総 説

マルトオリゴ糖の生産とその利用

小林 昭 一*

Production and Application of Maltooligosaccharides

Shoichi KOBAYASHI

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries
(2-1-2, Kannodai, Tsukuba 305, Japan)

Maltooligosaccharides (G_3 - G_6) have been used as reagents for research and clinical reagents for the determination of serum amylase activity. G_5 has been used as a nutrient for calorie deprivation. G_5 as well as G_3 , G_4 , and G_6 are all highly soluble and produce clear viscous solutions which are palatable. Therefore, these compounds may potentially be of use as superior nutrients for infants and the aged. The price of pure maltooligosaccharides is, however, extremely high, because of the difficulties encountered in producing each in a pure state.

Several reports have been published on the production of G_2 , G_3 , G_4 , G_5 , etc., from starch. G_2 production from starch has been widely studied using plant β -amylases; G_3 -forming amylases were discovered in various bacteria.

Among the maltooligosaccharide (G_3 - G_5)-forming amylases, it was reported that a G_4 -forming amylase was produced by *Pseudomonas stutzeri*, but no other bacteria which would produce G_4 -forming amylases have yet been reported. *Pseudomonas saccharophila* was found to produce that enzyme. Detail on this enzyme will be reported in this journal in the near future. G_5 -forming amylases and a G_5 -producing bacterium were reported to form mainly G_5 , with considerable amounts of other oligosaccharides such as G_6 , G_7 , G_2 , G_3 , and G_4 , during the reaction and cultivation. The authors tried to find a novel enzyme which forms G_5 , without any other saccharides at some stage of the reaction. A novel microorganism which produces such an enzyme has been discovered.

1. はじめに

マルトオリゴ糖とは澱粉由来の、グルコースが2~10個結合した糖である。通常の澱粉は直鎖状のアミロースと、樹状構造のアミロペクチンの二成分を2:8の割合で含む巨大分子である。また、アミロースはグルコースが数千個 α -1,4 結合した高分子糖、アミロペクチンはグルコースが2~3百万個結合したもので、この結合の中の4%が α -1,6 結合、他は α -1,4 結合である。したがって、澱粉の分解によって生成される糖類の種類は多く、

α -1,4 結合のみの直鎖型マルトオリゴ糖ではマルトース (G_2)、マルトトリオース (G_3)、マルトテトラオース (G_4)、マルトペンタオース (G_5)、マルトヘキサオース (G_6)、マルトヘプタオース (G_7)、マルトオクタオース (G_8)、マルトノナオース (G_9)、マルトデカオース (G_{10}) があり、アミロペクチンの分岐部分から得られ、分子内に α -1,6 結合をもつ分岐型マルトオリゴ糖としてはイソマルトース、パノース (グルコシル-マルトース)、グルコシル-マルトトリオースなどがある。

従来の澱粉加水分解物である水アメ、粉アメ中には、これらのマルトオリゴ糖が混合した状態でグルコースとともに含まれており、水アメ、粉アメは主として製パン、

* 農林水産省食品総合研究所 (305 つくば市観音台 2-1-2)

表 1. 各種マルトオリゴ糖生成酵素

酵素産生菌名	生成糖	酵素産生量 (IU/ml 培養液)	発見者 (年)	文献
<i>Streptomyces griseus</i>	G ₃	5.5	若生勝雄ら (1978)	1)
<i>Bacillus subtilis</i>	G ₃	<1	高崎義幸 (1985)	2)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	G ₄	3.6	J. F. Robyt and R. J. Ackerman (1971)	3)
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	G ₄	13.2	桶本 尚ら (1985)	4)
<i>Bacillus circulans</i>	G ₄ と G ₅	0.5	高崎義幸 (1982)	5)
<i>Bacillus licheniformis</i>	主として G ₅	—	斉藤成正 (1973)	6)
<i>Bacillus cereus</i>	主として G ₅	0.5	吉儀尚浩ら (1985)	7)
<i>Pseudomonas</i> sp.	G ₅	8.4	小林昭一ら (1983)	8)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	G ₆	0.2	貝沼圭二 (1971)	9)
<i>Bacillus subtilis</i>	G ₆	—	J. F. Kennedy and C. A. White (1979)	10)
<i>Bacillus circulans</i>	G ₆	<0.1	高崎義幸 (1982)	11)
<i>Bacillus circulans</i>	G ₆	1.1	谷口 肇 (1981)	12)
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	G ₆	1.1	林 隆哉ら (1988)	13)

製菓、酒造、健康食品などの用途に利用されてきた。

また、G₂ については、単品または G₂ を主として含む糖製品が植物起源の β -アミラーゼを用いて大量に生産されている。しかし、G₃ 以上では、これまで、これらのおおのを効率的、特異的に生成する酵素がなく、その生産が困難であったために実用化が遅れていた。

最近、マルトオリゴ糖を特異的に生成する微生物起源の酵素が表 1 のように次々に発見され、特定のマルトオリゴ糖を主として含む製品およびマルトオリゴ糖純品の実用化が進み、NSK (G₃~G₇ までの純品、日本食品化工製)、ファイントースおよびオリゴ #450 (G₄ を主成分とする水アメ、林原製および日本食品化工製)、オリゴトース (G₃ と G₂ をおおのおの 45.5%、33.8% 含む粉アメ、三菱化成食品など三社共同開発)、イソマルト 500 およびバイオトース #50 (イソマルトースほか、 α -1,6 結合をもつオリゴ糖を 50% 以上含む水アメ、昭和産業および日本食品化工製) などの商品が次々に市場に出されている。

マルトオリゴ糖の研究開発がこのように精力的に進められてきたのは 1973 年以降であり、G₃ 以上のマルトオリゴ糖単独で用いた場合の優れた特性への期待感が高かったからであろう。G₅ が血中 α -アミラーゼの測定に用いられ、疾病診断に利用されて以来、一般の関心がさらに高まり、用途開発が活発に行われてきた。

2. マルトオリゴ糖の性質とその利用

これまで純品が大量に得にくかったため、性質についての知見は多くはないが、吸湿性については、Donnelly らが定性的に検討し、相対湿度 90%、各種温度における吸湿順位は、

$$24^{\circ}\text{C} \quad \text{G}_3 > \text{G}_4 > \text{G}_5 = \text{G}_7 > \text{G}_{11} > \text{G}_2$$

$$30^{\circ}\text{C} \quad \text{G}_3 > \text{G}_4 = \text{G}_7 > \text{G}_5 > \text{G}_6 > \text{G}_{11} > \text{G}_2$$

$$38^{\circ}\text{C} \quad \text{G}_3 > \text{G}_4 = \text{G}_5 = \text{G}_7 > \text{G}_8 > \text{G}_{11} > \text{G}_2$$

であり、G₃ の吸湿性が最も高いことがわかっている¹⁴⁾。

このほか、比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$) がグルコースの +53, G₂ の +129~+130 に比較して高く、G₃~G₁₀ では +159~+197 の範囲内であり、酵母による資化性では、グルコース、G₂ はよく発酵されるが、G₃ はやや発酵されにくく、G₄ 以上はまったく発酵されない。この酵母資化性を利用してマルトオリゴ糖混合物からグルコース、G₂ を選択的に除去することができる。

さらに、マルトオリゴ糖の体内での利用性が高いことも知られている。Martin は ¹⁴C でラベルしたグルコース、蔗糖および G₃ をラットに経口投与し、時間経過による呼気炭酸ガス中の放射能を測定しておおのの体内での利用性について検討し、グルコースに比較して G₃ の利用性は著しく高く、蔗糖と同等以上であることを示している¹⁵⁾。

また、Birch らは DE 43 の水アメをアルコール分画し、G₇ 以上のマルトオリゴ糖 (G₇-) と G₆ 以下のマル

トオリゴ糖 (G_{-6}) の区分に分け、グルコースを対照としてラットに与えて体重の変化および脂肪量の変化等について検討した結果、脂肪および体重増の順位は $G_7 > G_{-6} >$ グルコースであると報告している¹⁶⁾。

これらの実験結果から、高重合度糖ほど体内での利用性が高いことがわかるが、 G_7 以上のマルトオリゴ糖の生産は、その生成酵素が見い出されていないので、現段階では困難である。実用的には酵素の特異性が高く、生産が容易な G_4 生成酵素、 G_5 生成酵素が用いられ、 G_4 製品、 G_5 製品が今後ますます活発に商品化されると思われる。

最近日本食品化工(株)のグループが $G_3 \sim G_{10}$ までの高純度マルトオリゴ糖を調製し、その性質を詳細に検討している。

1) 甘味度

蔗糖の甘味の強さを 100 としたときの各種マルトオリゴ糖の甘味の強さ (甘味度) は図 1 に示すように、重合度の増加とともに甘味度は減少し、 G_4 以上ではほんのかな甘味を感じる程度で、しかも味質は良好で食べやすい。

低甘味性は食品素材の性質として有用であり、各種食品へ混合してもその食味に悪影響を及ぼさず、しかも多量に使用できるので有利である。

2) 粘 度

図 2 は各種マルトオリゴ糖の固有粘度を示したものであるが、 G_3 以上と G_2 以下では明確な差があることがわかる。 G_2 の粘度特性は蔗糖のそれと同等であることから G_3 以上のマルトオリゴ糖はきわめて高粘性であることが知られ、ボディ感を要する食品へは効果的に利用できる。

図 1. 各種マルトオリゴ糖の甘味度
日本食品化工(株), 三輪泰造, 中久喜輝夫原図。

図 2. 各種マルトオリゴ糖の重量固有粘度測定図
日本食品化工(株), 三輪泰造, 中久喜輝夫原図。

図 3. 各種相対湿度におけるマルトオリゴ糖の平衡水分 (25℃)

日本食品化工(株), 三輪泰造, 中久喜輝夫原図。

3) 保 湿 性

図 3 は 25℃ における相対湿度と各種マルトオリゴ糖の平衡水分の関係を示したものであり、 G_3 以上と G_2 以下では明確な差がある。この性質は、水分保持を要する食品への用途に適している。

このようにマルトオリゴ糖の物理的性質は、 G_3 以上と、 G_2 以下とで一線を画した明らかな差異がある。

4) 水分活性

水分活性は食品の保蔵に重要な役割を果たし、たとえば、0.95 以下ではグラム陰性桿菌の発育が停止し、乳酸

桿菌などの細菌が優勢になる。0.88 以下では細菌と酵母の発育は停止するが、カビは生育できる。しかし、0.80 以下では耐乾性カビ以外は生育できず、0.7 以下では微生物は生育できない。したがって、低い水分活性で保蔵すれば室温でも微生物的劣化を起さず、長期間、食品品質を保持することが可能である。そこで、水分活性を低く抑えることができ、低甘味である糖の開発が要求されている。

水分活性 (A_w) は P/P_0 (P : 水溶液の蒸気圧, P_0 : 純水の蒸気圧) と表され、溶質が抱き込める水分子が多いほど A_w は小さくなる。しかし、グルコース, G_2 , G_3 , G_4 と重合度が増すにしたがって、糖濃度 70%, 20 °C での A_w は 0.75, 0.82, 0.89, 0.915 のようになり、マルトオリゴ糖で静菌効果を発揮させるにはかなり高濃度の糖液を必要とする。

5) 機能性

最近、健康指向が強まり、健康維持よりさらに前進した、体内機能の増進、調整用食品素材としてのマルトオリゴ糖の研究が推進されてきた。たとえば、 G_4 は *Bifidobacterium* などの有用菌の増殖効果は示されないが、有害菌である *Clostridium perfringens* などの腸内腐敗菌の生育を特異的に抑制することが知られ¹⁷⁾、さらに、植物病原菌の一種である *Erwinia carotovora* に対して抗菌性を示し、抗菌活性は G_4 を 100 としたとき、グルコースで 0, G_2 で 8, G_3 で 105, G_5 で 75, G_6 で 40 とした報告例がある¹⁸⁾。今後これらの効果について多くの研究が行われ評価されれば、機能性食品素材として一般に受け入れられるであろう。

このほか、加熱による着色、アミノ酸との褐変反応も、グルコース、蔗糖に比較すればかなり起こりにくく、着色を好まない食品に利用できる。

以上述べたような性質からマルトオリゴ糖の用途は多岐にわたり、たとえば、表 2 のような用途が考えられる。

さらに特殊な用途としては、病人、高齢者、幼児への滋養食としての利用も考えられ、すでに平均重合度 5 のマルトオリゴ糖を腎臓病患者のカロリー源として用い、効果があるとした報告もある¹⁹⁾。

G_5 の臨床検査用試薬への応用はまったく新しい使い方であり、血清 α -アミラーゼ活性の測定により、急性膵炎他種々の病態の診断ができるので、その利用価値は大きい。

3. G_5 を用いた血中 α -アミラーゼの測定²⁰⁾

原理は、

のように、 α -グルコシダーゼ、ATP、ヘキソキナーゼ、 Mg^{2+} 、NAD、G-6-P デヒドロゲナーゼを混合した共役酵素系から成り立っている。

すなわち、 α -グルコシダーゼは G_5 には作用せず、 G_2 と G_3 には作用してグルコースにまで分解できるので、血中の α -アミラーゼが G_5 を切断して G_2 と G_3 にすると共役酵素系が働いて、最終的にはグルコース-6-リン酸と NAD に G-6-P デヒドロゲナーゼが作用してグルコノ- δ -ラクトン-6-リン酸 (GL-6-P) と NADH になる。しかも、NAD と NADH の吸収スペクトルは図 4 のようになり、360 nm の吸収強度は血中 α -アミラーゼの活性と連動するので 360 nm の吸収を測定することにより、定量することができるのである。

表 2. マルトオリゴ糖の用途

用途	食 品 名
コク味付け ボディ感の付与	各種飲料、焼酎、ウイスキー、タレ、ソース、醤油、ケチャップ、ジャム、ドレッシング、 フラワーペースト、カスタードクリーム、ベビーフード、ゼリー等
粉末化基剤	粉末飲料、粉末スープ、粉末調味料、コーヒーホワイトナー、粉末香料等
泣き防止	ハードキャンディー、キャラメル、チョコレート等
褐変、着色の防止	あん、クリーム類、ジャム等
艶だしと皮膜形成	米菓、佃煮、煮豆、水産珍味、海苔加工、キャンディー等
凍結温度の調節	冷菓、アイスクリーム、グレーズ剤、冷凍食品等
日持ち向上	和洋生菓子等

図 4. NAD および NADH の吸収スペクトル

4. マルトオリゴ糖の生産とマルトオリゴ糖生産用酵素

マルトオリゴ糖混合物からのおおののマルトオリゴ糖の分離にはカーボンカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過法が用いられ、分離量は少ないが純度は高いので医薬、試薬用純品の調製に適用される。分離用担体としては Biogel P-2, Toyopearl HW-40s などが用いられ、たとえば、サイズ 2.6×100 cm のカラム 2 本を連結して糖濃度 20~30% 液 2 ml を負荷し、20~50 ml/hr の流速で水溶出により、2 日間で G₈ までの純品を数十 mg 得ることができ、実用的にもゲルクロ用大型カラムを用いて高純度マルトオリゴ糖を生産している。このように生産された製品は高価である。食品用には高純度を要しないので、澱粉から単一マルトオリゴ糖を特異的に生成する酵素を利用して、目的のマルトオリゴ糖を主成分として含む糖液または粉アメを製品化するが、イオン交換樹脂などにより主成分を分離、精製して純度を高めたものも容易に生産可能である。

本文では、最も生産量の多い G₂ の生産について述べた後、筆者らが発見した G₄, G₅ 生成酵素について述べる。

なお、マルトオリゴ糖生成酵素活性は 2% 還元可溶性澱粉（メルク社製）溶液 0.5 ml, 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）0.4 ml に希釈酵素液 0.1 ml を加え、30℃ で反応し、生成した還元糖をソモギー-ネルソン法にて定量して測定し、1 分間に 1 μmol のグルコシド結合を切断する酵素量を 1 単位（IU）としている。

1) マルトース²¹⁾

G₂ は主として植物起源の β-アミラーゼと枝切り酵素の混合酵素系を液化澱粉に作用して生産されている。

β-アミラーゼは澱粉成分分子の非還元末端から 2 グルコース単位で切断するが、アミロペクチン分子の枝部分の手前で反応は止まる。したがって枝の内側は β-リミットデキストリンとしてアミロペクチンの 40~50% が作用されずに残る。G₂ の収率を高めるためには枝切り酵素と β-アミラーゼとの併用が効果的であり、たとえば、微生物起源の枝切り酵素、プルラーゼを β-アミラーゼと同時に作用させると表 3 のように G₂ の収率が 67% から 77% にも高まり、しかも G₄ 以上の糖生成率は著しく少ない。枝切り酵素の同時作用によるマルトオリゴ糖収率上昇法は一般に用いられる効果的な方法である。

G₂ 生成率を 90% とするためには、通常の基質濃度 20~40% を 10~20% のように低くし、液化の際の DE を 2 以下の最低に抑え、β-アミラーゼとプルラーゼを同時に作用させて G₃ の生成を減少させる必要がある。

G₂ 含有率 80% 以上の糖化液は結晶化しやすく、また本糖液は全体を粉末化できるので G₂ 粉末製品とすることができる。G₂ 含有率 90% 以上の糖化液からは蒸発濃縮（煎糖）により結晶が得られ、95% 以上の G₂ 液からは、純度 99% 以上の G₂ 結晶が 40% 以上の収率で得られる。

枝切り酵素には、大別して 2 種類ある。アミロペクチンのような長い枝をよく切るイソアミラーゼと、枝の短い基質によく作用するプルラーゼである。

プルラーゼは、*Aerobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus* 属など各種の微生物によって産生され、安定性も高いので G₂ 製造に適用される。

β-アミラーゼは、微生物によっても生産され、これまでにその生産菌として *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* 属などが知られている。しかし、活性が十分でないことと、植物起源の酵素剤が安価であることから、未だ実用化には至っていない。

2) G₄ 生成酵素

G₄ 生成酵素産生菌としては、これまで、*Pseudomonas stutzeri* が知られており、その産生量はマルトオリゴ糖生成酵素のなかでは比較的高く、早くから実用化が考えられていたようである。しかし、菌の特許権の関係もあったのであろうか、その開発は遅れていた。

特許権の失効とともに昨年あたりから開発研究は急速に進み、すでに述べたように、いくつかの製品が市販さ

表 3. プルラーナーゼ/ β -アミラーゼ混合割合と生成糖組成

プルラーナーゼ U/100 g	β -アミラーゼ U/100 g	DE	糖 組 成 (%)				
			グルコース	G ₂	G ₃	G ₄ -	発酵性糖
0	25	43.5	1.9	61.6	9.8	26.7	73.3
0	100	51.1	4.0	67.0	12.5	16.5	83.5
50	25	51.5	4.1	72.0	14.4	9.5	90.5
50	100	54.7	3.4	75.0	15.2	0.4	93.6
100	25	52.9	1.5	75.4	15.9	7.2	92.8
100	100	54.2	2.8	77.2	14.6	5.4	94.6

(特許公報昭46-37849)

液化：澱粉濃度，コンス 30%；液化程度，DE 2~5.

糖化条件：pH 5.8, 55°C, 48 時間.

れている.

筆者らは, *stutzeri* のほかにも *Pseudomonas* 属に α -アミラーゼ様酵素を産生する菌株があることに注目し, これらの保存菌株を集めて培養し, 培養液を可溶性澱粉に作用させて生成糖を調べた結果, *Pseudomonas saccharophila* (IAM 1504) が G₄ 生成酵素を大量に産生することを見出した⁴⁾.

炭素源, 窒素源などの各種培地成分について検討した結果から, 最適液体培地組成を; 可溶性澱粉 1%, ポリペプトン 1%, リン酸 1 カリ 0.1%, リン酸 2 カリ 0.28 % を水道水に溶解して pH 7.0 に調整したものとし, 30°C, 2 日間振盪培養, 遠心分離により, 最終 pH 6.8 の高活性粗酵素液 (培養上澄, 最高 14.3 IU/ml の活性が得られている) を得た.

本粗酵素液から硫酸塩析, 透析して透析酵素を得, カラムクロマトグラフィー, コロジオンバッグ濃縮, 再クロマトして活性画分を集め, 精製酵素液を得た. この段階での酵素標品は粗酵素液から 130 倍程度までにまで精製され, しかも回収率が高く 65% 以上である. さらに, ゲル濾過分離を 2 回行い, 最終的に電気泳動で単一バンドを示す精製酵素標品を得た.

本精製酵素標品を用いて, 諸性質を検討した結果, 分子量は 62,000, 等電点 (pI) は 4.7 であった. また, 至適 pH は 6.7 であり, pH 5.5~10.5 で 90% 以上の活性を保持していた.

至適温度範囲は 50~55°C, 温度安定性については, 一定量酵素を終濃度 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中, 終濃度 2 mM 塩化カルシウム添加, 無添加で 30 分処理後, 基質 (還元可溶性澱粉) 終濃度 1% を加えて 30°C, 15 分間反応した結果, 40°C 以下で安定であり, 50°C 以上では急激に失活し, カルシウムの添加により安定性は

5°C 上昇した.

金属イオンおよび各種阻害剤の影響については, 無添加での残存活性を 100 としたとき, Sr²⁺, Mg²⁺, Li⁺ の添加では 114~105 で活性上昇が認められ, Ca²⁺, Rb⁺ では 100~98, Mn²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ では 60~20, Fe³⁺, Cu²⁺, Co²⁺ では 5~1.5, Ag⁺, Hg²⁺ では 0 で完全に阻害された.

クロル第二水銀安息香酸 (PCMB), モノヨード酢酸, SDS, L-システインの阻害剤などを金属イオンと同様にして検討した結果, PCMB で残存活性が 40 以下に低下したが, この阻害は PCMB に含まれている水銀によると推測される. その他のものは阻害が認められなかった.

30°C, pH 7, 基質終濃度 1% の反応条件で, 可溶性澱粉での反応初速度を 100 としたとき, ワキシースターチ, 還元可溶性澱粉, 蠟のグリコーゲン, β -リミットデキストリン (大豆 β -アミラーゼによる分解率 41.7%) ではおのおの 95, 90, 67, 8 であり, プルラン, α および β -サイクロデキストリンにはまったく作用しなかった.

このほか, 生成糖が負の変旋光を示したことから, 生成糖アノマー型は α であることが認められた.

作用様式 基質として可溶性澱粉を用い, 終濃度 1%, 酵素を 5 IU/g 基質に加えて, pH 7, 30°C で反応して経時的にサンプリングしてクロマトグラフィーで検討した結果, 本酵素は反応の全過程で G₄ のみを生成し, スポット原点に留まる高分子糖を残す. アミロースでの G₄ 生成率が 70~80%, アミロペクチンからの生成率が 40% 程度であることから, 本酵素の作用は澱粉分子の非還元末端から進み, 枝の手前で止まると推測される.

各種マルトオリゴ糖への作用は, 二次元ペーパークロマトグラフィーで検討した結果, 反応生成物は, G₅→G₄+G₁, G₆→G₄+G₂, G₇→G₄+G₃, G₈→G₄, G₉→G₄+

表 4. 二種 G_4 生成酵素の比較

	<i>saccharophila</i> 酵素	<i>stutzeri</i> 酵素*
分子量 (SDS-PAGE)	62,000	57,000
等電点 (pI)	4.7	5.3
至適 pH	6.7	6.5
pH 安定性	5.5~11	6.5~11
至適温度	55°C	45°C
温度安定性	<40°C	<30°C
〃 (Ca^{2+} 添加)	<45°C	—
阻害剤	Hg^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}	Hg^{2+} , Cu^{2+}
アノマー型	α	α

*坂野好幸ら：澱粉科学, 29, 131 (1982).

G_1 ……のようであり、還元末端を ^{14}C -グルコースでラベルしたマルトオリゴ糖 (G_n , $n \geq 5$) からは非放射性 G_4 と放射性 $G_{(n-4m)}$ ($m \geq 1$) を生成した。

これらの結果から本酵素は、 $G_1 \sim G_4$ にはまったく作用せず、 G_5 以上では非還元末端から4グルコース単位で切り進む作用様式をもつことが明らかとなった。

以上、*saccharophila* の G_4 生成酵素の諸性質を明らかにしたが、これらを *stutzeri* の酵素と比較すると表4のようになり、分子量、等電点、耐熱性などに差異が認められる。

3) G_5 生成酵素

G_5 生成酵素産生菌としては、これまで *Bacillus licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus* が知られていたが、いずれの菌からの酵素でも、反応の全段階で G_5 以外のマルトオリゴ糖がかなりの量副生し純品を得にくい難点があり、 G_5 のみを生成する酵素の探索が望まれていた。そこで、各地の土壌、食品からアミラーゼ産生菌をスクリーニングした結果、 α -アミラーゼ活性をもつ420点中、 G_4 生成酵素産生菌が4種 (いずれも *P. stutzeri* タイプ)、 G_5 生成酵素産生菌が5種見出された。5種のうち、4種は *Bacillus* 属の従来型酵素産生菌、1種は、新規な菌であることが認められ、同定した結果に基づいて *Pseudomonas* sp. KO-8940 と命名した⁸⁾。

本菌は、グラム陰性、好気性、運動性で1本の鞭毛をもつサイズ $0.5 \sim 0.75 \times 1 \sim 3 \mu m$ の桿菌であり、この他の性質は表5に示すとおりである。

本酵素生産用培地組成、培養条件を検討して、まず、ビーフェキス0.8%、硫酸1.0%、マルトース0.8% (水道水中) の簡単な培地組成を組み立てた。最適培養条件は、500 ml 三角フラスコに pH を8に調整した100 ml の液体培地を入れ、45°C で3日間、200 rpm の振盪であ

 表 5. *Pseudomonas* sp. KO-8940 の諸性質

肉汁寒天培地上での生育	+
肉汁ゼラチン培地	—
リトマスミルク	±
	(わずかにアルカリ性)
生育 pH 範囲	7.5~8.0 (at 40°C)
生育温度範囲	45°C 以下
	40°C (at pH 7.4)
生育食塩濃度	2% 以下 +
	3% 以上 —
脱窒反応試験	+
硝酸塩の還元	+
V-P 反応	—
メチルレッド試験	—
インドールの生成	—
硫化水素の生成	—
クエン酸の利用	+
無機窒素源の利用 (硫酸、硝酸ナトリウム) +	
澱粉の分解	+
オキシダーゼ試験	+
カタラーゼ試験	+
ウレアーゼ試験	—
O-F テスト	—
(グリセリン, アラビノース, グルコース, フラクトース, マンノース, ガラクトース, キシロース, ソルビトール, マンニトール, イノシトール, マルトース, トレハロース, スクロース, ラクトース, スターチ)	

り、本条件下で 8.4 IU/ml の活性をもつ粗酵素液 (培養上澄) が得られた。

本酵素の精製は比較的容易であり、硫酸塩析により、83% 以上の活性を集めることができた。透析酵素を得た

後、DEAE-Toyopearl 650 M のカラムクロマトグラフィーに透析酵素液を負荷して溶出すると、本酵素はまったく吸着されず、大部分の夾雑蛋白が吸着されるので精製分離は著しく容易であり、この段階で比活性は約 40 倍に高まり、回収率も 70% 以上であった。

得られた活性画分をコロジオンバッグで濃縮し、Toyopearl HW-55 s のカラムでゲル濾過溶出し精製酵素標品を得た。

この最終段階での酵素標品の精製度は粗酵素液から 110 倍程度であり、回収率は 43% 以上である。

本精製酵素標品を用いて、諸性質を検討した結果、分子量と等電点 (pI) はおおよそ 72,000, 6.5 で、至適 pH は 6.5, pH 安定性については pH 6.5~9 で 80% 以上の活性を保持していた。

また、培養粗酵素液の至適 pH は 6.5 であるが、pH 安定域は 6.5~10.5 であった。

至適温度は 55°C、温度安定性については、45°C 以下で安定であり、50°C 以上では急激に失活が認められ、温度安定性へのカルシウムの添加効果については、終濃度 2 mM の添加で安定性は 5°C 上昇した。

金属イオンおよび各種阻害剤の影響については、無添加での残存活性を 100 としたとき、 Rb^+ 、 Mg^{2+} の添加では 120~108 で活性上昇が認められ、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Li^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} では 100~92、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} では各 47, 1, Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} では 0 で完全に阻害された。クロール第二水銀安息香酸 (PCMB, 終濃度 0.4 mM)、モノヨード酢酸、SDS の阻害剤などを金属イオンと同様にして検討した結果、おおよその残存活性が 48, 63, 50 のように低下した。

45°C, pH 6.5, 基質終濃度 1% の反応条件で、可溶性澱粉での反応初速度を 100 としたとき、ワキシースターチ、還元可溶性澱粉、蠣のグリコーゲン、 β -リミットデキストリン (大豆 β -アミラーゼによる分解率 41.7%) ではおおよそ 94, 91, 76, 41 であり、プルラン、 α および β -サイクロデキストリンにはまったく作用しなかった。

また、生成糖が負の変旋光を示したことから、生成糖アノマー型は α であることが認められた。

作用様式 基質として可溶性澱粉を用い、終濃度 1%、酵素濃度を 0.1 および 2 IU/ml 反応液とし、pH 6.5, 45°C で反応して経時的にサンプリングしてペーパークロマトグラフィーにより検討した結果、本酵素は反応の初期に G_5 のみを生成し、スポット原点に留まる高分子糖を残す。可溶性澱粉からの生成率が 40% 程度までは G_5

が主成分であるが、反応をさらに進めると高分子糖も減少、同時に G_5 も G_2 と G_3 に分解し、最終的にはほとんどの高分子糖が G_2 と G_3 に変換された。

二次元ラジオオートグラフィーによる検討結果からは、 G_5 生成酵素は以下の順位で作用すると推測される。すなわち、

① G_7 以上の糖分子に最も作用しやすく、その非還元末端から G_5 単位で水解する。

② G_6 以下の糖分子では、還元末端から G_2 単位で水解するか、または非還元末端から G_3 単位で水解する。

③ 澱粉分子の分岐部分もスキップするか、または高分子糖は *endo* 型でも水解する。

④ G_1 , G_2 , G_3 はまったく作用を受けない。

以上述べたように、本 G_5 生成酵素は反応初期に G_5 のみを生成するので、膜反応器により生成した G_5 を連続的に取り出し、高純度製品の大量生産が可能である。また、 G_2 と G_3 混合物の生産も可能であり、とくに、 G_3 の腸内腐敗菌の抑制効果などの機能性については強い関心が持たれ、たとえば、 G_2 と G_3 の混合物をカラム分離、酵母処理などをして、 G_3 を主成分として含む機能性糖質食品素材を生産することができ、さらに、これらとエタノール、その他の食品素材との混合により多様な食品が開発されるであろう。近い将来、 G_5 は実用化される予定であり、 G_3 については活発な開発研究が進められている。

文 献

- 1) 若生勝雄, 高橋親法, 橋本誠二, 金枝 純: 澱粉科学, **25**, 155-161 (1978).
- 2) TAKASAKI, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1091-1097 (1985).
- 3) J. F. ROBYT and R. J. ACKERMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 105-114 (1971).
- 4) 桶本 尚, 小林昭一, 山里一英, 根本芳郎: 日本農芸化学会昭和 60 年度講演要旨集, p. 370 (1985).
- 5) Y. TAKASAKI: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2193-2199 (1983).
- 6) N. SAITO: *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 290-298 (1973).
- 7) N. YOSHIGI, T. CHIKANO and M. KAMIMURA: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2379-2384 (1985).
- 8) 小林昭一, 桶本 尚, 貝沼圭二: 澱粉科学, **30**, 316 (1983).
- 9) K. KAINUMA, S. KOBAYASHI, T. ITO and S. SUZUKI: *FEBS Lett.*, **26**, 281-285 (1972).
- 10) J. F. KENNEDY and C. A. WHITE: *Stärke*, **31**, 93-99 (1979).

- 11) 高崎義幸：澱粉科学, **29**, 145-152 (1982).
- 12) H. TANIGUCHI, M. J. CHUNG, N. YOSHIGI and Y. MARUYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 511-519 (1983).
- 13) T. HAYASHI, T. AKIBA and K. HORIKOSHI : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 443-448 (1988).
- 14) B. J. DONNELLY, J. C. FRUIN and B. L. SCALLET : *Cereal Chem.*, **50**, 512-519 (1973).
- 15) A. F. M. MARTIN and F. G. YOUNG : *Nature*, **215**, 885-886 (1967).
- 16) G. G. BIRCH and I. J. ETHERIDGE : *Stärke*, **25**, 235-238 (1973).
- 17) 菅原正義, 竹内正保, 中久喜輝男, 光岡知足 : 栄食誌, **42**, 123-127 (1989).
- 18) H. KONDO, T. HONKE, R. HASEGAWA, T. SHIMODA and S. NAKAMURA : *J. Antibiotics*, **28**, 157-160 (1975).
- 19) G. M. BERLYNE, E. M. BOOTH, R. A. L. BREWIS, N. P. MALLICK and P. J. SIMONS : *Lancet*, **I**, 689-692 (1969).
- 20) 斉藤成正 : 澱粉科学, **29**, 153-160 (1982).
- 21) 杉本 要 : 「澱粉科学ハンドブック」, 二國二郎監修, 朝倉書店, 東京, p. 450 (1977).

(平成元年 11 月 11 日 受付)