わが国における異性化糖製造工業について

小 巻 利 章*

On the Production of High Fructose Corn Syrup in Japan

Toshiaki KOMAKI

*Nagase & Company, Ltd.**(1-1-17, Shinmachi, Nishi-ku, Osaka 550, Japan)*

Commercial production of high fructose corn syrup (abbreviated as H. F. C. S.) has become on a full scale since the year of 1976 when immobilized glucose isomerase appeared on market. Sales volume of H. F. C. S. from April, 1978 to March, 1979 was 238,625 tons in solid equivalent. In this report, the technical progress in H. F. C. S. production industry was reviewed.

The enzyme, glucose isomerase, is derived from *Streptomyces* species. This enzyme is stable intracellularly and up to 1976 frozen living cells (mycelia) had been used as the enzyme preparation.

A number of immobilization methods for the enzyme have been developed. Most of the commercial preparations available at present are in granular and dried immobilized-form which is produced and supplied by some enzyme manufacturers. There are two reaction systems—descending and ascending. In the descending system, two to four reactors are used in the way like merry-go-round. In the ascending system, only one reactor is used. This system is often called ‘pulse bed system.’ The most important technic for this system is how to prevent air from entering into the reactor when the enzyme is placed or replenished. The most suitable reaction conditions are 45 to 50 % substrate concentration, pH 7.8 and 55 to 57°C.

Purity of substrate influences remarkably productivity of immobilized enzyme. Especially high absorption at 275 nm directly relates with reaction inhibition. Development in technic which reduces amount of remaining sugars other than glucose and fructose is requested. Such remaining sugars will be classified into the following five groups: (1) Condensation products by reverse reaction of glucoamylase. (2) Products formed by transglycosylation of α -glucosidase—Removal of this enzyme is possible. (3) Maltulose formed by isomerization of reducing ends of maltose and other oligosaccharides—This formation is due to high temperature and pH during liquefaction of starch. (4) Molecular substances unsusceptible to glucoamylase such as multiple branched dextrines and phosphodextrines. (5) Psycose formed by epimerization of fructose.

はじめに

わが国において酵素糖化法によるブドウ糖の工業生産が開始されたのは、1959年の5月のことであった。その時から、さらに甘味度の強い果糖を工業的に生産できないかということは、当業界にとって大きな技術目標であった。1960年ごろから各種の微生物によるグルコースの異性化に関する研究が続出した。これらは EC 5.3.1.5 に属する xylose isomerase および EC 5.3.1.9 の glucose phosphate isomerase に属するものであった。IUB

の enzyme nomenclature の1972年版では、EC 5.3.1.18 として glucose isomerase が独立して取扱われたが、1978年の改訂に当り作用が上記のいずれかに属するものであるとして削除されている。

多くの glucose isomerase は微生物菌体内に蓄積されている。実用的にはこの菌体から酵素を抽出する必要はなく、直接生の菌体を酵素標品として用いることができる。この生菌体を用いた異性化糖 (high fructose corn syrup) の生産は1965年ごろから試みられたが、当時は液状の砂糖を用いることが一般に普及されていなかったことと経済的な理由から、本格化したのはサイクラメイ トの使用が禁止された1970年ごろからで、酵素標品とし

* 長瀬産業株式会社 (550 大阪市西区新町 1-1-17)

での冷凍生菌体が市販されたのが1971年8月である。その後砂糖の国際的需給のバランスの崩れによる糖価の異常な高騰(1974)、および固定化グルコースイソメラーゼの市販化(1976)によって本格化した。引き続き液体クロマトグラムの原理に基づく、ブドウ糖と果糖の分離が工業化し、第2世代の異性化糖と呼ばれる高果糖異性化糖の市場化(1979)によって、さらに飛躍が予想されている。

本稿では、こうした異性化糖製造工業におけるいくつかの問題をとりあげて、それらについての全くの私見をのべて参考供したい。

1. 異性化糖の市場性

本来甘味料は、甘味の強さと質、微生物に対する影響および物性が利用の対象になっている。砂糖は暖地での甘しょ、寒地での甜菜に依存していたが異性化糖の出現で、トウモロコシ、芋類などの澱粉質が第3の砂糖供給源として登場したことを意味しており、経済的にも興味深い技術である。

1978/79の世界の砂糖の生産量は9157万トンと推定されており(リヒト、第4次、8月30日)、前年より26.2万トンの増産(0.28%)である。他方消費は8996万トンと前年より403万トンの増加(4.69%)である。消費の増加はほとんど開発途上国によるもので、とりわけインドの消費増加は前年比38%増である。いずれにしろ生産量が消費を160万トン上まわったために、世界の砂糖在庫は3126.5万トンに達し、在庫/消費%は34.75に達した。適正在庫水準を定義するのは至難なことであるが、消費の15~28%の間と推定され、世界糖価の時系的分析から24%とする説がある。そうすると1979年8月末の在庫は967.4万トン過剰在庫であるといえる。1979/80年の砂糖生産の推定は8800万トンで、このとおりになれば、わずかながら消費が生産を上まわることになる。わが国の1978/79の砂糖の需給は、在庫46.6万トン、生産69万トン、輸入235万トンで計350.6万トンであった。わが国の糖価は世界で最も高い方に属しており、米国の190%、英仏の173%、オランダの138%、スイスの129%、独伊の119%である。

一方異性化糖の製造原料である澱粉は、わが国の場合総生産量の65.5%、水飴ブドウ糖製造用の72.5%がコーンスターチである。1978年の世界のトウモロコシの生産額は、3億5900万トンでそのうちの半分が米国で生産され、中国でも約10%生産されている。しかしこれを輸出量から見ると、輸出総量が5700万トンでそのうち70%強

が米国で、ついでアルゼンチン、南ア、ブラジル、仏と続き5か国で90%強に達する。

53年4月~54年3月の間のわが国の異性化糖の販売量は41.5万トンに達したが、このうち75%は砂糖が10~30%混合された商品であった。澱粉原料の異性化糖は固形物に換算すれば238,625トンで総量の57.5%に相当する。この主な用途は乳酸菌飲料21.83%、ジュース17.53%、パン13.89%、冷菓11.87%、清涼飲料10.83%、缶詰5.98%、加工牛乳4.73%、菓子原料2.31%、上記8用途で全体の約90%である。

現在生産している会社は14社15工場であり、このうち6工場はコーンスターチの生産と一貫して行われている。

2. 異性化糖製造技術の変遷と問題点

現在実用化している glucose isomerase の生産菌はわが国では *Streptomyces* 属の放線菌である。欧州では *B. coagulans*, *Arthrobacter* が用いられている。

glucose isomerase は菌体内に存在する酵素であり、培養した菌体を自己消化しないように処理すると菌体内に安定な形で残存し、菌体のまま酵素標品として使用することが可能である。異性化糖製造の初期から1976年ころまでは、ブドウ糖液に生菌体を添加し、異性化反応終了後、その菌体を回収し、新しい菌体を補充しながら数度にわたり繰り返し使用されていた。

生菌体を用いる回分法の異性化条件は、糖濃度45~50%w/w、温度65℃、凍結菌体添加量は0.5~1.0%(対糖固形分)とし、pHを7.0に調整し、反応の経過とともにpHが6.5まで下ればアルカリを加えて7.0まで中和する操作を繰り返し行っていた。反応所要時間は60~70時間で、果糖生成率が42%に達すると終了する。この反応期間中、初期はpH低下はそれほど早くないが、果糖生成率が進むにしたがって、中和操作を1.5~2時間ごとに繰り返さねばならないようになり、着色も進む。この時に激しい攪拌をしたり、空気にふれるとより着色が激しくなる。中和に要する水酸化ナトリウムの量は60時間で150ppm程度に達し、その後は急激に増加し、通常は0.1~0.15%(対糖固形分)に達する。

この反応時のpH低下の原因としては、まず第一に、非酵素的反応として果糖の分解および反応によるものと考えられる。これは高pH、高温度、酸素の存在、含窒素化合物、ポリフェノールなどの果糖と直接反応する夾雑物、さらに金属イオンの存在などによって促進されるものと思われる。このために反応終了後はできるだけ早くpHを下げる必要がある。

第二に酵素的反応として考えられるのは、菌体内に共存している解糖、生酸性の酵素系の働きが考えられる。これは用いる微生物の種類によってかなり異なるが、培養後の後処理条件を適当に選ぶことで、自己消化関連酵素とともに失活させることが可能である、glucose isomerase がかなり耐熱性である点から取扱いが容易である。

いずれにしろ、この場合の着色はかなりひどく、中和に用いた塩類の除去とともに精製コストに大きく影響を与えていた。なかには添加する生菌体量を増殖し、反応時間を短縮した方が精製コストと比較して有利であると判断し、30～40時間で異性化を終了するように操作していたところもある。

この問題の解決手段として、固定化酵素を用いて、固定床式の連続操作を行うことで、反応時間を極端に短くすればよいということは誰しもが考えるところであった。さらに glucose isomerase の場合は基質がグルコースという水溶性の低分子であることから、固定化酵素応用の最も好都合な対象反応であるともいえ、開発当初から固定化酵素による反応が研究目標であった。

3. glucose isomerase の固定化

酵素の固定化手段はかなり多数知られているが実用的な見地からは、食品としての安全性と経済性の2点が重要である。

このためには①取扱いが容易である、②大型の反応装置で使用可能な物理的適性を有していること一形状、大きさ、強度、膨潤性など、③長期間連続使用できる安定性を有すること一固定化酵素の充填、取り出し回数が少ないという利点、④単位容量、重量当りの活性が大であること一反応装置当りの生産性が大になるという利点、さらに⑤溶出成分が無害であることなどがあげられる。

この目標に沿って選ばれ実用化している固定化法としては次のようなものがある。

その一つとしては、固定化酵素として市販が可能な取扱いやすいものである。これは前述したごとくこの酵素が菌体内酵素であり、菌体内で安定な形でしかも作用ができるということから生菌体自体を固定化する方法で、固定化微生物と呼ばれるべきかもしれないが能力としては glucose isomerase としての働きのみであるからやはり固定化酵素と呼びたい。この方法としては、架橋剤、吸着剤や凝集剤、高分子有機物などを用いて菌体凝集物を製造し、適当な手段で適当な形状に整形し、さらに必要とあれば蛋白架橋剤で再処理して物理的強度を増すこ

ともできる。

いずれにしろこれらの方法で製造された固定化酵素は乾燥して保存が可能であり、使用時に基質溶液中に分散して十分に膨潤、脱気をして使用することができるので、商品として常温流通が可能であり、取扱いも容易であり、優れた性能を有し、コスト的にも生菌体時代よりもはるかに安くなり、今日では大部分の異性化糖メーカーが酵素メーカーから購入して使用している。

他の方法としては、菌体より酵素を抽出し、適当な吸着剤に吸着させて固定化する方法であり、使用時に調製することが原則となるので酵素メーカーの仕事にはならない。吸着剤としては、DEAE セルロースを用い薄層多重層を用いる方法、イオン交換樹脂、多孔性ガラスを用いる高層の固定床式の方法などがある。これらのなかには酵素の脱着が可能で酵素活性が低下すると再生使用ができるものと、再生使用できない吸着剤もある。また異性化反応が微アルカリ性で行われるためにガラスは成分的に問題があると思われる。いずれの吸着剤を用いる場合も酵素は精製し濃縮されたものを用いる必要がある。

4. 固定化酵素による連続異性化

ここでは一般論として市販されている固定化酵素を用いる方法についてのべる。

反応塔は高層の充填塔方式が用いられている。大別して固定床式の下降法と、移動床式の上昇法がある(4工場)。

操作はいずれも反応塔出口の異性化率が一定になるよう(42～43)に通液速度と温度を調整している。したがって酵素が新しく活性が高い時は流量が大で、古くなるにつれて減少する。この日間の生産量の変動をできるだけ少なくする手段として、下降法の固定床式では数十の反応塔を任意に連結するようにし、メリーゴーランド方式を採用している。すなわち、新しい糖液が最も長期的使用している第一塔に入り、出口が最も新しい酵素の充填された反応塔になる。変動率を少なくするためには反応塔の数を増せばよいが、最も一般的なものは三塔メリーゴーランド式である。新酵素の充填は20～30日ごとに行われる。変動率をより少なくするためには反応温度を組合せる。すなわち新酵素充填直後はやや低い温度(55℃)で始め徐々に高くし、交換直前には62℃くらいとする方法がとられている。

反応塔の大きさは直径 1～1.5m、充填高さは 1.5～3.5m である。均一な充填という点からは直径 1.2m 以下が好ましく、それ以上の時は充填時に十分な配慮が必

要である。

固定化酵素は球状または短円筒状の乾燥品で、径は1~1.5 mm、長さ1~3 mmのものであるが、使用に先立って、3.5重量倍以上の基質溶液(40~50℃)のなかに分散してゆるく攪拌して沈降を防ぎながら約1時間処理をして、膨潤と粒内の脱気を充分に行ってから充填する。反応塔にはあらかじめ適量の基質溶液を蓄えておき、このなかへ酵素懸濁液を空気に触れずに流し込んで充填する。充填時に空気を巻き込まないように、そして密度が平均化するように操作しなければならない。このことはあらゆるクロマトグラムに共通の技術であるが、とくに糖濃度が45~50%と高いために一度巻き込まれた気泡は容易に逃げ出せずに酵素粒の間に残存する。この部分はたとえわずかでも基質溶液が流れないために酵素作用を発揮できないのみならず、その部分は極部的にpHが変化して失活の原因となる。そして操作を続けていくうちに気泡が徐々に上方へ移動し、気泡同士が集合して大きな空間に成長する。そうなるとその部分の酵素粒は変圧を受けて変形しお互いにより密着する形となり、ブロッキングを生じ、液の流れは均一なプラグフローとならず偏流が始まる。それに伴う偏圧がますますブロッキングを促進し、それが原因で亀裂が生じて、ショートパスが起こり突然流出液の異性化率が低下する。基質溶液が層流下全酵素粒と接触しながら流れることで、全酵素活性が利用されているので、偏流が生ずると利用されていない部分が生じ、その割合だけ生産性が低下する。また基質溶液が流れない部分は、極部的にpHが変動する可能性を否定できない。したがって酵素の失活に伴う亀裂を生じたために全部とり出して再充填したのちの活性が異常に低いのもこの原因によると考えている。

こうした経験は工業化実施のごく初期の段階においてなされたものであるが、実験室におけるクロマトのためのカラムを調整する時の注意と原理的には同一である。

次に上昇法による移動床式と称する方法は1本の主反応塔が、固定床式の複数の反応塔に相当し、ある一定間隔ごとに(たとえば数日~10数日)、主反応塔の下部より最も古い酵素を一定量抜き出すとともに反応塔の上部の補給槽から新しい酵素を同じ量充填する。基質溶液は反応塔の下部より上部へと流れるから、前の方法同様に新しい基質が最も古い酵素に触れ、逐次新しい酵素に触れ、最終は最も新しい酵素で反応されることになる(オルガノ(株)の特許)、特長として一つの主反応塔で任意の間隔と量で充填、取り出しができて日間の生産量の変動率を少なくすることが容易である。

また上昇法であるためにカラム内の酵素粒の密度は下降法よりもやや粗である。

この場合の酵素の充填方法も全く前記と同様の注意が必要である。そのために充填操作時に酵素懸濁液の補給槽と主反応塔とを、注ぎ込むパイプの間を含めて基質溶液で充滿させておいて、湿潤酵素が空気にふれることなく主反応塔の基質溶液中へ注ぎ込まれるようにしなければならない。

主反応塔の直径は0.6~1.2mで高さは4.5~5.5mは必要である。

異性化反応条件はいずれの方法もほぼ共通しているが、温度、pH、基質濃度および基質の純度が、初速度と寿命、生産性に大きな影響を与える。ここでいう生産性(productivity)とは1gの酵素が1回の連続使用で何gの基質を果糖化率42%まで異性化しうるかということで表している。

反応速度は単位時間当りの生産量を示すことになる。したがって生産性は反応速度と寿命の積として表れた結果である。

温度とpHは60℃、8.0を標準と考えているが、pHを8.0とすると反応速度は105%となるが生産性は失活が早く70%と低下する。pH 7.8で反応速度はわずかに低いが生産性はやや高くなる。pH調整に要するアルカリ量、脱塩の負荷量を考えるとpH 8.0以上はさけて、pH 7.8を標準とすべきである。

また温度はさらに大きく影響する。55℃にすると反応速度は70%くらいになるが生産性は112%と上昇し、さらに50℃では反応速度は50%でも生産性は128%となる。逆に高温は65℃で、速度は150%になるが生産性は83%、62℃で93%に減少する。したがってランニングコストを重視するならば、アルカリ使用量、脱塩時の負荷量および酵素の生産性からpH 7.8、55℃くらいが適している。そして需要の変動に対応するためには温度により反応速度を調節することができるが、低温になると微生物の感染の危険が生ずる。操作可能最低温度は、装置と基質溶液のサニタリーの程度で支配されるが、50℃の実施例もある。

基質の純度の影響が連続反応において見逃がすことのできない大きな問題である。

生酵素による回分式の場合でも当初糖化液を一度活性炭、イオン交換樹脂で精製したのち異性化し再度同じ工程で精製を繰り返すことはコスト的に大きな負担であるから、糖化液を直接異性化し、精製工程を一度ですますとしたが、果糖生成率が悪く結果として精製したのち

異性化することが必須条件となった。

固定化酵素による連続異性化の場合も基質の純度が著しく影響することが明らかである。結晶ブドウ糖を溶解したものを基質とした時の生産性を 100 とすると、市販の各社の精製ブドウ糖(分密せず全部を固形化したもの)を基質として比較すると 43~67% であった。この精製ブドウ糖をさらにイオン交換樹脂で精製すると結晶ブドウ糖の結果に近づくことから、精製ブドウ糖中に含まれている不純物の影響であることは疑いない事実である。その本体についてはまだ明らかにする研究は進められていないが、基質溶液の紫外外部吸収 (275 nm) 度と関係のあることはわかっている。

シリカゲルクロマトで分離した各区分について調べた結果、260~280 nm に強く吸収を示し、コロイド状のポリフェノール、含窒素化合物と思われる区分が反応阻害を強くすることが明らかであり、アンバーライト IRA-938 のような孔径の大きい強塩基性樹脂によく吸着除去されることも明らかである。

生産性のことを考えると、糖液の精製は単なる脱色、脱塩のみではなく 275 nm 付近に吸収を持つ物質の除去を尺度に入れて考えねばならない。筆者らは、糖液精製の標準として、比抵抗が 205 Ωcm 以上で、10% w/w 溶液を 10 mm のキューベットで、275 nm の吸収を測定した時の O. D. が 0.1 以下 ($E_{10\%, 10\text{mm}}^{275\text{nm}} = 0.1$ 以下) であることとしている。

5. 残存するオリゴ糖について

澱粉濃度が充分希薄な条件では、グルコアミラーゼは澱粉を 100 % 分解するが、実用的な条件は濃縮に要するコストを考慮してできるだけ濃厚な条件である 30 % w/w 以上である。

最終糖化液の糖組成は約 92~3 % のグルコースと他は 2 糖類を主体とするオリゴ糖が 6~8 % 含まれており、見掛け上の糖化率は DE (Dextrose Equivalent) と呼ばれ約 97% である。この残存するオリゴ糖の 6~8 % の幅については製造工程の差のみならず分析法の差でもあるが、いずれにしる澱粉の酵素糖化技術の上において残された大きな問題の一つである。

しかしながら従来の製造技術では、経済的効果と併せて考えてあまり積極的な努力を払っていなかった。

今年に入ってから、先に貝沼先生からもご紹介のあった第 2 世代の異性化糖と呼ばれる果糖濃度の高い商品が、イオン交換樹脂を用いた液体クロマトグラムの原理応用によって市場化されるに及んで、オリゴ糖残存率を減少

させる技術が必要になっていた。

通常の異性化糖は、糖組成として果糖 (F) 42~44, ブドウ糖 (G) 50~52, およびオリゴ糖 (OS) 6~8% である。このものを F と G に対する吸着特性の異なるイオン交換樹脂カラムを通し、さらに水にて押し出すと、F 80%, G 17%, OS 約 3 % が主組成の果糖区分と、G 83%, F 8%, OS 9 % が主組成のブドウ糖区分とにわかれて流出する。果糖区分は通常の F 42 の異性化糖と約 1:2 で混合するとフルクトース 55% (F 55) の高果糖異性化糖が製造できる。このもののオリゴ糖量は F 42 のオリゴ糖含有が 8 % の時は約 6.3 % となり 6 % の時は 5 % となる。ある需要家は F 55 のオリゴ糖含量を 4.5 % 以下にするように要求している。

ブドウ糖区分は再度異性化工程および F/G 分離工程を経過するたびにオリゴ糖含有率は高くなっていくことになる。

異性化糖中に存在するブドウ糖と果糖以外の糖の生成については次のケースが考えうる。

- 1) グルコアミラーゼの逆反応によって、生成したブドウ糖が縮合してイソマルトース、その他を合成する—この反応は糖濃度の高い時に必要量の酵素量があれば生ずる。
- 2) α -グルコシダーゼが共存する時はその転移作用で、マルトースからイソマルトース、パノースなどが生成する。
- 3) マルトースおよびオリゴ糖の還元末端のグルコースが異性化され、グルコアミラーゼ作用後もマルチノースとして残存する。
- 4) グルコアミラーゼにとって難分解性の分子が残る—多分岐分子、リン酸結合など。

- 5) フラクトースの epimerization による psicose 生成。

1) のケースはグルコアミラーゼの特性であり、マルトースも合成されるがこれはまた分解される。productive な結合様式と nonproductive な結合様式のチャンスが半分半分のためか、また分解と合成の平衡のためか完全分解は難しく通常 1~1.5 % 残存する。イソマルトースは一度生成すると全く分解できないと考える方がよく通常の含有量は 1.5~2.5 % である。

Asp. niger のグルコアミラーゼを使用する時は糖化温度をやや高く 60~62°C とし、使用酵素量を *Rhizopus* 起源の場合よりも少し減少しないと糖化の終末において分解すべき基質が少なくなった状態で時間が経過すると逆反応のみが営まれてイソマルトース量が増加する。このことは先の演者の天野氏が両者のグルコアミラーゼの安

定性の面から詳しく説明されたごとくである。

このことはまた固定化グルコアミラーゼを用いる場合にも同じ注意が必要である。すなわち固定化酵素カラムを通液して反応させるということは、通常の糖化条件に比べて、酵素濃度が100倍以上高い条件である。したがってかなり低いグルコース溶液を基質とした時でも流速がおそいと逆合成反応が認められる。

たとえば25%のグルコース溶液を、固定酵素 1g 当り毎時 1 ml 通液すると、グルコースの濃度は92%に減少しイソマルトースは6%近くになる。流速を10倍にしてもやはり1%近くのイソマルトースが検出される。

各種の固定化グルコアミラーゼを用いた実験で見かけの糖化度を比較したのみでは意味がなく、残存するオリゴ糖を分析して使用条件を判断しなければ実用的には全く無意味といえるであろう。

固定化グルコアミラーゼの実用化の場合は、液化液を通常の方法で糖化し、50~80%のグルコース生成率に達したのち、この糖液を逕過精製したのち固定化グルコアミラーゼのカラムを通液することが必要である。この場合に見かけの糖化度のみを考えて流速をおそくするとイソマルトースの量が増加し、このものはもはや分解不可能な基質である。一方、流速をはやくすると未分解のオリゴ糖が残存する。この未分解で残るオリゴ糖はグルコアミラーゼ作用を受けがたいもので、多分1分子中に α -1,6結合が2個以上存在するか、リン酸がエステル結合しているなどが原因と考えられる。

そうだとするとこれらの α -1,6結合やリン酸エステルを分解する酵素を組合せて使用すれば、グルコアミラーゼによる加水分解が容易に進行するから高いグルコース生成率に達すると同時に反応を停止するか、またはグルコアミラーゼ活性を弱くすることで逆反応を防止することが可能なはずである。

α -1,6結合に選択的に働く、いわゆる枝切り酵素はいくつかの種類が知られているが応用についての実用例やその報告は案外と少ない。

米国の A. E. Steley Manf. Co. は昭和44年に一つの日本特許出願をしている（優先権主張は 1968. 8. 26, 公告-1979. 9. 25), 特許請求の範囲は、「希薄澱粉水解物をグルコアミラーゼとアミロ-1,6-グルコシダーゼからなる酵素系で、pH 5.0~6.7 のグルコアミラーゼの可逆作用を抑制するような pH で糖化することからなるデキストロースの製造法」である。

アミロ-1,6-グルコシダーゼと記載しているが内容は EC 3. 2. 1. 33 のことではなく、プルラナーゼ [EC 3. 2.

1. 41] を用いた実験で命名法を誤って混同しているようである。審査官の拒絶に対して pH を 5.0~6.7 と限定することで公告されている。pH 5.0~6.7 でグルコアミラーゼの可逆作用が抑制されるという直接的な証明はなく、この pH は加水分解の最適から外れており、当然のことながら分解も逆合成も弱くなる条件であり、またプルラナーゼにとっては公知のごとく 5.8~6.2 が最も作用しやすい条件であり、全く特許性は認められない出願である。

プルラナーゼは分岐点からグルコース 2 個以上の長さの側鎖が伸びておれば切断できるが、イソアミラーゼ [EC 3. 2. 1. 68] は分岐点よりの側鎖の長さがグルコースとして 3 個以上なければならない。そしていずれもグルコースが 1 個になると枝切りができない特長がある。したがってグルコアミラーゼと枝切り酵素を用いる時は、それぞれの酵素作用の特性をよく知り、酵素濃度、作用条件 (pH, 温度) の組合せをよく考えて使用しなければならない。グルコアミラーゼ活性が先行すると分岐が切断しがたくなったり、また逆に枝切りが先行しすぎると直鎖分子の老化問題も考えねばならない。いずれにしろこのあたりの周辺技術はまだまだ明らかにされていない。

通常の糖化条件では糖化率80%くらいまでは直線的に伸びるので、その時の糖液について、ペーパークロマトグラム上で未分解のデキストリンのスポットに各種の酵素を作用させて、その分解を発色度の差から判定して有効な酵素をスクリーニングすることが試みられている。

理論的にはイソアミラーゼの方が基質特異性が厳しいのでプルラナーゼの方が利用しやすいように思える。

次に 2) の α -グルコシダーゼのケースについては *Rhizopus* 起源の時はまず転移作用をもった酵素の生産は考えられないが、*Asp. niger* 系では同時に生産されることが多いので完全に除去して用いることが必要である。

とくに固定化して用いる時はよほど慎重に除去しておかないとフリーで用いて大丈夫であるという微量の存在でも大きく影響する。最初マルトースから生成するパノースはやがてグルコアミラーゼによって分解される。

3) の還元末端のグルコースの異性化に伴うマルチュロースの生成は、古くから参松工業の頼富氏から指摘され澱粉科学ハンドブックにも多い時には0.5%にも達すると記載されている。

最近、超耐熱性の α -アミラーゼで98~102℃で液化し、135℃, 7分間の加熱処理、98~100℃での2段液化という条件で液化している工場の、糖化液、精製後異性化に

入る前、異性化後および最終製品の 4 点について、ウォーターズの Bondapak CH カラムで定量したところ、4 つのサンプルについてはほぼ同じような値でマルチユロースが含まれており (3 %弱) イソマルトース、マルトースよりも高含有量であることを認めた。このカラムは少し使用するとマルチユロース分離性能が悪くなるようであるが、いずれにせよ生成の原因は液化時にあることは確実である。

ペーパークロマト法によって分離し、切り抜いてシステインカルバゾール法で定量して確認されたが、液化時の条件として pH 5.5 と 6.5 では約 2.7 倍、同じ pH で 90 °C と 98 °C とでは約 2.3 倍の生成が認められた。

このことはマルトース溶液を同様の条件で加熱処理することによっても確かめられている。対策としては、液化温度 90~92 °C、pH は 5.5~6.0、加熱処理の時間をできるかぎり短くすることなどが重要である。

従来はこの問題をあまり重視しなかったために、単に液化液の汙過性とたとえ澱粉 1 kg 当り 10 銭でも酵素代を安くしようということで液化条件が選ばれたが、考えなおさねばならないことである。

なおマルチユロースは醋酸エチル・醋酸・水の 3:3:1 の溶媒で、上昇法を 3 回繰り返すと、マルトースの上に分離するが (大崎氏) マルトースよりも発色しがたく、通常の硝酸銀浸漬法のあとアルカリ性エタノールを噴霧したのでは発色せず、アルカリ試薬に浸漬しスポットの強度が最高になったのを確認してから定着液に浸漬する必要がある (澱粉科学実験法)。

4) のケースについては、枝切り酵素やホスホリラーゼの応用について 1) のケースでのべたとく、これらの酵素を固定化して反応機構に適合したような使用方法—kinetic control—を研究すべきと考えている。

5) の epimerization による psicose の生成は生菌体による回分法の場合には異性化反応中に生成が認められたが、固定化酵素による連続化によって反応時間が短縮されたので著しく少なくなつてほとんど検出されない。

ただ異性化液の精製時のアニオン交換樹脂処理の樹脂の種類と処理条件によって生成する可能性はある。

む す び

現在の筆者は研究や生産などの技術を直接担当する立場ではないが、話をする機会を与えられたので営業上の経験と、酵素の利用をライフワークと考えている立場上から得られた情報をもとに、異性化製造工業の技術的問

題をとりあげてかなり勝手な推理による仮説をご報告したしだい、今後これらの仮説が研究者の皆様の手で立証され対策が生まれてくれれば産業界にとっては有意義なことと思います。常に情報を提供くださったり、実験を引き受けていただいた当業界の皆様にあつく御礼を申し上げます。

【質問】

東大 中村

1. 最後に紹介されたアメリカの特許で使っているのは amylo-1,6-glucosidase という風に聞きましたが、これは一般的に枝切り酵素ということでしょうか?

2. 古い文献ですが、グリコーゲン中にフルクトースが存在するという報告があります。グルコースは熱い濃アルカリで組織を消化して作っているわけですから、多糖のレベルで末端が異性化するのではないのでしょうか。

【答】

1. 請求範囲は amylo-1,6-glucosidase ですが内容は枝切り酵素です。

2. ありがとうございます。この点是不破先生も以前にご研究になられたと思います。

【コメント】

大阪市大生活科学 不破

マルトースのアルカリ異性化でマルチユロースの生成は 20 %程度が今までの最高収量で、さらに大きな maltotoligosaccharide や dextrin の末端が ketose となるのはかなり困難であることが予想される。しかしグルコース生産の前段階としての澱粉液化のように高濃度、高温度で pH が中性に近い時は起こりうる可能性は十分ある。

【答】

コメントありがとうございます。ここで問題にしている量はわずかに 2~3 %以下の量であります。

【質問】

大阪市立工研 岡田

異性化糖工業は大きな産業になったが、そのなかで使用するグルコアミラーゼは今なおパッチ法である。この段階での固定化を考えると、グルコアミラーゼは maltose への作用が弱いので、maltase 力の強い α -glucosidase の方が適しているように思える。しかし α -glucosidase は全くといってよいほど転移する。転移作用のない α -glucosidase の存在の可能性はあるか。

【答】

全くお説のとおりであります。逆合成反応のないグルコアミラーゼや、転移作用のない α -グルコシダーゼがあればと常々思っております。