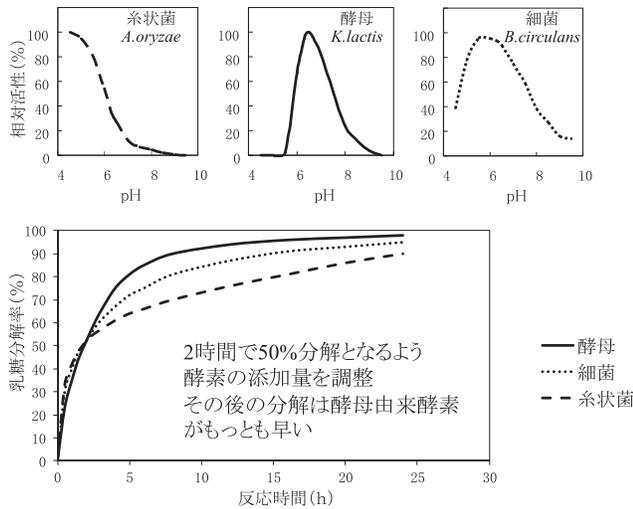


図2. 3種の市販ラクターゼ製剤のpHと活性の関係と各製剤によるミルク中の乳糖分解

ついでにさまざまな取組みについてはいくつか総説が出ている³⁾。

*K. lactis*由来のラクターゼは、分子量約12万のタンパク質の2量体または4量体とされ、最適pHは6.5で熱には比較的弱い。グリコシダーゼファミリーとしては、酵母由来ラクターゼはGH2ファミリーに分類される。特徴としては、ミルクのpHに等しいpH 6.5付近の中性域でもっともよく働くこと、ミルク中の乳糖濃度では、ほぼ完全にグルコースとガラクトースに分解できることである。図2に示したように、広く製品が流通している糸状菌由来および細菌由来のラクターゼと比較しても、その分解性能の高さが確認できる。

合同酒精のラクターゼ開発の歴史

合同酒精のラクターゼ研究は1970年頃より開始され、さまざまな試料より生産菌の探索を行った結果、1971年には乳製品より分離した酵母(その後*K. lactis*と同定)からラクターゼ活性を確認している。その後1979年よりGODO-YNLとして販売が開始された。以降現在に至るまで育種が継続され、現在の実用株につながっている。

現行生産株は野生株から実用株まで数代における育種の結果、グルコース抑制や、乳糖誘導などの制御系の性質は、野生株と比べてかなり変化していたが、興味深いことに、生産するラクターゼの構成遺伝子にはまったく変化がなかった。それゆえ結果的ではあるが、開発初期の市販品と現行品のモノとしての変化はないことが確認されている。

ラクターゼの開発当初は、乳糖不耐を対象としたスベ

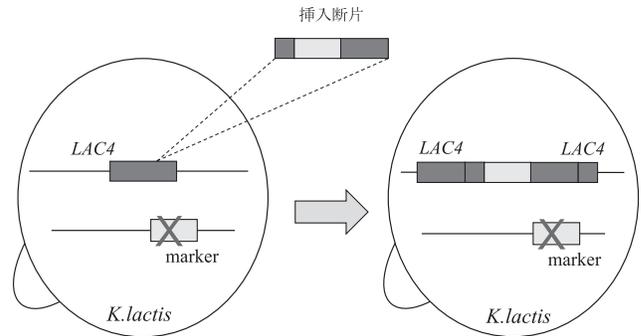


図3. 分子育種によるラクターゼ生産性の増加

シャリティ酵素としての位置づけであったが、海外向け(特に北欧向け)の販売が増加し、ラクターゼを使用した乳製品が急速に増加している。これは、欧州の場合、家族に一人乳糖不耐者がいるときは、その家族全員が分解乳を摂る慣習があり、日本よりはるかに乳糖不耐率が低いにも係らず、分解乳が普及する理由の一つと推察されている。実際、陳列されているミルクの多くが乳糖分解乳である国も増えている。急速なラクターゼ処理乳の普及に伴い、ラクターゼ本来の乳糖を分解する作用の他に、分解で生じるグルコースの甘味を利用することで、ヨーグルトなどへの糖類添加量を減らすことができるといった副次的な利用が増えてきている。そういったことから、ラクターゼはキモシンと並び、食品用のコモデティ酵素と呼べるまでに発展してきている。

当然、生産量の増加に伴い、ユーザーの価格要求は強く、コストダウンのための生産性向上の育種は必須である。前述したように、合同酒精では、開発当初から、人為的突然変異を利用した生産性向上の育種は継続していたが、2000年代からは、*K. lactis*自身を宿主とした遺伝子組換えによる生産性向上のための研究を行ってきた。実際LAC4遺伝子をベクターに組み込んで導入し、生産性の向上を確認している。また、図3に示したように、トリミングにより外来遺伝子を除去し、すべて宿主由来の遺伝子で構築したゲノム組み込み型のセルフクローニング株の創出にも成功し、生産性が向上していることも確認できている。

コストダウン検討と並行して、品質向上に向けた育種を継続している。ラクターゼに限らず、市販、流通している酵素製剤は、ほとんどが主酵素とそれ以外のタンパク質を含むクルードな物であり、いかにコストをかけず、不要なタンパク質(夾雑する酵素活性)を取り除いた酵素製剤を製造するかが品質面での鍵となる。

これまで、酵素製剤の製造では、吸着や、塩析、沈殿

など、物理的な方法で精製操作を行うことも多かったが、酵素を使用する際に不要な夾雑酵素活性さえ除去できれば、主酵素の精製度がやみくもに高い必要はない。そのため合同酒精においても、酵素製剤を使用する状況を考慮し、除去すべき夾雑酵素を特定し、その欠損株を育種することを行っている。K. lactisのラクターゼ生産株は2倍体酵母であり、少なくとも2回の変異が必要である(まれに片方がすでに欠損の場合もある)。不要な夾雑酵素を欠損した株により製造された酵素は、精製コストをかけなくとも同レベルの活性品質を達成することができる。

ラクターゼの利用

乳業会社において乳糖分解乳を製造するためのラクターゼの使用法はさまざまであるが、大きく二つに区分できる。一つは、集荷・工場受入から、加熱殺菌・出荷の前までの間にタンク内で酵素反応を行う方法である。ラクターゼに限らず、酵素は、失活するギリギリの高温での作用がもっとも強いいため添加量を少なくすることができる。実際は、乳業各社の考えの中で40°C付近にミルクを保温して酵素反応を行う例と、冷却下で酵素反応を行う例があると考えられる。

もう一つは、ミルクを殺菌後、充填前に無菌的にラクターゼを添加し、流通段階で乳糖を分解する方法である。これは、ラクターゼの添加量を極端に減らすことができるため、欧米での利用が広がってきている。前者では、酵素は失活しているため、酵素活性の流通中での影響はないが、二糖である乳糖が分解して単糖二つとなり還元性が増加するため、加熱殺菌により着色や風味の変化などが認められることがある。後者では、まず工場内で酵素反応に要する時間を必要としないこと、また、分解後に加熱殺菌されないため、着色は少なく、甘味が増す以外の変化が少ない。一方酵素活性が残存することになるため、ラクターゼ製剤に他の活性を有する酵素が夾雑していた場合、長期保管中にミルクに作用することがあり、これが、商品の賞味期限に影響を与えることがある。

最近、ヨーグルトへのラクターゼの利用が急速に伸びてきている。これは、ヨーグルトを製造するためには、工場内で発酵に一定の時間を要するが、図4に示したように、その時間を利用して種菌と同時にラクターゼを添加することで、乳糖分解とヨーグルト発酵を同時に進め、これまでの製造時間に変更なく、乳糖分解ヨーグルトが製造できるようになったことが大きな理由と考えられる。ラクターゼ添加により、甘味が付与でき、場合によっては、添加する糖類を減少あるいは無添加で製造できる

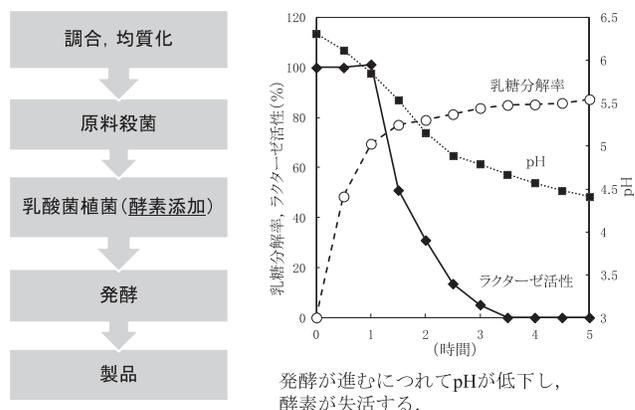


図4. 乳糖分解乳, 乳糖分解ヨーグルトの製造方法

ようになったことも理由の一つであろう⁴⁾。

最近の用途開発例としては、乳糖分解脱脂粉乳や煉乳、乳糖分解ホエイやホエイからのアルコール発酵への応用など、乳糖を含有するさまざまな材料の乳糖分解に利用が試みられている。ラクターゼによる還元糖の増加を利用し、メイラード反応による風味の調製などのアプリケーションも考えられる。また、これらの乳糖分解素材を用いた保健食品の開発なども期待されている。

さらに、ラクターゼにより乳糖を分解することで、発酵菌に対する作用が認められてきている。特に前述したヨーグルトやビフィズス菌発酵などにおいて、乳糖を分解することで、菌の生育速度に影響するだけでなく、これら菌類の機能性成分の生産性への影響を与えることも分かってきている。

食品添加物としてのラクターゼ

ラクターゼが食品添加物として世界中でコモデティ化するに伴い、各国それぞれの実情に合った製品が望まれるようになってきている。大きなポイントは2点あると考えている。

一つ目は、コーシャ(ユダヤ教)やハラール(イスラム教)に代表される宗教対応についてである。各宗教ともに食に関しては厳格なルールを実践しており、これらの地域での販売量を伸ばしていくためには、各宗教の要求に則った製品の製造が必要になる。これらは概ね培養に使用する原料に禁忌なものが使用されていないことが基本となる。合同酒精の酵素製造工場では、ラクターゼはコーシャ、ハラール双方に対応して生産している。その他の酵素についても順次宗教対応を進めているが、その際問題になるのは、現行の培地組成を宗教対応へ変更する際の酵素生産への影響である。そのため、現在では、

新製品や新規導入品をラボ検討する段階から、宗教対応培地での検討を行っている。

二つ目は国内外の当局による規制への対応である。米国では基本GRAS対応が必要であり、欧州は各国ごとの規制であったものがEU規制となりつつあり、基本ポジティブリスト制に移行しつつある。日本国内も次期改定公定書より、すべての食品添加物酵素について公定書収載が必要になる方向で進んでいる。弊社ラクターゼを含めこれまで流通していた既存添加物は収載となる方向ではあるが、今後、新規収載を目指す場合は、安全性評価が必須となる。安全性評価には多額の開発費が必要であり、もはや少しやってみる程度のやり方では、新製品の開発はおぼつかないと考えられる。今後新しい食品添加物酵素の開発には相当確固たる方針が必要になってくると思われる。

おわりに

実際のところ、産業用酵素が、スーパーマーケットなどに出回ることはまずなく、主にいわゆるBtoB商品として、メーカー向けとして販売することになる。産業用酵素を使用するメーカーが産業用酵素に期待するのは、使用することでメリットがあること、それは、①付加価値をつける(新しい機能、環境負荷減少など)、②使用することで廉価になる(化学的処置では高価・困難)の

どちらかだと考えられる。

長年、産業用酵素の研究を続けてきた中で、産業用酵素には、オリジナルな活性能力だけでなく比活性が重要だと考えている。これまで新規酵素スクリーニングの際には、液量当たりの活性(U/mL)で評価することが多かった。落選とした中に低生産ではあるが高比活性なものがあったかもしれない。遺伝子組換え技術で生産性は向上できるが、それはクラシカルな育種でも比較的容易に達成できる。最適pHや、安定性の向上などについてもある程度分子育種が可能になってきている。しかしながら比活性を向上することは現在の技術でも容易ではない。培養液あたりのタンパク質の生産量はある程度上限が決まっているので、最後に勝つのは高比活性酵素という気がしてならない。

酵素メーカーとしては、新規酵素の開発や現行酵素のアプリケーション開発とともに、果敢のクオリティアップ、コストダウン検討が必須と認識している。新興国の追い上げも激しい昨今であるが、キャッチアップされぬように今後も進歩を続けたいと考えている。

文 献

- 1) Dujon, B. *et al.*: *Nature*, **430**, 35 (2004).
- 2) van den Berg, J. A. *et al.*: *Biotechnology*, **8**, 135 (1990).
- 3) Husain, Q.: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **30**, 41 (2010).
- 4) 濱口和廣: *ミルクサイエンス*, **60**, 99 (2011).