[農化 第37巻, 第4号, p.237~239, 1963]

糖イソメラーゼの利用に関する基礎的研究 (第2報)*

グルコース・イソメラーゼの糖化液及びハイドロールに対する作用

山 中 啓 (香川大学農学部)

昭和37年11月14日受理

第1報⁽¹⁾において、ヘテロ型乳酸菌のグルコース・イソメラーゼを用いてグルコースより転化糖の製造のための基礎的反応条件を設定した。その結果、本酵素の活性には砒素化合物の添加を必要とせず、かつグルコースの濃度は高いほど一定量の酵素によるフラクトースの生成量が大きくなるので、本酵素を現在工業的に行われているでんぶんの酵素糖化液あるいは分蜜液(ハイドロール)に直接作用させることが可能であると考えられた。他の細菌のグルコース・イソメラーゼについては、未だこれら糖液に作用させた報告がない。本報においては各社より提供していただいた糖液あるいはハイドロールに乳酸菌のグルコース・イソメラーゼを作用させた結果について報告する。

実 験 方 法

酵素液：前報と同じく *Lactobacillus brevis* の抽出酵素(硫安 0.45~0.95 で再分割した区分)を用いた⁽¹⁾。

糖の定量：還元糖は Somogyi-Nelson 法⁽²⁾、ケトースはシステイン・カルバゾール反応⁽³⁾、グルコースはグルコース・オキシダーゼによる酸化法⁽⁴⁾により測定した。すなわち糖液を稀釈してグルコースとして約 1 mg/ml とし、この液 5.0 ml に 0.2% のグルコース・オキシダーゼの 1 N 酢酸ソーダ溶液を 0.5 ml 加え、37° で 3 時間振盪した。これを 10 ml の定容フラスコに移し、洗液を合して 10 ml とし、残還元糖を Somogyi 法にて測定した。初めの還元糖量との差をグルコースとした。グルコース・オキシダーゼは長瀬産業 KK のデオキシソを用いた。糖液の試料について、水分、D.E. は測定せず、グルコース対全還元糖の比を算出した。

反応条件：試料の糖液をアルカリで pH を 6.8~7.0 に中和し、これを 4.5 ml とり、M/10 MnSO₄ 及び M/10 CoCl₂ を各 0.05 ml と酵素液 0.4 ml (硫安 0.45~0.95 飽和沈でん、蛋白 24.8 mg/ml, グルコース・イソメラーゼ 195 u/ml) を加えて全容を 5.0 ml とし、50° で反応させた。

実 験 結 果 及 び 考 察

1. 酵素糖化液に対する作用 各社より提供していただいた糖化液の分析値を第1表に示した。これら試料の糖化酵素は大部分がリゾープス系のものを用い、自家培養は2社であった。1社はスミチームを、2社は *Endomycopsis* の自家培養であった。糖化終了液のグルコースは全還元糖の 96~98.6% を示し、糖化法による差はなかった。

これらにグルコース・イソメラーゼを作用させた反応経過を第1図に示し、その結果を第2表にまとめた。糖化液はいずれの糖化酵素によるものでもすべて全く同様にイソメラーゼの作用を受けることが明らかになった。

第1表 糖化液の分析値

試料 番号	試料の調製条件	D.E.*	検糖計 のよみ (%)	直接還元 糖(%) (A)	グルコー ス(%) (B)	B/A ×100 (%)	ケト ース (%)
1	加熱殺菌→濾過	—	32	35.3	34.4	97.5	0
2	" " " "	—	32	34.9	34.4	98.6	0
3	" " →濾過	—	49.6	51.1	50.5	98.6	0
4	" " → "	96.3	44.8	47.3	45.9	97.0	0
5	" " " "	—	27	24.2	23.4	96.7	0
6	" " → "	97.4	30	31.8	30.9	97.3	0
7	" " → "	96.4	39.2	39.2	37.5	95.8	1.0
8	濃縮 " " "	97~98	59.5	70.2	68.2	97.3	0
9	濾過 →濃縮		57	66.9	65.1	97.3	0

* D.E. は各社より提示された数値をそのまま記入した。

すなわち澱粉の液化法はいずれもほとんど同一と考えられるが、糖化方法によってイソメラーゼに対して差は認められない。またこれら試料の反応前後のパークロマトグラムをみると、フラクトースのみが生成されており、オリゴ糖は分解を受けず、にそのまま残存しているものと考えられる。

* Studies on the Utilization of Sugar Isomerases. Part II. Reaction of Glucose Isomerase on Starch Hydrolyzates and their Hydrols.
By Kei YAMANAKA (Faculty of Agriculture, Kagawa University)

第 1 図 糖化液に対するイソメラーゼの作用
図中の番号は試料番号 (第 1 表参照)

第 2 表 糖化液に対するイソメラーゼの作用

試料 番号	反応開始時の グルコース (g)	72時間反応後の フラクトース (g)	異性化率 %
1	1.55	0.82	53
2	1.55	0.78	50
3	2.27	1.10	48
4	2.06	0.94	45.6
5	1.05	0.64	61
6	1.39	0.69	49.3
7	1.69	0.94	55.7
8	3.07	1.60	52.2
9	2.93	1.58	54.0

試料番号 2 及び 3 は同一社で同日に得たものであり、No. 2 の試料は加熱殺菌のみ施され、濾過前の混濁の多いものであるが、イソメラーゼに対して両者の間に全く差は認められなかった。また試料番号 5 及び 6 も同一製品であり、No. 5 の試料は糖化終了液であって殺菌、濾過共に施されていない着色混濁液である。試

料はすべて 1962 年 7 月及び 8 月に提供されたもので、各社で輸送に先立って種々な方法で加熱殺菌が施された。No. 5 は殺菌処理が施されなかったため、輸送中に酸酵し、アルコール臭のあるもので、そのため糖分も少ないものであった。しかしこれに直接イソメラーゼを作用させても、全く異常はなく異性化率はかえって高く 61% を示した。従って糖液にイソメラーゼを作用させる場合、糖化酵素の破壊及び殺菌の目的で加熱操作を行なう必要はないものと推定される。試料番号 8 及び 9 も同一社の製品であるが、これは殺菌の目的で糖化液を減圧濃縮されたシラップであった。前報⁽¹⁾において、一定量の酵素よりフラクトースの収量を上げるためには糖濃度を高くすればよいことを述べたが、この事実は糖化液の場合にも適用される。No. 8 及び 9 の試料の糖濃度はグルコース 65~68% であり、他の試料よりも約 2 倍近く濃縮されている。従ってこのものより得られたフラクトース量も他の試料に比して約 2 倍近く多い。もちろんこの場合も糖化液の濾過の有無は全く無関係であった。

以上の結果より、でんぶんの酵素糖化液に乳酸菌のイソメラーゼを作用させる場合には、異性化反応に先立って糖液を加熱殺菌または濾過する必要はないと考えられる。むしろ糖液は濃縮した後にイソメラーゼを作用させることが望ましい。

2. ハイドロールに対する作用 ハイドロールは通常そのまま販売されているが、イソメラーゼを作用させて甘味度を増して利用することも考えられる。またハイドロールは糖濃度が高くイソメラーゼを作用させるためには好適であるが、他方ハイドロール中にはグルコース以外の成分の含量が高く (D. E. が低く)、糖液の精製のためにアニオン交換樹脂カラムを通してあるためケトースも含まれ、そのままイソメラーゼの作用を受けるか否かに疑問があったので、同様の方法にて検討を試みた。

各社より提供していただいたハイドロールの分析値を第 3 表に示した。反応条件は 1. と全く同様にして、pH を補正したハイドロールを稀釈せず、直接これにイソメラーゼを添加して反応を行なった。その反応経過を第 2 図に示し、その結果を第 4 表にまとめた。ハイドロールに作用させた場合は、フラクトースの生成速度が糖化液の場合に比してかなり遅く、72 時間の反応ではまだ平衡に達しない。特に No. 2 の試料の場合に著しい。この原因としては、液の粘度、反応当初よりフラクトースの混在、糖液中のマルトース、オリゴ糖、デキストリン分

第 3 表 ハイドロールの分析値

試料 番号	D. E. ^{*1}	検糖計 のよみ (%)	比粘度 ^{*2}	直接還元糖 (%) (A)	グルコース (%) (B)	B/A ×100 (%)	ケト ース (%)
1	80.8	61.5	14.06	72.5	52.4	72.3	9.75
2	90.6	65	19.0	73.2	56.5	77.4	17.7
3	—	64.5	19.7	67.3	61.2	91.0	5.4

*1 D. E. は各社より提示された数値

*2 比粘度はオストバルト粘度計により 50° で測定。60% グルコースの 50° における比粘度は 3.72 であった。

等の非グルコース成分の混在が考えられる。No. 2 の試料は三番蜜であって、その間イオン交換樹脂処理を多く受けたためにケトースが最も多いと考えられ、ケトースの存在が大きな原因と推定される。72 時間の反応で

第 2 図 ハイドロールに対するイソメラーゼの作用

図中の番号は試料番号 (第 3 表参照)

第 4 表 ハイドロールに対するイソメラーゼの作用

試料 番号	反応開始時の		72時間反応 後のフラク トース (g)	生成フ ラクト ース (g)	異性化率* (%)
	グルコー ス (g)	フラクト ース (g)			
1	2.36	0.44	1.22	0.78	33.0(51.8)
2	2.54	0.79	1.64	0.85	33.4(64.6)
3	2.75	0.25	1.45	1.20	43.7(52.8)

* 異性化率(%) = [(生成フラクトース) - (初めのフラクトース)] / [(初めのグルコース) × 100]
カッコ内の異性化率は初めのフラクトースを差引かず求めたもの。

ルコースより生成したフラクトースより異性化率を求めると 33~44% であり, ケトースの多く混在している No. 1 及び 2 の試料では 33% と低い。しかし全フラクトースより異性化率を求めると 52~53% であり, No. 2 の試料では 64.6% の値が得られた。従って全体の異性化率においては首肯すべき値である。

要 約

グルコース・イソメラーゼを利用してグルコースより転化糖を得るための基礎実験として, でんぶんの酵素糖化液及びハイドロールに対する作用を検討した。これら糖液は稀釈することなく直接イソメラーゼの作用を受け, グルコースの 46~61% のフラクトースを得ることができる。この目的のために, 糖液

の加熱殺菌あるいは濾過は必要ではなく, 糖液はむしろ濃縮してから作用させることが望ましい。

乳酸菌の D-グルコース・イソメラーゼは D-キシロース・イソメラーゼと同一酵素蛋白と考えられるので, 本文中ではイソメラーゼとのみ記した⁽⁵⁾。

終りに臨み, 終始御指導, 御鞭撻をいただいた片桐英郎先生, 東大応用微生物研究所北原覚雄先生, 京大食糧科学研究所秦忠夫先生, 京大緒方浩一先生及び香川大梶明先生に深く感謝いたします。

糖液の試料を快よく御提供いただいた参松工場株式会社千葉工業長津山英夫氏, 昭和産業株式会社上尾工場東修一郎氏, 共和糖化工業株式会社千葉工場加藤明宣部長, 東海糖業株式会社服部圭助氏, 松谷化学工業株式会社佐藤通甫氏, 林原株式会社杉本要部長ならびに日本資糧工業株式会社徳島工場富永正氏 (以上順不同) 及びグルコース・オキシダーゼ (デオキシン) を分与いただいた長瀬産業株式会社尼崎工場草井清氏, 小巻利章氏に対し深く感謝いたします。

本研究は昭和 37 年度文部省総合研究「乳酸菌の活用に関する基礎研究」(代表者北原覚雄)の分担研究として行なったものである。付記して感謝の意を表します。

(1) 山中 啓 : 本誌, 37, 231 (1963).

(2) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 160, 69 (1945); 195, 19 (1952).

(3) Z. Dische, E. Borenfreund : *ibid.*, 192,

583 (1951).

(4) 小巻利章他 : 澱工, 6, 98 (1959).

(5) K. Yamanaka : *Agr. Biol. Chem.*, 投稿中。