解 説

工業的利用特性の高い α -アミラーゼ、グルコースイソメラーゼ
及びマンノースイソメラーゼの探索とその性質

高 崎 義 幸*

Development of Thermostable and/or Acid Stable α -Amylase, Glucose
Isomerase and Mannose Isomerase

Yoshiyuki TAKASAKI*

Emeritus Professor in Miyazaki University, C-109, 7-63, Shinmatsudo, Matsudocity,
Chiba 270-0034

酵素利用において、酵素の基質特異性のほかに、pH、温度、化学物質、酸化などに対する安定性に問題があり、この問題を解決することにより、新たな展開が計れることが多くあると思う。本解説においては、(1)食品、化学原料、医薬品、アルコールの製造などに使用されている澱粉液化用 α -アミラーゼ (E.C.3.2.1.1, 1, 4- α -Glucan glucanohydrolase), (2)ぶどう糖 (グルコース) から果糖 (フルクトース) の製造に使用されているグルコースイソメラーゼ (E.C.5.3.1.5, D-Xylose ketol isomerase), そして、(3)フルクトースからマンノースを製造するためのマンノースイソメラーゼ (E.C.5.3.1.7, D-Mannose ketol isomerase), についての問題点とその解決のために行ってきた研究の結果を記述する。

トウモロコシ澱粉から異性化糖 (果糖含有シロップ) の製造は、3つの酵素 [α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ (E.C.3.2.1.3, 1,4- α -Glucan glucanohydrolase) とグルコースイソメラーゼ] を用いて行われている。これら酵素は作用 pH 域が異なるため、pH 4.0~4.7 にあるトウモロコシ澱粉を、 α -アミラーゼで液化するときにはアルカリで pH 6~6.5 に調整され、グルコアミラーゼで糖化するときには酸で pH 4.3~4.5 に調整され、そして、グルコースイソメラーゼでグルコースをフルクトースに異性化するときには、アルカリで pH 7~8 に調整されてい

る。このような pH 調整は操作が煩雑であるばかりでなく、糖液中に塩を生成するため、イオン交換樹脂による精製の負担になる。また、糖、特にフルクトースは、中性付近でも分解してプシコース、有機酸、着色物質などを生成し、イオン交換樹脂や活性炭による精製の負担になる。

澱粉の液化、糖化と異性化の工程が、途中、pH の調節を行うことなく実施できれば、工程は簡素化され、精製コストも低減できる。これらの理由から、酸性下、できれば澱粉の pH でトウモロコシ澱粉を液化できる耐酸性と耐熱性をもつ α -アミラーゼの探索と酸性下で作用するグルコースイソメラーゼの探索を行った。

また、フルクトースの新規用途開拓の1つとして、フルクトースをマンノースに変換するため、工業的使用に耐える熱安定性をもつマンノースイソメラーゼの探索を行った。マンノースは甘味料や医薬品として利用されているマンニトールの製造原料、医薬品の合成原料、動物細胞の培養炭素源としての用途があり、また、様々な食品の風味を改善する効果や、ニワトリ内臓のサルモネラ菌を減少させる効果も報告¹⁾されている。

実 験 方 法

酵素活性の測定: α -アミラーゼ²⁾, グルコースイソメ

* 宮崎大学名誉教授 (〒270-0034 千葉県松戸市新松戸 7-63 C-109)

ラーゼ³⁾、とマンノースイソメラーゼ⁴⁾の活性測定は文献記載の方法により行った。

澱粉の液化：文献²⁾記載の方法により行った。

糖組成の分析：文献²⁾記載の高速液体クロマトグラフ法により行った。

使用市販 α -アミラーゼ：ノボ社より市販されている Termamyl、マイルス社より市販されている Taka-Therm と天野製薬(株)より市販されている Amylase AH を使用した。

実験結果

1. 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの探索

現在、澱粉の液化に使用されているバシルス属 α -アミラーゼよりも広い作用 pH 域をもつ耐酸性、耐アルカリ性と耐熱性に優れた α -アミラーゼを生産する細菌 (*Bacillus* sp. a2) を分離した。Fig. 1 は、この酵素の作用 pH を、現在、トウモロコシ澱粉の液化に使用されている代表的な 3 種のバシルス属 α -アミラーゼの作用 pH と比較したものである。市販酵素はよく似た pH プロフィールを示し、いずれも至適 pH は 6.0~6.5 に認めら

れたのに対し、本酵素の至適 pH は 4.5~5.0 の酸性域にあり、pH 4.0~pH 8.5 の広い pH 範囲において 80% 以上の活性を示した。Fig. 2 は本酵素および市販酵素の pH 安定性を示している。本酵素は pH 5~pH 10 の広い pH 範囲で安定であった。本酵素の至適温度は約 95°C (Fig. 3) にあり、90°C で 1 時間加熱しても活性の低下が認められなかった (Fig. 4)。

本酵素の澱粉液化酵素としての安定性を知るため、pH 約 4.3、約 4.5、約 4.8 または約 5.5 に調整した 10% のポテト澱粉の下、90°C で 2 時間反応を行った。経時的に反応液の pH と生成還元糖量 (DE : 固形分に対するグルコースに換算された還元糖の割合) を測定した。結果を Fig. 5 に示す。pH 4.3 では、活性低下が認められたが、pH 約 4.5~約 5.5 の間では大差なく反応が進行した。

Fig. 6 は本酵素または市販の α -アミラーゼを用い、pH 4.6~4.7 に調整した約 30% のトウモロコシ澱粉を、トウモロコシ澱粉の工業的な液化条件 [105°C で 5 分 (一次液化)、次いで 90~95°C で 90~120 分 (二次液化)] に準じた条件 (一次液化 : 105°C で 7 分、二次液化 : 90°C で 90 分) で反応を行った結果を示している。本酵素は、市販酵素に比べ、酸性側においてより安定であるといえ

Fig. 1 Effect to pH on Activity of various α -Amylases

Soluble starch 1%, acetate buffer or phosphate buffer 0.1M, CaCl_2 5mM, the enzyme 0.0084 units, total volume 0.4ml, incubated for 1 h at 60°C.

○, This enzyme ; ●, Termamyl (Novo) ;
△, Taka-Therm (Miles) ;
□, Amylase AH (Amano)

Fig. 2 pH Stability of various α -Amylases

A mixture containing acetate or phosphate buffer 0.1M, and the enzyme 0.033 units in a total volume 0.4 ml was incubated for 3 h at 30°C.

○, This enzyme ; ●, Termamyl ;
△, Taka-Therm

Fig. 3 Effect of Temperature on Activity of various α -Amylases

Soluble starch 1%, acetate buffer (pH 6.0) 0.1 M, CaCl_2 5 mM, the enzyme 0.035 units, total volume 0.4 ml, incubated for 10 min.

○, This enzyme ; ●, Termamyl ;
△, Taka-Therm ; □, Amylase AH

Fig. 4 Heat Stability of various α -Amylases

A mixture containing acetate buffer (pH 6.0) 0.1 M, and CaCl_2 5 mM and the enzyme 0.168 units in a total volume 2.0 ml was incubated at 90°C.

○, This enzyme ; ●, Termamyl ;
△, Taka-Therm ; □, Amylase AH

Fig. 5 Effect of pH on liquefaction of Potato Starch

Potato starch 10%, acetate buffer 0.1 M, CaCl_2 4 mM, NaCl 1 mM, the enzyme 0.9 units, total volume 1.0 ml, incubated at 90°C.

○, pH 4.3 ; □, pH 4.5 ; △, pH 4.8 ; ●, pH 5.5

る。

本酵素はアルカリ性でも安定であることから、溶性澱粉を基質とし、約 1% 炭酸ナトリウムの存在下 (pH 10 ~ 11), 80°C で反応を行った。結果を Fig. 7 に示す。高アルカリ性、かつ高温下の反応であるため、澱粉の非酵素的な分解がおこっている (コントロール) が、本酵素はこの pH でも作用することがわかった。

2. 耐酸性グルコースイソメラーゼの探索

現在までに報告されているグルコースイソメラーゼは pH 5 付近では殆ど作用しない。著者は、グルコースイソメラーゼは pH 5 ~ 7 の酸性域で活性を失うが、この低下した活性は同酵素の pH を中性にすると元の活性に戻ることに、また、還元剤を存在させるか、嫌気的条件下に置くと、より早く元の活性に戻る性質のあることを認めた⁵⁾⁶⁾。そこで、新たに探索した耐酸性グルコースイソメラーゼを生産する *Streptomyces* sp. T-17 の菌体をアルブミンとグルタルアルデヒドで包括固定し、酸性での失活を防止するため、還元剤 (酸性亜硫酸ナトリウム) の存在下で連続異性化反応を行った。Fig. 8 は pH 5 と pH 7 での反応経過を示している。pH 5 においても反応は効果的に進行した。Table 1 は同固定化酵素を用いた

Fig. 6 Liquefaction of Corn Starch by various α -Amylases

Corn starch 30%, acetate buffer 0.1 M, CaCl_2 3 mM, the enzyme 1.8 units, total volume 1.0 ml. 1 st liquefaction, 7 min at 105°C ; 2 nd liquefaction, 90°C.

○, This enzyme (pH 4.6) ; ●, Termamyl (pH 4.7) ; △, Taka-Therm (pH 4.6) ; □, Amylase AH (pH 4.7)

Fig. 7 Time Course of Starch Liquefaction by various α -Amylases under high alkaline Condition

Soluble starch 1%, Na_2CO_3 0.1 M, CaCl_2 5 mM, the enzyme 0.1 units, total volume 1.0 ml, incubated at 80°C.

□, Control ; ○, This enzyme ; ●, Termamyl

Fig. 8 Continuous Conversion of Glucose to Fructose at pH 5 or pH 7

Column, 9.2 units (9 mm $\times$ 70 mm) ; substrate, 40% glucose solution containing 50 mM maleate buffer, 5 mM MgSO_4 , 5 mM NaN_3 ; flow rate, about 0.39 ml/h (pH 5.0), about 0.74 ml/h (pH 7.0) ; temperature, 60°C.

●, inlet pH 5.0 ; ○, inlet pH 7.0

Table 1 Effect of pH on continuous Conversion of Glucose to Fructose with acid-stable Glucose Isomerase

pH of reaction	Concentration of glucose			
	40%		50%	
	Control	NaHSO_3	Control	NaHSO_3
7.0	100%	100%	100%	100%
5.0	51	59	60	72
4.5	45	56	53	64

グルコースの連続異性化反応において、基質濃度、還元剤の有無などの条件を変えて連続異性化反応を行った結果を示している。pH 7における同酵素の活性を100%としたとき、pH 5において約70%、そして、pH 4.5においても約60%の活性を示した。

グルコースイソメラーゼ反応の平衡は温度の影響を受け、温度が高くなるに従い、フルクトース側に移動する⁷⁾。本酵素は熱安定性にも優れているため、90°Cまでの各温度でグルコース異性化反応を行った。その結果、

Fig. 9 Effect of Temperature on Equilibrium of Glucose isomerase Reaction

Glucose 40%, maleate buffer (pH 7.0) 50 mM, MgSO_4 5 mM, CoCl_2 1 mM, total volume 1.0 ml.

90°Cにおいてグルコースの約55%をフルクトースに変換できることを認めた (Fig. 9).

3. 耐熱性マンノースイソメラーゼの探索

至適温度が約55~60°Cにあるマンノースイソメラーゼを生産する細菌 (*Pseudomonas* sp.⁸⁾ と *Agrobacterium* sp.⁹⁾) を分離した。至適 pH はいずれも pH 8 付近にあるが, *Agrobacterium* sp. のマンノースイソメラーゼは pH 6 前後の酸性域および pH 9 前後のアルカリ域でも作用した (この性質は後述のマンノースイソメラーゼ反応の平衡移動において有用な性質である)。また, この酵素は *Agrobacterium* 属菌に広く存在していることを認めた。

マンノースイソメラーゼ反応の平衡はマンノース/フルクトース=約25/75にあり, 温度による影響を受けない¹⁰⁾。著者らはフルクトースとマンノースを含む糖液からマンノースを分離精製する方法, また, マンノースイソメラーゼ反応の平衡をマンノース側に移動させる方法についても検討した。

(1) マンノースの分離精製

マンノース約20~25%とフルクトース約75~80%を含む反応液からのマンノースの分離精製法について検討した。その結果, カルシューム型陽イオン交換樹脂または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂カラムを用いる液体クロマトグラフ法により分離できることを認めた。特に,

Fig. 10 Effect of pH on Mannose isomerase Reaction in the Presence of Sulfite or Meta-bisulfite

Substrate (fructose 80%, mannose 20%) 160 mg, Na_2SO_3 or $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 100 mg, the enzyme 0.07 units, total volume 1.0 ml for 20 h at 50°C.

●, Na_2SO_3 ; ○, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

後者のイオン交換樹脂を使用することにより, マンノースを純粋に分離することができた¹¹⁾。

(2) マンノースイソメラーゼ反応の平衡移動

マンノースイソメラーゼ反応の平衡は還元性のイオウの酸素酸化合物 (例えば, メタ重亜硫酸塩, 亜硫酸塩や亜硫酸水素塩) の存在下, pH 6 付近で反応することにより, マンノース側に移動できることを認めた (Fig. 10)¹²⁾。なかでもメタ重亜硫酸ナトリウムがよく, 最適条件でフルクトースの約85%をマンノースに変換できることを認めた。反応液中のマンノースと塩は亜硫酸型または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂カラムを使用する液体クロマトグラフ法より分離することができた。しかし, 亜硫酸塩は酸化されやすいため, 再利用については, 今後, 検討する必要がある。なお, 亜硫酸ナトリウムやメタ重亜硫酸ナトリウムは食品添加物として利用されている。

亜硫酸塩の代わりに, アンモニウム塩やアミン化合物を存在させても, フルクトース側からマンノース側に平衡を移動できることを認めた¹²⁾。フルクトースからマンノースへの変換率は使用するアンモニウム塩の種類にもよるが, 炭酸アンモニウムを使用したとき, フルクトースの約85%をマンノースに変換することができた (Fig. 11)。

Fig. 11 Mannose Isomerase Reaction in the Presence of Ammonium Carbonate

Substrate (fructose 80%, mannose 20%) 160 mg, ammonium carbonate 0-400 mg, the enzyme 2.8 units, total volume 1.0 ml, incubated at 45°C.

○, Control; ●, 100 mg/ml; △, 200 mg/ml; □, 300 mg/ml; ■, 400 mg/ml

反応液中のアンモニウム塩と糖は、前述の液体クロマトグラフ法によっても分離できるが、炭酸アンモニウムを使用したときは、Table 2 に示しているように、反応液を減圧下で加熱濃縮処理することにより、炭酸アンモニウムは気散し、糖から分離することができた¹²⁾。炭酸アンモニウムは回収し再利用することを考えている。

考 察

本解説は、著者が宮崎大学において行ってきた研究をまとめたものである。以下に、個々の酵素についての著者の考えを記したい。

(1) 至適 pH が市販の澱粉液化 α -アミラーゼよりも低く、耐酸性と耐アルカリ性に優れた α -アミラーゼを探索した。この酵素はグルコアミラーゼの糖化 pH である pH 4.5 において、工業的な液化条件に準じた条件（一次液化：105°C，7 分，二次液化：90°C で 90 分）でトウモロコシ澱粉を液化することができた。しかし、pH 4.5 以下になると、一次液化の段階で酵素の失活が多くなり、二次液化の段階で酵素を追加する必要があった。酵素の安定化、あるいはより耐酸性の α -アミラーゼを開発することは可能と思うが、一方では、工業的な澱粉の液化にお

Table 2 Removal of Ammonium Carbonate from Reaction Mixture of Mannose Isomerase

Temperature of treatment (°C)	Remaining of ammonium carbonate at each treatment		
	1st	2nd	3rd
40	34%	16%	4%
50	40	16	6
60	19	4	0
70	4	0	0
80	4	0	0

Mixture : mannose 6.8%, fructose 2.2%, ammonium carbonate 10.0%, 5 ml

いて、その後のグルコアミラーゼ、 β -アミラーゼあるいはその他のアミラーゼにより糖化するいずれの場合も、糖化の効率を上げるため、液化液に残存している α -アミラーゼを、液化液を酸性にすることにより失活している。この失活を困難にするような耐酸性はかえって問題になるという意見もある。

(2) 現在までに知られているグルコースイソメラーゼの至適 pH は 7~8 付近にあり、pH 5 付近では殆ど作用しない。酸性域に至適 pH をもつグルコースイソメラーゼの探索については、著者の他にも、多くの研究者により研究されてきたと思うが、現在に至るも見つかっていない。反応機構から考えると、このような酵素は存在しないのかも知れない。一方、いま使用されている酵素の全てがそれら酵素の至適 pH で使用されているわけでもないで、酸性下でおこる酸化失活を防ぐ反応方法が採られるならば、耐酸性グルコースイソメラーゼを用いても、pH 4~5 程度の酸性下でグルコースを異性化することは可能であると考えられる。

異性化糖の中でも生産量の多いフルクトース含量 55% の異性化糖（果糖ぶどう糖液糖）は、カルシウム型陽イオン交換樹脂カラムを用いる連続式糖分離法を組み合わせて製造されている。果糖ぶどう糖液糖が温度による平衡移動により、直接、製造できるようになれば、製造工程は簡単になる。しかし、果糖は酸性では安定であるが、アルカリ性で不安定で、工業的な異性化 pH である 7~8 でも、温度が高くなると、フルクトースは分解し、着色が著しくなる。このためにも、酸性下で利用できるグルコースイソメラーゼの開発は必要であると考えられる。

(3) マンノースは多くの生物活性物質の糖鎖を構成す

る主要な糖の 1 つで、それらの機能の発現と伝達に重要な役割をしている。しかし、これまでマンノースの安価な製造法がなく、マンノースの性質、機能や利用についての研究は殆どされてこなかった。本研究は、マンノースがブロイラー腸内でのサルモネラ菌の生育を抑制する効果があるとの米国での研究報告¹⁾をもとにして始めたものであるが、日本でもこの機能についての追試が行われた結果、ヒナのある時期にマンノースを配合した飼料を与えると、内臓のサルモネラ菌が減少するとの結果が得られているようである。このほか、マンノースは少量でも様々な食品の酸味、甘味、苦味、刺激味を減少したり、改善する機能がある¹³⁾。また、マンノースと構造が似ているマンニトールは、現在、蔗糖（転化糖）を原料とし、フルクトースの還元により製造され（蔗糖からの収量 25%、フルクトースからの収量 50%）、甘味料、食品素材、また医薬品として広く利用されている。マンノースを原料にすれば、100% マンニトールに変換できるので、マンノース側に平衡移動させる前記の反応方法を組み合わせると、計算上、フルクトースから 90% 以上の収量でマンニトールが製造できることになる。本方法がマンニトールの新しい製造法になることを期待している。

ま と め

澱粉の液化、糖化とグルコース異性化の工程を簡素化し、効率化するため、耐酸性と耐熱性に優れた α -アミラーゼと耐酸性のグルコースイソメラーゼの探索を行った。また、フルクトースからマンノースを製造するため、耐熱性マンノースイソメラーゼの探索を行った。

(1) *Bacillus* sp. $\alpha 2$ により生産される α -アミラーゼは、現在、工業的に使用されている澱粉液化用の α -アミラーゼよりも耐酸性と耐アルカリ性において優れていた。この酵素はトウモロコシ澱粉の液化条件に準じた条件（105℃、7 分、90℃、90 分）の下、pH 4.5 でトウモロコシ澱粉を液化することができた。

(2) 新たに探索した耐酸性グルコースイソメラーゼ生産菌 *Streptomyces* sp. T-17 の菌体を包括固定化し、嫌気下でグルコースの連続異性化を行った。その結果、pH

7.0 での活性を 100% としたとき、pH 4.5 と 5.0 での活性は、それぞれ 60% と 70% であった。

(3) 至適温度が約 60℃ にあるマンノースイソメラーゼが *Pseudomonas* sp. と *Agrobacterium* sp. により生産されることを認めた。この反応の平衡（マンノース/フルクトース=約 25/75）は、炭酸アンモニウムまたはメタ重亜硫酸ナトリウムの存在下で反応することにより、マンノース/フルクトース=約 85/15 にまで移動できることを認めた。また、反応液中の炭酸アンモニウムは減圧下で加熱することにより、完全に除去できることを認めた。

謝辞：本研究の遂行に当たり、ご指導とご協力頂いた天野エンザイム(株)大矢隆一氏、宮崎大学 今田清久先生、林 幸夫先生、横井春比古先生、広瀬 遵先生、中島秀之氏、柿並眞由美氏、谷村 健氏、前田一彦氏、沼田光司氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) OYOFO, A.B. and DeLOACH, J.R.: *Poultry Science*, **68**, 1351 (1989).
- 2) TAKASAKI, Y.: *J. Ferm. Bioeng.*, **77**, 94 (1994).
- 3) The Amylase Research Society of Japan: *Handbook of Amylases and related Enzymes*. (Pergamon press), p. 172 (1988).
- 4) TAKASAKI, Y., HINOKI, K., KATAOKA, Y., FUKUYAMA, S., NISHIMURA, N., HAYASHI, S. and IMADA, K.: *J. Ferm. Bioeng.*, **76**, 237 (1993).
- 5) 高崎義幸: *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **71**, 621 (1997).
- 6) 天野製薬(株), 高崎義幸: 特開平 49-191894
- 7) TAKASAKI, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 309 (1967).
- 8) 天野製薬(株): 特開平 4-218370, 6-292578 他
- 9) 新技術事業団: 特願平 11-124870
- 10) TAKASAKI, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 435 (1967).
- 11) 天野製薬(株), 日本資糧工業(株): 特許出願
- 12) 新技術事業団: 特願平 11-252094
- 13) 天野製薬(株): 特開平 6-30721

(平成 12 年 7 月 12 日受理)