(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3557235号
(P3557235)
(45)発行日　平成16年8月25日(2004.8.25)　(24)登録日　平成16年5月21日(2004.5.21)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12N 9/24	C12N 9/24 ZNA
C08B 37/00	C08B 37/00 G
C12P 19/14	C12P 19/14 Z
//(C12N 9/24	C12N 9/24
C12R 1:41)	C12R 1:41

請求項の数 12　(全 38 頁)

(21)出願番号　特願平5-349216
(22)出願日　平成5年12月28日(1993.12.28)
(65)公開番号　特開平7-143876
(43)公開日　平成7年6月6日(1995.6.6)
審査請求日　平成11年12月24日(1999.12.24)
(31)優先権主張番号　特願平4-362131
(32)優先日　平成4年12月28日(1992.12.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願平5-265416
(32)優先日　平成5年9月30日(1993.9.30)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

微生物の受託番号　FERM BP-4130
微生物の受託番号　FERM BP-4316

(73)特許権者　000155908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井１丁目２番３号
(72)発明者　丸田　和彦
岡山県岡山市桑野５２５番３－２１４号
(72)発明者　久保田　倫夫
大阪府茨木市主原町１２番６号
(72)発明者　杉本　利行
岡山県岡山市東畦６９５番４４号
(72)発明者　三宅　俊雄
岡山県岡山市伊島町１丁目３番２３号

審査官　鈴木　恵理子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非還元性糖質生成酵素とその製造方法並びに用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属およびテラバクター属から選ばれる微生物に由来し、下記の理化学的性質を有する非還元性糖質生成酵素。
（１）　作用
グルコース重合度が３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。
（２）　分子量
ＳＤＳ－ゲル電気泳動により、約７６，０００乃至８７，０００ダルトン。
（３）　等電点
アンフォライン含有電気泳動法により、ｐＩ約３．６乃至４．６。
（４）　至適温度
ｐＨ７．０、６０分間反応で、３５乃至４０℃付近。
（５）　至適ｐＨ
４０℃、６０分間反応で、ｐＨ約６．４乃至７．２。
（６）　温度安定性
ｐＨ７．０、６０分間保持で、３５乃至４０℃付近まで安定。
（７）　ｐＨ安定性
２５℃、１６時間保持で、ｐＨ約５．５乃至１１．０。

【請求項２】
グルコース重合度が３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有し、部分アミノ酸配列として、
（１）　X_1－アルギニン－トレオニン－プロリン－X_2－セリン－トレオニン－チロシン－アルギニン－ロイシン－（但し、X_1はバリン又はメチオニンを意味し、X_2はアラニン又はバリンを意味する。）
（２）　グリシン－バリン－グルタミン酸－アスパラギン酸－トレオニン－アラニン－フェニルアラニン－フェニルアラニン－アルギニン－チロシン－
（３）　ロイシン－バリン－グルタミン－ロイシン－トレオニン－メチオニン－プロリン－グリシン－バリン－プロリン－
（４）　グルタミン酸－グリシン－アルギニン－X_3－セリン－X_4－チロシン－アラニン－X_5－アラニン－（但し、X_3はグリシンまたはグルタミンを意味し、X_4はプロリンまたはアルギニンを意味し、X_5はバリンまたはグルタミン酸を意味する。）
から選ばれる１種または２種以上の部分アミノ酸配列を有し、且つ、ＳＤＳ－ゲル電気泳動において、約７６，０００乃至８７，０００ダルトンの分子量を有する非還元性糖質生成酵素。
【請求項３】
非還元性糖質生成酵素が、非還元性糖質生成酵素活性を有する粗酵素である請求項１又は２に記載の非還元性糖質生成酵素。
【請求項４】
請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素産生能を有するリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属およびテラバクター属から選ばれる微生物を栄養培地に培養して、得られる培養物から該非還元性糖質生成酵素を採取することを特徴とする請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。
【請求項５】
リゾビウム・スピーシーズ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｓｐ．）Ｍ－１１（工業技術院微生物工業技術研究所、受託番号　ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）、または、アルスロバクター・スピーシーズ（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．）Ｑ３６（工業技術院微生物工業技術研究所、受託番号　ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６）からなる請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物。
【請求項６】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素を作用させることを特徴とする還元性澱粉部分分解物の還元力を低減させる方法。
【請求項７】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素を作用させることを特徴とする、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質の製造方法。
【請求項８】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素を作用させ、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質および夾雑糖質含有糖液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけることを特徴とする、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質の製造方法。
【請求項９】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物が、澱粉にアミラーゼ及び／又は枝切酵素を作用させて得られたものであることを特徴とする請

求項７又は８記載の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質の製造方法。
【請求項１０】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼ、またはα－グルコシダーゼを作用させてトレハロースを生成させることを特徴とするトレハロースの製造方法。
【請求項１１】
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物が、澱粉にアミラーゼ及び／又は枝切酵素を作用させて得られたものであることを特徴とする請求項１０記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１２】
さらに強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーによりトレハロースを精製することを特徴とする請求項１０又は１１記載のトレハロースの製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、非還元性糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、この新規非還元性糖質生成酵素を用いて製造される末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、および、これらから製造されるトレハロース、並びにこれら非還元性糖質を含有せしめた組成物に関する。
【０００２】
【従来の技術】
グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース（α，α－トレハロース）が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレイト・ケミストリー（Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）』、第１８巻、第２０１乃至２２５頁（１９６３年）アカデミック・プレス社（米国）および『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー（Ａｐｐｌｉｅｄ　ａｎｄ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）』、第５６巻、第３２１３乃至３２１５頁（１９９０年）などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースのような非還元性糖質は、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、含アミノ酸物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。
【０００３】
トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭５０－１５４４８５公報で報告されている微生物菌体を用いる方法や、特開昭５８－２１６６９５公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物菌体を用いる方法は、該菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当り１５ｗ／ｗ％（以下、本明細書では、特にことわらない限り、ｗ／ｗ％を単に％と略称する）未満と低く、その上、これを抽出、精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼおよびトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース－１リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っていない。
【０００４】

これに関係して、『月刊フードケミカル』、８月号、第６７乃至７２頁（１９９２年）、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【０００５】

一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント（ＤｅｘｔｒｏｓｅＥｑｕｉｖａｌｅｎｔ，ＤＥ）として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【０００６】

このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、ＤＥの大小に依存しており、還元性澱粉部分分解物とＤＥとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【０００７】

還元性澱粉部分分解物とＤＥとの関係を断ち切る唯一の方法は、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などによって、その還元基を糖アルコールに変換して非還元性糖質にする方法である。しかし、この方法は、高圧オートクレーブを必要とし、多量の水素やエネルギーを消費するのみならず、防災上からも高度な安全施設や管理を必要としている。その上、得られる還元性澱粉部分分解物の糖アルコールは、原料の還元性澱粉部分分解物がグルコースのみからなるのに対し、グルコースとソルビトールとから構成される点で異なり、それを摂取することによって、一過性ではあるが、難消化、緩下の症状を起こす懸念もある。従って、還元性澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減若しくは消滅させる方法の確立が望まれる。

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来信じられてきた還元性澱粉部分分解物とＤＥとの関係を打破し、還元性澱粉部分分解物の新たな用途を開拓するため、還元性澱粉部分分解物からの非還元性糖質の新規製造方法とその非還元性糖質並びにその用途を提供しようとするものである。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するために、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する全く新しい非還元性糖質生成酵素の実現に期待を込めて、この酵素を産生する微生物を土壌より広く検索してきた。その結果、岡山県岡山市の土壌から、新たに分離した新規微生物、リゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）属に属する微生物Ｍ－１１、および岡山県総社市の土壌から新たに分離した新規微生物、アルスロバクター（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）属に属する新規微生物Ｑ３６が、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素を産生することを見いだし、この非還元性糖質生成酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させることにより、目指していたトレハロース構造を有する非還元性糖質が容易に製造しうることを見いだし、また、還元性澱粉部分分解物に、この非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼまたはα－グルコシダーゼを作用させることにより、容易にトレハロースを製造しうることを見いだし、本発明を完成した。更に、この非還元性糖質生成酵素を産生する微生物を、公知菌より広く検索した。その結果、ブレビバクテリウム（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、フラボバクテリウム（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）

属、ミクロコッカス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、クルトバクテリウム（Ｃｕｒｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、テラバクター（Ｔｅｒｒａｂａｃｔｅｒ）属に属する微生物も、本発明の非還元性糖質生成酵素を産生することが判明し、前記のリゾビウム属、アルスロバクター属に属する微生物由来の非還元性糖質生成酵素と同様に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成することを見いだし、本発明を完成した。併せて、この非還元性糖質、これを含む低還元性糖質および／またはトレハロースを含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して本発明を完成した。

【００１０】

次に本発明のリゾビウム属に属する微生物Ｍ－１１の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、１９８５年）に準じて行った。

【００１１】

【Ａ　細胞形態】

肉汁寒天培養、２７℃

通常０．６乃至０．８×１．０乃至１．５μｍの桿菌。単独、希に対をなし、連鎖した細胞も観察される。多形性なし。運動性あり。無胞子。鞭毛は周鞭毛。非抗酸性。グラム陰性。カプセル陰性。異染顆粒陽性。Ｐｏｌｙ－β－ｈｙｄｒｏｘｙ　ｂｕｔｙｒａｔｅを蓄積。

【００１２】

【Ｂ　培養的性質】

（１）　肉汁寒天平板培養、２７℃

形状　　：円形　大きさは２４時間で約１．５ｍｍ。
周縁　　：全縁
隆起　　：偏平状ないし半レンズ状
光沢　　：あり
表面　　：平滑
色調　　：半透明、クリーム色

（２）　デキストロース・トリプトン寒天平板培養、２７℃

コロニーは半透明、クリーム色、ｍｕｃｏｉｄ生成

（３）　酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、２７℃

形状　　：円形　大きさは５日で約３ｍｍ。
色調　　：半透明、クリーム色、ｍｕｃｏｉｄ生成

（４）　コンゴーレッド含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、２７℃

コロニーは仄かなピンク色で、ほとんどコンゴーレッドを吸収しない。

（５）　２ｗ／ｖ％ＮａＣｌ含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、２７℃

生育する。

（６）　肉汁寒天斜面培養、２７℃

生育　　：良好
形状　　：糸状

（７）　肉汁ゼラチン穿刺培養、２７℃

液化しない。

【００１３】

【Ｃ　生理学的性質】

（１）　硝酸塩の還元性　：陽性
（２）　脱窒反応　：陰性
（３）　メチルレッド試験　：陰性
（４）　ＶＰ試験　：陰性
（５）　インドールの生成　：陰性
（６）　硫化水素の生成　：陽性
（７）　澱粉の加水分解　：陰性
（８）　クエン酸の利用　：陽性
（９）　無機窒素源の利用　：アンモニウム塩および硝酸塩ともに利用できる。
（１０）　色素の生成　：可溶性色素の生成はない
（１１）　ウレアーゼ　：陽性
（１２）　オキシダーゼ　：陰性
（１３）　カタラーゼ　：陽性
（１４）　生育の範囲　：ｐＨ　５．５乃至９．０
温度　４乃至３５℃
（１５）　酸素に対する態度　：好気性
（１６）　炭素源の利用性と酸生成の有無

	利用性	酸生成
Ｄ－グルコース	利用する	陽性
Ｄ－ガラクトース	利用する	陽性
Ｄ－フラクトース	利用する	陽性
Ｌ－アラビノース	利用する	陽性
Ｄ－キシロース	利用する	陽性
Ｌ－ラムノース	利用する	陽性
マルトース	利用する	陰性
スクロース	利用する	陽性
ラクトース	利用する	陰性
トレハロース	利用する	陰性
ラフィノース	利用する	陽性
マンニトール	利用する	陰性
デキストリン	利用する	陰性
ズルシトール	利用する	陰性

（１７）　アミノ酸の脱炭酸試験　：Ｌ－リジン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン

いずれに対しても陰性。
（１８）　アミノ酸の利用　　：Ｌ－グルタミン酸ナトリウム、Ｌ－アスパラギン酸ナトリウム、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－プロリンいずれも利用する。
（１９）　ＤＮａｓｅ　　：陰性
（２０）　３－ケトラクトースの生成：陰性
（２１）　ＤＮＡのＧ－Ｃ含量　　：６１％
【００１４】
以上の菌学的性質に基づいて、『バージーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー（Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ）』、第１巻（１９８４年）を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、リゾビウム属に属する微生物であることが判明した。本菌は、リゾビウム・メリロッチ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｍｅｌｉｌｏｔｉ）に近い性質を示すものの、この菌とは違って、マルトース、ラクトース、マンニトールから酸を生成しない点に違いが認められ、また、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。
【００１５】
これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物リゾビウム・スピーシーズ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｓｐ．）Ｍ－１１と命名し、平成４年１２月２４日付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託し、微生物受託番号　微工研条寄第４１３０号（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）として受託された。
【００１６】
本発明では、上記菌のみならず、リゾビウム属に属し、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する他の菌株、更には、それら菌株の変異株なども適宜用いられる。
【００１７】
次に本発明のアルスロバクター属に属する微生物Ｑ３６の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、リゾビウム属に属するＭ－１１の場合と同様に、『微生物の分類と同定』、（長谷川武治編、学会出版センター、１９８５年）に準拠して行った。
【００１８】
【Ａ　細胞形態】
（１）　肉汁寒天培養、２７℃
通常０．５乃至０．７×０．８乃至１．６μｍ桿菌。単独。多形性あり。運動性なし。無胞子。鞭毛なし。非抗酸性。グラム陽性。カプセル陰性。
（２）　ＥＹＧ寒天培養、２７℃
桿菌－球菌の生育サイクルを示す。
【００１９】
【Ｂ　培養的性質】
（１）　肉汁寒天平板培養、２７℃
形状　　：円形。大きさは3日間で２乃至２．５ｍｍ。
周縁　　：全縁
隆起　　：半レンズ状
光沢　　：湿光
表面　　：平滑
色調　　：半透明、白色乃至淡い黄色
（２）　肉汁寒天斜面培養、２７℃
生育度　：良好
形状　　：糸状
（３）　酵母エキス－ペプトン寒天斜面培養、２７℃
生育度　：良好
形状　　：糸状

（４）　肉汁ゼラチン穿刺培養、２７℃
液化する。
【００２０】
【Ｃ　生理学的性質】

（１）	硝酸塩の還元性	：陽性
（２）	脱窒反応	：陰性
（３）	メチルレッド試験	：陰性
（４）	ＶＰ試験	：陽性
（５）	インドールの生成	：陰性
（６）	硫化水素の生成	：陽性
（７）	澱粉の加水分解	：陰性
（８）	セルロースの分解	：陰性
（９）	クエン酸の利用	：陽性
（１０）	無機窒素源の利用	：アンモニウム塩および硝酸塩ともに利用できる。
（１１）	色素の生成	：なし
（１２）	ウレアーゼ	：陽性
（１３）	オキシダーゼ	：陰性
（１４）	カタラーゼ	：陽性
（１５）	生育の範囲	：ｐＨ　５乃至１０ 温度　４乃至３７℃
（１６）	酸素に対する態度	：好気性
（１７）	炭素源の利用性と酸生成の有無	

	利用性	酸生成
Ｄ－グルコース	利用する	陰性
Ｄ－ガラクトース	利用する	陰性
Ｄ－フラクトース	利用する	陰性
Ｌ－アラビノース	利用する	陰性
Ｄ－キシロース	利用する	陰性
Ｌ－ラムノース	利用する	陰性
マルトース	利用する	陰性
スクロース	利用する	陰性
ラクトース	利用する	陰性

ラフィノース	利用する	陰性
マンニトール	利用する	陰性
デキストリン	利用する	陰性
ズルシトール	利用する	陰性

（１８）　アミノ酸の利用　　：Ｌ－グルタミン酸ナトリウム、Ｌ－アスパラギン酸ナトリウム、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－プロリンいずれも利用する。

（１９）　ＤＮａｓｅ　　：陽性

（２０）　３－ケトラクトースの生成：陰性

（２１）　細胞壁の主要ジアミノ酸　：リジン

（２２）　ＤＮＡのＧ－Ｃ含量　　：６３％

【００２１】

以上の菌学的性質をもとにして、『バージーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー（Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ）』、第２巻（１９８４年）を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）属に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【００２２】

これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ.）Ｑ３６と命名し、平成５年６月３日付けで、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号　ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６として受託された。

【００２３】

本発明では上記菌株のみならず、アルスロバクター属に属し、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する他の菌株、更には、それら菌株の変異株なども適宜用いられる。

【００２４】

本発明に用いられる微生物としては、本発明の非還元性糖質生成酵素産生能を有するものであればよく、例えば、前記の新規微生物リゾビウム・スピーシーズＭ－１１　ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０およびアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６　ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６だけでなく、公知微生物であるブレビバクテリウム・ヘロボルム（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｈｅｌｏｖｏｌｕｍ）ＡＴＣＣ１１８２２、フラボバクテリウム・アクアティレ（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｑｕａｔｉｌｅ）ＩＦＯ３７７２、ミクロコッカス・ルテウス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｕｔｅｕｓ）ＩＦＯ３０６４、ミクロコッカス・ロゼウス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｏｓｅｕｓ）ＡＴＣＣ１８６、クルトバクテリウム・シトレウム（Ｃｕｒｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｃｉｔｒｅｕｍ）ＩＦＯ１５２３１、マイコバクテリウム・スメグマチス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍｓｍｅｇｍａｔｉｓ）ＡＴＣＣ１９４２０、テラバクター・ツメスセンス（Ｔｅｒｒａｂａｃｔｅｒ　ｔｕｍｅｓｃｅｎｓ）ＩＦＯ１２９６０なども有利に利用できる。

【００２５】

本発明の微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、本発明の非還元性糖質生成酵

素を産生しうる栄養培地であればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化しうる物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、還元性澱粉部分分解物などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸も使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、還元性澱粉部分分解物の場合には、通常、２０％以下が望ましく、菌の生育および増殖からは５％以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および、例えば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【００２６】

培養は、通常、温度４乃至４０℃、好ましくは２０乃至３７℃、ｐＨ４乃至１０、好ましくは５乃至９から選ばれる条件で好気的に行われる。培養時間は微生物が増殖し始める時間以上の時間であればよく、好ましくは１０時間乃至１００時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、０．５乃至２０ｐｐｍが好ましい。そのために、通気量を調節したり、撹拌したり、通気に酸素を追加したり、また、ファーメンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

【００２７】

このようにして、微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。本酵素活性は、培養物の菌体および除菌液いずれにも認められ、菌体および除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫安塩析法、アセトンおよびアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【００２８】

更に、除菌液およびその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタールアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破砕法、ガラスビーズおよびアルミナによる機械的破砕法、フレンチプレスによる破砕法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離または膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【００２９】

本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫安塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、ＤＥＡＥ－トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、トヨパール　ＨＷ－５５樹脂を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一な酵素を得ることができる。

【００３０】

このようにして得られる本発明の非還元性糖質生成酵素は、下記の理化学的性質を有する

。
（１）　作用
グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。
（２）　分子量
ＳＤＳ－ゲル電気泳動法により、約７６，０００乃至８７，０００ダルトン。
（３）　等電点
アンフォライン含有電気泳動法により、ｐＩ約３．６乃至４．６。
（４）　至適温度
ｐＨ７．０、６０分間反応で、３５乃至４０℃付近。
（５）　至適ｐＨ
４０℃、６０分間反応で、ｐＨ約６．４乃至７．２。
（６）　温度安定性
ｐＨ７．０、６０分間保持で、３５乃至４０℃付近まで安定。
（７）　ｐＨ安定性
２５℃、１６時間保持で、ｐＨ約５．５乃至１１．０。
【００３１】
本発明の非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース１．２５ｗ／ｖ％（５０ｍＭリン酸緩衝液、ｐＨ７．０）４ｍｌに酵素液を１ｍｌ加え４０℃で６０分間反応させた後、１００℃で１０分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に脱イオン水で１０倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ１００℃で１０分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、１分間に１μｍｏｌｅのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を１単位と定義した。
【００３２】
本酵素の基質としては、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉をアミラーゼまたは酸などによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉部分分解物が用いられる。アミラーゼで分解した直鎖または枝分かれ構造を有する還元性澱粉部分分解物としては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテツド・エンザイムズ（Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ａｍｙｌａｓｅｓａｎｄ　Ｒｅｌａｔｅｄ　Ｅｎｚｙｍｅｓ）』（１９８８年）パーガモン・プレス社（東京）に記載されている、α－アミラーゼ、マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼなどのアミラーゼで分解した還元性澱粉部分分解物を用いる。更には、還元性澱粉部分分解物を調製する際、プルラナーゼおよびイソアミラーゼなどの枝切酵素を作用させることも随意である。また、還元性澱粉部分分解物として、マルトオリゴ糖、例えば、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどの１種または２種以上を用いることも有利に実施できる。
【００３３】
基質濃度は特に限定されない。例えば、０．１％の基質溶液として用いた場合でも、本酵素の反応は進行するが、工業的には、２％以上、望ましくは、５乃至５０％の高濃度反応が好適であり、トレハロース構造を有する非還元性糖質を有利に生成できる。また、基質溶液中に完全に溶けきれない不溶性基質を含有するものであってもよい。反応温度は酵素反応が進行する温度、すなわち５５℃附近までで行えばよいが、好ましくは４０乃至５０℃付近の温度を用いる。反応ｐＨは、通常、５乃至１０の範囲に調整すればよいが、好ましくは約ｐＨ６乃至８の範囲に調整する。反応時間は酵素反応の進行により適宜選択する。
【００３４】
上記の反応によって得られた非還元性糖質を含む反応液は、基質に用いた還元性澱粉部分分解物と比較して、顕著に還元力が低下している。例えば、基質にマルトペンタオースを

用いた場合、本酵素反応により反応液が示す還元力は、基質マルトペンタオース溶液の示す始発還元力の約９３％が消失し、約７％にまで低下する。

【００３５】

反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、Ｈ型、ＯＨ型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法を１種または２種以上組み合わせて精製することにより、最高純度の非還元性糖質製品を得ることも容易である。

【００３６】

とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭５８－２３７９９号公報、特開昭５８－７２５９８号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、目的物の含量を向上させた非還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【００３７】

このようにして得られた本発明のトレハロース構造を有する非還元性糖質またはこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、α－アミラーゼ、β－アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、またはα－グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。

【００３８】

とりわけ、本発明の非還元性糖質またはこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼまたはα－グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性または低還元性糖質にグルコアミラーゼまたはα－グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶または無水トレハロース結晶を得ることも有利に実施できる。

【００３９】

トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約６０％以上、濃度約６５乃至９０％のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、０．１乃至２０％の種晶共存下で、温度９５℃以下、望ましくは１０乃至９０℃の範囲で、撹拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットからトレハロース含水結晶またはこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉砕方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【００４０】

分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜（母液）とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度７０乃至８５％、晶出率２０乃至６０％程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、６０乃至１００℃の熱風で乾燥し、次いで３０乃至６０℃の温風で約１乃至２０時間熟成すれば非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉砕方法の

場合には、通常、水分１０乃至２０％、晶出率１０乃至６０％程度のマスキットを約０．１乃至３日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉砕または切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【００４１】

また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分１０％未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で５０乃至１６０℃、望ましくは８０乃至１４０℃の範囲で撹拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉砕、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【００４２】

このようにして製造される本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびトレハロースは、原料の還元性澱粉部分分解物と比較して、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元性澱粉部分分解物の場合とは違って、還元力が、低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いものの場合には、良質で上品な甘味を有している。

【００４３】

更に、アミラーゼ、例えば、すい臓由来α－アミラーゼにより分解し、低分子非還元性オリゴ糖や低分子マルトオリゴ糖を生成し、また、これらオリゴ糖も、α－グルコシダーゼや小腸酵素でも容易に分解し、グルコース及びトレハロースを生成し、更に、生成したトレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫歯誘発菌などによって、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。

【００４４】

また、安定な甘味料であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【００４５】

また、無水結晶トレハロースの場合には、食品、医薬品、化粧品、その原材料、または加工中間物などの含水物の脱水剤としても有利に利用でき、安定で高品質の粉末、顆粒、錠剤など固状物を容易に製造することができる。

【００４６】

従って、本発明の非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤、脱水剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【００４７】

本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは、そのまま甘味付のための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、α－グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、Ｌ－アスパルチル－Ｌ－フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の１種または２種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【００４８】
また、本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースの粉末乃至結晶状製品は、そのままで、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。
【００４９】
また、本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースの甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。
【００５０】
例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。
【００５１】
また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきするめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、合成酒、洋酒などの酒類、コーヒー、紅茶、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。
【００５２】
また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。
【００５３】
品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン－α、－β、－γ、ツモア・ネクロシス・ファクター－α、－β、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンＩＩなどのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、ＢＣＧワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、スプレプトマイ

シン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、Ｌ－アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、β－アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【００５４】

以上述べたような各種組成物にトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、およびこれらから製造されるトレハロースを含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常０．１％以上、望ましくは１％以上含有せしめるのが好適である。

【００５５】

次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【００５６】

まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１からの非還元性糖質生成酵素の生産、精製およびその性質などを説明し、次いで、アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６からの非還元性糖質生成酵素について同様に説明する。更に、公知微生物からの非還元性糖質生成酵素について説明する。

【００５７】

【実験１　リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１からの非還元性糖質生成酵素の生産】

マルトース２．０ｗ／ｖ％、ペプトン０．５ｗ／ｖ％、酵母エキス０．１ｗ／ｖ％、リン酸二ナトリウム０．１ｗ／ｖ％、リン酸一カリウム０．１ｗ／ｖ％および水からなる液体培地をｐＨ７．０に調整した。５００ｍｌ容三角フラスコにこの培地を約１００ｍｌずつ入れ、オートクレーブで１２０℃で２０分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）を接種し、２７℃、１３０ｒｐｍで２４時間培養したものを種培養液とした。

【００５８】

容量３０ｌのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地約２０ｌを入れて滅菌、冷却して温度３０℃とした後、種培養液１ｗ／ｖ％を接種し、温度３０℃、ｐＨ６．０乃至８．０に保ちつつ、約２４時間通気撹拌培養した。培養液の本酵素活性は約１．５単位／ｍｌであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には約０．６単位／ｍｌの酵素活性が、また、培養液上清には約０．９単位／ｍｌの酵素活性が認められた。

【００５９】

【実験２　酵素の精製】

実験１で得られた培養液約１８ｌを超高圧菌体破砕装置ミニラボ（大日本製薬株式会社製）で処理し、含まれる菌体を破砕した。処理液を遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）することにより、約１６ｌの上清を得た。その液に飽和度０．２になるように硫安を溶解させ、４℃、１時間放置した後、遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）することにより上清を回収した。

【００６０】

更に、その液に飽和度０．６になるように硫安を溶解させ、４℃、２４時間放置した後、遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）して硫安塩析物を回収した。得られた硫安塩析物を１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に溶解させた後、同じ緩衝液に対して２４時間透析し、遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）して不溶物を除いた。その透析液（３６０ｍｌ）を２回に分けて、ＤＥＡＥ－トヨパールゲル（東ソー株式会社製造）を用

いたイオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量３００ｍｌ）を行った。

【００６１】

本酵素はＤＥＡＥ－トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。得られる酵素活性画分を、２Ｍ硫安を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）して不溶物を除き、得られる上清をブチルトヨパール６５０ゲル（東ソー株式会社製造）を用いた疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量３００ｍｌ）を行った。吸着した本酵素を硫安２Ｍから０Ｍのリニアグラジエントによりカラムから溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、トヨパールＨＷ－５５樹脂（東ソー株式会社製造）を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量３００ｍｌ）を行い、酵素活性画分を回収した。精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を表１に示す。

【００６２】

【表１】

工程	酵素活性量（単位）	比活性（単位／ｍｇ蛋白質）	収率（％）
培養液	２６，８００		１００
破砕後の上清	２０，３００	０．１０	７６
硫安塩析後の透析液	１６，１００	０．３２	６０
イオン交換カラム溶出液	１１，３００	５．５	４２
疎水カラム溶出液	５，７３０	９８	２１
ゲル濾過溶出液	３，８９０	１９５	１５

【００６３】

表１の工程でゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル（ゲル濃度７．５％）を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一な純度の高い標品であった。

【００６４】

【実験３　酵素の性質】

実験２で得られた精製酵素標品をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル（ゲル濃度１０％）を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約７７，０００乃至８７，０００ダルトンであった。

【００６５】

精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル（２％アンフォライン含有、スウエーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製）を用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのｐＨを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約３．６乃至４．６であった。

【００６６】

本酵素活性に対する温度の影響、ｐＨの影響は活性測定方法に準じて調べた。結果を図１（温度の影響）、図２（ｐＨの影響）に示した。酵素の至適温度は、ｐＨ７．０、６０分間反応で、４０℃付近、至適ｐＨは、４０℃、６０分間反応で、約７．０であった。本酵

素の温度安定性は、酵素溶液（５０ｍＭリン酸緩衝液を含む、ｐＨ７．０）を各温度に６０分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、ｐＨ安定性は、本酵素を各ｐＨの５０ｍＭ緩衝液中で２５℃、１６時間保持した後、ｐＨを７に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図３（温度安定性）、図４（ｐＨ安定性）に示した。本酵素の温度安定性は４０℃付近まで安定であり、ｐＨ安定性は約６乃至９であった。

【００６７】

【実験４　非還元性糖質の調製】

基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースの２０％水溶液を調製し、それぞれに実験２で得られた精製酵素を基質固形物グラム当たり２単位の割合で加え、４０℃、ｐＨ７．０で４８時間作用させた後、脱塩し、ワコービーズ　ＷＢ－Ｔ－３３０カラム（和光純薬工業株式会社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。高速液体クロマトグラフィーは、室温下で行い、溶離液として水を流速０．５ｍｌ／分で流し、示差屈折計ＲＩ－８０１２（東ソー株式会社製造）で分析した。その結果を表２に示す。

【００６８】

【表２】

基質	反応物	ＨＰＬＣ溶出時間（分）	組成比（％）
グルコース	グルコース	３３．４	１００．０
マルトース	マルトース	２８．５	１００．０
マルトトリオース	ＰＩ	２３．３	３５．０
	マルトトリオース	２５．９	６５．０
マルトテトラオース	ＰＩＩ	２１．６	８５．６
	マルトテトラオース	２４．１	１４．４
マルトペンタオース	ＰＩＩＩ	１９．７	９２．７
	マルトペンタオース	２２．６	７．３
マルトヘキサオース	ＰＩＶ	１８．７	９３．５
	マルトヘキサオース	２１．４	６．５
マルトヘプタオース	ＰＶ	１７．８	９３．４
	マルトヘプタオース	２１．０	６．７

（注）表中、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶは、それぞれの基質、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースから新たに生成した糖質を意味する。

【００６９】
表２の結果から明らかなように、反応物中には残存するそれぞれの基質と新たに生成したそれぞれの糖質ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されない。それぞれの生成率はグルコース重合度３のＰＩが比較的低いものの、グルコース重合度４以上のＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶは８５％以上の高い生成率であることが判明した。なお、グルコース、マルトースからは、新たな糖質を生成しないことが判明した。

【００７０】
それぞれの反応物から新たに生成した糖質を精製するため、脱色、脱塩、濃縮後、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（ＸＴ－１０１６、$Ｎａ^{+}$型、架橋度４％、東京有機化学工業株式会社製造）を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径２．０ｃｍ、長さ１ｍのジャケット付ステンレス製カラム３本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を５５℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して５ｖ／ｖ％加え、これに５５℃の温水をＳＶ０．１３で流して分画し、新たに生成した糖質含量９７％以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を真空乾燥し、それぞれ高純度糖質標品を調製した。基質原料に対する収率は、固形物換算で、それぞれＰＩで約９％、ＰＩＩで約６５％、ＰＩＩＩで約８２％、Ｐ

ＩＶで約８０％、ＰＶで約７７％であった。その純度は、それぞれＰＩで９７．５％、ＰＩＩで９８．６％、ＰＩＩＩで９９．５％、ＰＩＶで９８．４％、ＰＶで９８．４％であった。

【００７１】

またこれらの新たに生成した高純度糖質標品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定し、ＤＥで表した。結果は表３にまとめた。

【００７２】

【表３】

糖質標品	純度（％）	ＤＥ
ＰＩ	９７．５	０．８３
ＰＩＩ	９８．６	０．３５
ＰＩＩＩ	９９．５	０．１０
ＰＩＶ	９８．４	０．２７
ＰＶ	９８．４	０．２３

【００７３】

表３の結果から明らかなように、いずれの標品にも僅かな還元力しか認めらなかった。その僅かな還元力は、その標品中に微量に混入、残存している基質由来の還元性マルトオリゴ糖に起因するものと推定され、新たに生成した糖質はいずれも実質的に非還元性であると判断される。

【００７４】

【実験５　メイラード反応】

実験４において調製した糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、またはＰＶの１０％とグリシン１％と、５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）とを含む溶液を１００℃で９０分間保ち、冷却後、この溶液の４８０ｎｍ、１ｃｍセルにおける吸光度を測定した。対照として、それぞれの原料であるマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースを用いて、同様に、処理し、４８０ｎｍにおける吸光度を測定した。それらの結果を表４に示す。

【００７５】

【表４】

糖質標品	着色度（４８０ｎｍ）	判定
ＰＩ	０．０２７	本発明
ＰＩＩ	０．０１８	本発明
ＰＩＩＩ	０．０１２	本発明
ＰＩＶ	０．０１６	本発明
ＰＶ	０．０１５	本発明
マルトトリオース	０．６２３	対照
マルトテトラオース	０．４７５	対照
マルトペンタオース	０．３６９	対照
マルトヘキサオース	０．３１８	対照
マルトヘプタオース	０．２７１	対照

【００７６】
表４の結果から明らかなように、新たに生成した非還元性糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶのいずれもメイラード反応による着色度は極めて低く、それぞれ原料の基質であるマルトオリゴ糖の着色度の僅かに３乃至６％程度であり、本発明の新規酵素によって生成する非還元性糖質はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが判明した。
【００７７】
【実験６　グルコアミラーゼによる酵素分解】
実験４において調製した非還元性糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶまたは、ＰＶのそれぞれ５０ｍｇを、５０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ４．５）１ｍｌに溶解し、１単位のグルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製造）を加え、４０℃で６時間保ち、酵素分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分解物を分析したところ、いずれの標品からも分解物としてグルコースとトレハロースのみが検出された。検出されたグルコース含量、トレハロース含量、その組成モル比の結果を表５に示す。
【００７８】
【表５】

糖質標品	グルコース（％）	トレハロース（％）	組成モル比（グルコース／トレハロース）
ＰＩ	３６．２	６３．８	１．０７
ＰＩＩ	５２．０	４８．０	２．０６
ＰＩＩＩ	６１．４	３８．６	３．０２
ＰＩＶ	６８．３	３１．７	４．０９
ＰＶ	７２．９	２７．１	５．１１

【００７９】
表５の結果から明らかなように、グルコアミラーゼにより、非還元性糖質ＰＩはグルコース１分子とトレハロース１分子に分解され、非還元性糖質ＰＩＩはグルコース２分子とトレハロース１分子に分解され、非還元性糖質ＰＩＩＩはグルコース３分子とトレハロース１分子に分解され、非還元性糖質ＰＩＶはグルコース４分子とトレハロース１分子に分解され、非還元性糖質ＰＶはグルコース５分子とトレハロース１分子に分解されることが判明した。
【００８０】
また、グルコアミラーゼの反応特性を考慮すると、これら非還元性糖質の構造はトレハロース分子にグルコース分子がα－１，４－結合、もしくはα－１，６－結合で結合した糖質で、それぞれ、ＰＩはトレハロース１分子にグルコース１分子が結合したグルコース重合度３の非還元性糖質で、ＰＩＩはトレハロース１分子にグルコース２分子が結合したグルコース重合度４の非還元性糖質で、ＰＩＩＩはトレハロース１分子にグルコース３分子が結合したグルコース重合度５の非還元性糖質で、ＰＩＶはトレハロース１分子にグルコース４分子が結合したグルコース重合度６の非還元性糖質で、ＰＶはトレハロース１分子にグルコース５分子が結合したグルコース重合度７の非還元性糖質であると判断される。なお、同様に、非還元性糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、またはＰＶにβ－アミラーゼを作用させたところ、非還元性糖質ＰＩ、ＰＩＩは分解されず、ＰＩＩＩはマルトースの１分子とＰＩの１分子に分解され、ＰＩＶはマルトースの１分子とＰＩＩの１分子に分解され、ＰＶはマルトースの２分子とＰＩの１分子に分解されることが判明した。
【００８１】
以上の結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素による反応は、基質の低分子化および高分子化を伴わない、換言すれば、グルコース重合度の変化を伴わない、分子内変換反応と判断され、また、この非還元性糖質生成酵素によって生成した非還元性糖質、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶおよびＰＶは、それぞれ、α－グルコシルトレハロース、α－マルトシルトレハロース、α－マルトトリオシルトレハロース、α－マルトテトラオシルトレハロースおよびα－マルトペンタオシルトレハロースで示されるα－グリコシルトレハロース（G_n－Ｔ：但し、Ｇはグルコース残基を意味し、ｎは１以上の整数を意味し、Ｔはα，α－トレハロースを意味する。）であると判断される。
【００８２】
【実験７　各種の酵素による分解】
実験４において調製した非還元性糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、またはＰＶのそれぞれを基質として、ブタすい臓由来α－アミラーゼ（シグマ社販売）、コメ由来

α－グルコシダーゼ（シグマ社販売）、またはラット小腸アセトン粉末酵素（シグマ社販売）のそれぞれに作用させた後、分解物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーで分析した。α－アミラーゼの反応は、それぞれの基質１０ｍｇを、５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．９）１ｍｌに溶解し、これに、酵素活性１単位加え、３７℃で１８時間保って行った。α－グルコシダーゼの反応は、５０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ４．０）を用いた以外、α－アミラーゼの場合と同様の条件で行った。ラット小腸アセトン粉末酵素の場合も、５０ｍＭマレイン酸緩衝液（ｐＨ６．０）を用いた以外、α－アミラーゼの場合と同様の条件で行った。α－アミラーゼによる分解物の糖組成を以下の表６に、α－グルコシダーゼおよびラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成を以下の表７、表８に示す。

【００８３】

【表６】

糖質標品	α－アミラーゼによる分解物の糖組成（％）				
	ＰＩ	ＰＩＩ	Ｇ３	Ｇ２	Ｇ１
ＰＩ	９７．３	０	２．３	０．４	０
ＰＩＩ	０	９８．８	０．４	０．８	０
ＰＩＩＩ	６１．０	４．８	０	３３．０	１．２
ＰＩＶ	４７．２	３．３	４０．４	７．５	１．６
ＰＶ	１０．２	４４．９	３５．３	８．６	１．０

（注）表中、Ｇ３はマルトトリオースを、Ｇ２はマルトースを、
Ｇ１はグルコースを意味する。

【００８４】

【表７】

糖質標品	α－グルコシダーゼによる分解物の糖組成		
	グルコース（％）	トレハロース（％）	その他（％）
ＰＩ	３６．５	６３．０	０．５
ＰＩＩ	５２．１	４７．６	０．３
ＰＩＩＩ	６１．７	３８．１	０．２
ＰＩＶ	６９．５	３０．２	０．３
ＰＶ	７１．４	２８．３	０．３

【００８５】

【表８】

糖質標品	ラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成		
	グルコース（％）	トレハロース（％）	その他（％）
ＰＩ	３７．２	６２．４	０．４
ＰＩＩ	５２．５	４７．１	０．４
ＰＩＩＩ	６２．０	３７．６	０．４
ＰＩＶ	６８．８	３０．８	０．４
ＰＶ	７３．４	２６．５	０．１

【００８６】
表６の結果から明らかなように、糖質標品、ＰＩ及びＰＩＩは、α－アミラーゼによりほとんど分解されないものの、糖質標品、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、およびＰＶはα－アミラーゼにより低分子のオリゴ糖、ＰＩ、ＰＩＩ、マルトトリオース、マルトース及びグルコースにまで分解されることが判明した。
【００８７】
また、表７、表８の結果から明らかなように、糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶいずれもα－グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により、実験６のグルコアミラーゼの場合と同様に、グルコースとトレハロースにまで分解されることが判明した。
【００８８】
また、同様にα－グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素によって分解されたそれぞれの反応物に、更に、１単位のブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社販売）を加え、ｐＨ５．７、３７℃で１８時間作用させ、高速液体クロマトグラフィー法で糖組成を分析したところ、糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、ＰＶいずれの場合も、α－グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により生成したトレハロースはトレハラーゼによりグルコースにまで分解することが判明した。
【００８９】
上述のように、
（１）　非還元性糖質生成酵素は、グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から、そのグルコース重合度を変化することなく、トレハロース構造を有する非還元性糖質を生成している。
（２）　非還元性糖質ＰＶは、α－アミラーゼにより、主に非還元性糖質ＰＩＩとマルトトリオースを生じ、非還元性糖質ＰＩＩは、グルコアミラーゼにより、トレハロース１分子とグルコース２分子を生じている。
これらの結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素は、還元性澱粉部分分解物の還元性末端を非還元性のトレハロース構造に分子内変換する全く新しい作用機作の酵素であると判断される。
【００９０】
【実験８　急性毒性】
７週齢のｄｄ系マウスを使用して、実験４において調製した非還元性糖質標品、ＰＩ、ＰＩＩ、ＰＩＩＩ、ＰＩＶ、またはＰＶを経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、これら非還元性糖質はいずれも低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、それらのＬＤ$_{50}$値は、いずれ

も５０ｇ／ｋｇ以上であった。
【００９１】
【実験９　アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６からの非還元性糖質生成酵素の生産】
リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６）を用いた以外は、実験１と同様にファーメンターで約７２時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は、約１．２単位／ｍｌであった。実験１と同様にして菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、それぞれ約０．５単位／ｍｌおよび約０．７単位／ｍｌであった。
【００９２】
【実験１０　酵素の精製】
実験９の方法で得られた培養液約１８ｌを用いて、実験２と同様に精製した。精製の各工程結果は表９にまとめた。
【００９３】
【表９】

工程	非還元性糖質生成酵素の活性量（単位）	比活性（単位／ｍｇ蛋白質）	収率（％）
培養液	２１，６００		１００
破砕後の上清	１７，５００	０．１４	８１
硫安塩析後の透析液	１５，７００	０．４１	７３
イオン交換カラム溶出液	１２，６００	６．５	５８
疎水カラム溶出液	８，８２０	９８	４１
ゲル濾過溶出液	５，２９０	２０１	２４

【００９４】
表９の工程で、ゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品を、実験２の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一な純度の高い標品であった。
【００９５】
【実験１１　酵素の性質】
実験１０で得られた精製酵素標品を、実験３の場合と同様に、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約７６，０００乃至８６，０００ダルトンであった。また、本精製酵素標品の等電点を実験３の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、ｐＩ約３．６乃至４．６であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、ｐＨの影響、および本酵素の温度安定性、ｐＨ安定性について、実験３の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図５に、ｐＨの影響を図６に、温度安定性を図７に、ｐＨ安定性を図８に示した。
【００９６】
図から明らかなように酵素の至適温度は４０℃付近、至適ｐＨは約６．５乃至７．０であ

る。温度安定性は４０℃付近までであり、ｐＨ安定性は約６．０乃至９．５である。

【００９７】

【実験１２　非還元性糖質の調製】

実験１０で得られた精製酵素標品を用いて、実験４および実験６の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の非還元性糖質を生成することが判明した。

【００９８】

【実験１３　公知微生物からの非還元性糖質生成酵素の生産とその性質】

公知微生物のうち、本発明の非還元性糖質生成酵素産生能の確認された表１０に示す特定の微生物を、マイコバクテリウム・スメグマチス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｍｅｇｍａｔｉｓ）ＡＴＣＣ１９４２０の場合に３７℃で培養した以外は、実験１の場合と同様にファーメンターで２７℃で７２時間培養した。それぞれの培養液約１８ｌを用いて、実験２の場合と同様に、培養液を破砕装置にかけ、その上清を硫安塩析、透析し、更にイオン交換カラムにかけ、部分精製酵素標品を得、その性質を調べた。結果を表１０にまとめた。

【００９９】

【表１０】

微生物名	イオン交換カラム溶出液（単位）	至適温度	至適ｐＨ	温度安定性	ｐＨ安定性
Ｂｒｅｖ．ｈ．	２，７００	３５℃付近	約６．５	３５℃付近まで	約５．５乃至１１
Ｆｌａｖ．ａ．	２１６	３５℃付近	約６．５乃至６．９	３５℃付近まで	約６．０乃至９．５
Ｍｉｃｒ．ｌ．	１，７３０	３５℃付近	約６．４乃至６．８	３５℃付近まで	約６．５乃至８．０
Ｍｉｃｒ．ｒ．	１，３４０	３５℃付近	約６．８乃至７．２	３５℃付近まで	約６．０乃至１１
Ｃｕｒｔ．ｃ．	１，２９０	３０℃付近	約６．４乃至６．８	３５℃付近まで	約６．５乃至７．８
Ｍｙｃｏ．ｓ．	３５８	３５℃付近	約６．５	３５℃付近まで	約６．０乃至９．０
Ｔｅｒｒ．ｔ．	１，０５０	３５℃付近	約６．５乃至７．０	３５℃付近まで	約６．０乃至９．５
リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１	１１，３００	４０℃付近	約７．０	４０℃付近まで	約６．０乃至９．０
アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６	１２，６００	４０℃付近	約６．５乃至７．０	４０℃付近まで	約６．０乃至９．５

（注）Ｂｒｅｖ．ｈ．：ブレビバクテリウム・ヘロボルム（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｈｅｌｏｖｏｌｕｍ）ＡＴＣＣ１１８２２
Ｆｌａｖ．ａ．：フラボバクテリウム・アクアチレ（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｑｕａｔｉｌｅ）ＩＦＯ３７７２
Ｍｉｃｒ．ｌ．：ミクロコッカス・ルテウス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｕｔｅｕｓ）ＩＦＯ３０６４
Ｍｉｃｒ．ｒ．：ミクロコッカス・ロゼウス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｏｓｅｕｓ）ＡＴＣＣ１８６
Ｃｕｒｔ．ｃ．：クルトバクテリウム・シトレウム（Ｃｕｒｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｃｉｔｒｅｕｍ）ＩＦＯ１５２３１
Ｍｙｃｏ．ｓ．：マイコバクテリウム・スメグマチス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｍｅｇｍａｔｉｓ）ＡＴＣＣ１９４２０
Ｔｅｒｒ．ｔ．：テラバクター・ツメスセンス（Ｔｅｒｒａｂａｃｔｅｒ　ｔｕｍｅｓｃｅｎｓ）ＩＦＯ１２９６０

【０１００】
また、これら公知菌由来の部分精製酵素を用いて、実験１２の方法に従って、非還元性糖

質の調製とその構造確認を行ったところ、いずれの酵素もリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上から選ばれる１種または２種以上の非還元性糖質を生成することが判明した。

【０１０１】

【実験１４　非還元性糖質生成酵素の部分アミノ酸配列】

（１）Ｎ末端アミノ酸配列

実験２の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の精製酵素標品および実験１０の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約８０マイクログラムをＮ末端アミノ酸配列分析用の試料とした。Ｎ末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサーモデル４７３Ａ（アプライドバイオシステムズ社製造、米国）を用い、Ｎ末端から１０残基まで分析した。それぞれ得られたＮ末端配列を表１１に示す。

【０１０２】

【表１１】

由来微生物	Ｎ末端アミノ酸配列
リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１	バリンまたはメチオニン－アルギニン－トレオニン－プロリン－アラニン－セリン－トレオニン－チロシン－アルギニン－ロイシン－
アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６	メチオニン－アルギニン－トレオニン－プロリン－バリン－セリン－トレオニン－チロシン－アルギニン－ロイシン－

【０１０３】

表１１から明らかなように、Ｎ末端アミノ酸配列は、その末端アミノ酸がリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来酵素の場合バリンまたはメチオニンで、アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６の場合のメチオニンと異なっているものの、分析したアミノ酸配列１０残基中の８残基までが一致している。その中でも第２番目のＬ－アルギニン残基から第４番目のＬ－プロリン残基まで３残基のアミノ酸配列、および第６番目のＬ－セリン残基から第１０番目のＬ－ロイシン残基まで５残基のアミノ酸配列は両酵素間で完全に一致している。すなわち、Ｎ末端アミノ酸配列は、X_1－アルギニン－トレオニン－プロリン－X_2－セリン－トレオニン－チロシン－アルギニン－ロイシン－（但し、X_1はバリンまたはメチオニンを意味し、X_2はアラニンまたはバリンを意味する。）の共通配列を有していることが判明した。

【０１０４】

（２）内部部分アミノ酸配列

実験２の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の精製酵素標品または実験１０の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の精製酵素標品

の一部をそれぞれ１０ｍＭトリス・塩酸緩衝液（ｐＨ９．０）に対して、透析した後、同緩衝液で約１ｍｇ／ｍｌの濃度になるように希釈した。これら試料液（１ｍｌ）それぞれに１０μｇのリジルエンドペプチターゼ（和光純薬株式会社販売）を加え、３０℃、２２時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相ＨＰＬＣを行った。リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来酵素の場合、カプセルパックＣ１８カラム（直径４．６ｍｍ×長さ２５０ｍｍ、株式会社資生堂製造）を用い、流速０．６ｍｌ／分、室温で、０．１ｖ／ｖ％トリフルオロ酢酸－１６ｖ／ｖ％アセトニトリル溶液から０．１ｖ／ｖ％トリフルオロ酢酸－４８ｖ／ｖ％アセトニトリル溶液の６０分間のリニアーグラジエントの条件で行った。アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来酵素の場合、マイクロボンダパックＣ１８カラム（直径２．１ｍｍ×長さ１５０ｍｍ、ウオーターズ社製造、米国）を用い、流速０．９ｍｌ／分、室温で０．１ｖ／ｖ％トリフルオロ酢酸－３０ｖ／ｖ％アセトニトリル溶液から０．１ｖ／ｖ％トリフルオロ酢酸－５５ｖ／ｖ％アセトニトリル溶液の６０分間のリニアーグラジエントの条件で行った。カラムから溶出したペプチドは、波長２１０ｎｍの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離したそれぞれ３ペプチド［リゾビウム属酵素由来ペプチド、Ｒ３７（保持時間約３７分）、Ｒ４０（保持時間約４０分）、Ｒ４２（保持時間約４２分）；アルスロバクター属酵素由来ペプチド、Ａ１７（保持時間約１７分）、Ａ２２（保持時間約２２分）、Ａ４０（保持時間約４０分）］を分取し、それぞれを真空乾燥した後、２００μｌの０．１ｖ／ｖ％乃至５０ｖ／ｖ％アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ１０残基までアミノ酸配列を分析した。得られた内部部分アミノ酸配列を表１２に示す。

【０１０５】

【表１２】

【０１０６】

表１２から明らかなように、リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１酵素のペプチドＲ３７の配列と、アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６酵素のペプチドＡ１７の配列とは完全に一致し、また、ペプチドＲ４０とペプチドＡ２２の配列も完全に一致した。ペプチドＲ４２とペプチドＡ４０とでは、分析した１０残基中の７残基が一致している。すなわち、ペプチドＲ４２とペプチドＡ４０の部分アミノ酸配列は、グルタミン酸－グリシン－アルギニン－X_3－セリン－X_4－チロシン－アラニン－X_5－アラニン－（但し、X_3は、グリシンまたはグルタミンを意味し、X_4はプロリンまたはアルギニンを意味し、X_5はバリンまたはグルタミン酸を意味する。）の共通配列を有している。

【０１０７】

以下、本発明の非還元性糖質、それを含む低還元性糖質およびトレハロースの製造方法を実施例Ａで、非還元性糖質、それを含む低還元性糖質および／またはトレハロースを含有せしめた組成物を実施例Ｂで示す。

【０１０８】

【実施例Ａ－１】

リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）を実験１の方法に準じて、ファーメンターで約３６時間培養した。培養後、ＳＦ膜を用いて除菌濾過し、約１８ｌの培養濾液を回収し、更に、その濾液をＵＦ膜濃縮し、本発明の非還元性糖質生成酵素濃縮液約１ｌ（１７．７単位／ｍｌ）を回収した。

【０１０９】

６％馬鈴薯澱粉乳を加熱糊化させた後、ｐＨ４．５、温度５０℃に調整し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉グラム当たり２５００単位の割合になるように加え、２０時間反応させた。その反応液をｐＨ６．０に調整し、オートクレーブ（１２０℃）を１０分間行い、次いで４５℃に冷却し、これにα－アミラーゼ（ノボ社製造、商品名ターマミール６０Ｌ）を澱粉グラム当たり１５０単位の割合になるよう加え、２４時間反応させた。

【０１１０】

その反応液をオートクレーブ（１２０℃）を２０分間行った後、４５℃に冷却し、これに上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり１単位の割合になるよう加え、９６時間反応させた。その反応液を９５℃に加熱し１０分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、Ｈ型及びＯＨ型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度７０％のシラップを固形物当り約９１％で得た。

【０１１１】

本品は、ＤＥ１８．８であって、非還元性糖質を固形物当り、ＰＩ　８．３％、ＰＩＩ　５．５％、ＰＩＩＩ　３７．７％、ＰＩＶ　１．４％、およびＰＶ　１．３％を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【０１１２】

【実施例Ａ－２】

実施例Ａ－１の方法で得られた糖液を原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（ＸＴ－１０１６、Na^+型、架橋度４％、東京有機化学工業株式会社製造）を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径５．４ｃｍのジャケット付ステンレス製カラム４本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長２０ｍとした。カラム内温度を５５℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して５ｖ／ｖ％加え、これに５５℃の温水をＳＶ０．１３で流して分画し、グルコース及びマルトース高含有画分を除去し、非還元性糖質高含有物を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉砕して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当り収率約６１％で得た。

【０１１３】

本品は、ＤＥ５．７であって、非還元性糖質を、固形物当たり、ＰＩ　９．３％、ＰＩＩ　７．４％、ＰＩＩＩ　５５．５％、ＰＩＶ　２．１％、ＰＶ　１．９％を含有しており、実施例Ａ－１と同様に、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【０１１４】

【実施例Ａ－３】

３３％とうもろこし澱粉乳に最終濃度０．１重量％となるように炭酸カルシウムを加えた後、ｐＨ６．５に調整し、これにα－アミラーゼ（ノボ社製造、商品名ターマミール６０Ｌ）を澱粉グラム当たり０．２重量％になるよう加え、９５℃で１５分間反応させた。その反応液をオートクレーブ（１２０℃）を１０分間行った後、５５℃に冷却し、これに特開昭６３－２４０７８４号公報で開示されているマルトテトラオース生成アミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉グラム当たり５単位の割合になるように加え、６時間反応させ、これにα－アミラーゼ（上田化学株式会社製造、商品名α－アミラーゼ２Ａ）を澱粉グラム当たり３０単位加え、更に、６５℃で４時間反応させた。その反応液を、オートクレーブ（１２０℃）を１０分間行い、次いで４５℃に冷却し、実施例Ａ－１の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり２単位の割合になるよう加え、６４時間反応させた。その反応液を９５℃で１０分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って活性炭で脱色し、Ｈ型及びＯＨ型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度７０％のシラップを固形物当り収率約９０％で得た。

【０１１５】

本品は、ＤＥ１０．５であって、非還元性糖質を、固形物当たり、ＰＩ　３．７％、ＰＩＩ　４３．７％、ＰＩＩＩ　１．２％、ＰＩＶ　１．１％、およびＰＶ　０．６％を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【０１１６】

【実施例Ａ－４】
実施例Ａ－３の方法で得られた糖液を原糖液とし、本液の非還元性糖質ＰＩＩ（グルコース重合度４）の含量を高めるため、分画用樹脂として、塩型強酸性カチオン交換樹脂（ダウケミカル社販売、商品名ダウエックス５０Ｗ－Ｘ４、Mg^{++}型）を用いた以外は、実施例Ａ－２の方法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、非還元性糖質ＰＩＩ高含量画分を採取した。更に、精製、濃縮し、噴霧乾燥して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当り収率約４０％で得た。
【０１１７】
本品は、非還元性糖質を固形物当り、ＰＩ　８．５％、ＰＩＩ　６８．０％、ＰＩＩＩ　１．４％含有しており、そのＤＥは、３．５を示し、極めて還元性が少なく、実施例Ａ－３と同様に、温和で上品な甘味を有しており、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。
【０１１８】
【実施例Ａ－５】
マルトペンタオース（株式会社林原生物化学研究所製造）の２０％水溶液に実施例Ａ－１の方法で調製した非還元性糖質生成酵素をマルトペンタオースグラム当たり１．０単位の割合になるよう加え、４５℃で４８時間反応させた。反応によりマルトペンタオースの約９３％が非還元性糖質ＰＩＩＩに変換した。その反応液を９５℃で１０分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、Ｈ型及びＯＨ型イオン交換樹脂により脱塩し、濃縮した。更に、非還元性糖質ＰＩＩＩ（グルコース重合度５）の含量を高めるため実施例Ａ－２と同様に、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラム分画を行い、ＰＩＩＩ高含有画分を採取した。本画分溶液を精製、濃縮し、噴霧乾燥して、高純度非還元性糖質粉末を固形物当り収率約５５％で得た。
【０１１９】
本品は、非還元性糖質を、固形物当たり　ＰＩＩＩ、９９．０％を含有しており、そのＤＥは、約０．２％未満しか示さず、極めて還元性が低い。本品は、かすかな甘味を有しており、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。
【０１２０】
【実施例Ａ－６】
澱粉部分分解物（松谷化学工業株式会社製造、商品名パインデックス＃４）４０重量部を水６０重量部に加熱溶解し、この溶液を４５℃、ｐＨ６．５に調整した後、実施例Ａ－１の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉部分分解物グラム当たり１単位の割合になるように加えて９６時間反応させ、次いで１００℃に１０分間加熱して、酵素を失活させた。本反応液を濃度約２０％まで希釈し、グルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム）を澱粉部分分解物グラム当たり１０単位加えて４０時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭にて脱色し、イオン交換樹脂にて脱塩し、濃度約６０％に濃縮した。本糖液中には固形物当たり２９．５％のトレハロースを含有していた。分画用樹脂として、塩型強酸性カチオン交換樹脂（オルガノ株式会社販売、商品名ＣＧ６０００、Ｎａ型）を用いた以外は、実施例Ａ－２の方法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当たり約９０％のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度約７５％に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約２％を加えて徐冷し、晶出率約４５％のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより１５０ｋｇ／cm^2の高圧にて噴霧した。これと同時に８５℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より４５℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、１０時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を得た。
【０１２１】

本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定化剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【０１２２】

【実施例Ａ－７】

馬鈴薯澱粉１重量部を澱粉当たり０．０１ｗ／ｗ％の割合にα－アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名ネオスピターゼ）を含む水６重量部に撹拌混合し、ｐＨ６．０に調整後、この懸濁液を８５乃至９０℃に保ち、糊化と液化を同時に起こさせ、直ちに１２０℃に５分間加熱して、ＤＥ１．０未満にとどめ、これを５５℃に急冷し、ｐＨ７．０に調整し、これに株式会社林原生物化学研究所製造、商品名プルラナーゼ（ＥＣ　３．２．１．４１）および実施例Ａ－３で述べたマルトテトラオース生成アミラーゼをそれぞれ澱粉グラム当たり１５０単位および８単位の割合で加え、ｐＨ７．０、５０℃で３６時間反応させた。

【０１２３】

この反応液を、オートクレーブ（１２０℃）を１０分間行い、次いで、４５℃に冷却し、これに実験１３の方法で調製したブレビバクテリウム・ヘロボルム　ＡＴＣＣ１１８２２由来の非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり２単位の割合になるよう加え、６４時間反応させた。この反応液を９５℃で１０分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、Ｈ型、ＯＨ型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して、噴霧乾燥して非還元性糖質含有粉末を固形物当たり収率約９０％で得た。

【０１２４】

本品は、ＤＥ　１１．２であって、非還元性糖質を、固形物当たり、ＰＩ　２．９％、ＰＩＩ　６１．５％およびＰＩＩＩ　０．８％を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【０１２５】

【実施例Ａ－８】

アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６）を実験９の方法に準じて、ファーメンターで約７２時間培養した。培養液を遠心分離して除菌し、上清をＵＦ膜で約１０倍に濃縮し、本発明の非還元性糖質生成酵素濃縮液（約１５．２単位／ｍｌ）を回収した。

【０１２６】

３０％とうもろこし澱粉乳を用いて、実施例Ａ－３の方法に準じて、α－アミラーゼ（ノボ社製造）、マルトテトラオース生成アミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）およびα－アミラーゼ（上田化学株式会社製造）を作用させ、オートクレーブ（１２０℃）処理し、次いで、４５℃に冷却し、これに上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり２単位になるよう加え、６４時間反応させた。次いで１００℃に１０分間加熱して酵素を失活させた。本反応液を、実施例Ａ－６の方法に準じて、グルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造）を作用させ、脱色、脱塩して濃度約６０％に濃縮した。本糖液中には、固形物当たり約２５％のトレハロースを含有していた。本糖液を実施例Ａ－６の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当たり約９５％のトレハロースを含有していた。本溶液を蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約４．０％のシラップとし、助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当たり１％加え、９５℃で５分間撹拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、１００℃で６時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉砕し、流動乾燥して、水分約０．３％の無水結晶トレハロース粉末を得た。

【０１２７】

本品は、食品、医薬品、化粧品、その原材料、または加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても有利に利用できる。

【０１２８】
【実施例Ｂ－１　甘味料】
実施例Ａ－４の方法で得た非還元性糖質高含有粉末１重量部に、α－グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社販売、商品名αＧスイート）０．０１重量部およびＬ－アスパルチル－Ｌ－フェニルアラニンメチルエステル（味の素株式会社販売、商品名アスパルテーム）０．０１重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約２倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約１／２に低下している。
【０１２９】
本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付に好適である。
【０１３０】
また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付にも好適である。
【０１３１】
【実施例Ｂ－２　ハードキャンディー】
濃度５５％蔗糖溶液１００重量部に実施例Ａ－３の方法で得た非還元性糖質含有シラップ３０重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分２％未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸１重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。
【０１３２】
本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出、変形も起こらない高品質のハードキャンディーである。
【０１３３】
【実施例Ｂ－３　チューインガム】
ガムベース３重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖４重量部および実施例Ａ－６の方法で得たトレハロース含水結晶粉末３重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。
【０１３４】
本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。
【０１３５】
【実施例Ｂ－４　加糖練乳】
原乳１００重量部に実施例Ａ－１の方法で得た非還元性糖質含有シラップ３重量部および蔗糖１重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度７０％に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。
【０１３６】
本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。
【０１３７】
【実施例Ｂ－５　乳酸菌飲料】
脱脂粉乳１７５重量部、実施例Ａ－２の方法で得た非還元性糖質高含有粉末８０重量部および特開平４－２８１７９５号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末５０重量部を水１，２００重量部に溶解し、６５℃で３０分間殺菌し、４０℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを３０重量部植菌し、３７℃で８時間培養して乳酸菌飲料を得た。
【０１３８】
本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。
【０１３９】

【実施例Ｂ－６　粉末ジュース】
噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末３３重量部に対して、実施例Ａ－２の方法で得た非還元性糖質高含有粉末５０重量部、蔗糖１０重量部、無水クエン酸０．６５重量部、リンゴ酸０．１重量部、Ｌ－アスコルビン酸０．１重量部、クエン酸ソーダ０．１重量部、プルラン０．５重量部、粉末香料適量をよく混合撹拌し、粉砕し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度４０℃とし、これに、実施例Ａ－１の方法で得た非還元性糖質含有シラップをバインダーとしてスプレーし、３０分間造粒し、計量、包装して製品を得た。
【０１４０】
本品は、果汁含有率約３０％の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。
【０１４１】
【実施例Ｂ－７　カスタードクリーム】
コーンスターチ１００重量部、実施例Ａ－３の方法で得た非還元性糖質含有シラップ１００重量部、マルトース８０重量部、蔗糖２０重量部および食塩１重量部を充分に混合し、鶏卵２８０重量部を加えて撹拌し、これに沸騰した牛乳１，０００重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて撹拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。
【０１４２】
本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。
【０１４３】
【実施例Ｂ－８　あん】
原料あずき１０重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約２１重量部を得た。この生あんに、蔗糖１４重量部、実施例Ａ－３の方法で得た非還元性糖質含有シラップ５重量部および水４重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約３５重量部得た。
【０１４４】
本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。
【０１４５】
【実施例Ｂ－９　パン】
小麦粉１００重量部、イースト２重量部、砂糖５重量部、実施例Ａ－７の方法で得た非還元性糖質含有粉末１重量部および無機フード０．１重量部を、常法に従って、水でこね、中種を２６℃で２時間発酵させ、その後３０分間熟成し、焼き上げた。
【０１４６】
本品は、色相、すだちともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。
【０１４７】
【実施例Ｂ－１０　ハム】
豚もも肉１，０００重量部に食塩１５重量部および硝酸カリウム３重量部を均一にすり込んで、冷室に１昼夜堆積する。これを水５００重量部、食塩１００重量部、硝酸カリウム３重量部、実施例Ａ－７の方法で得た非還元性糖質含有粉末４０重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で７日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。
【０１４８】
本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。
【０１４９】
【実施例Ｂ－１１　粉末ペプチド】

４０％食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社製造、商品名ハイニュートＳ）１重量部に、実施例Ａ－６の方法で得たトレハロース含水結晶粉末２重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、５０℃で減圧乾燥し、粉砕して粉末ペプチドを得た。

【０１５０】

本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【０１５１】

【実施例Ｂ－１２　粉末卵黄】

生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で６０乃至６４℃で殺菌し、得られる液状卵黄１重量部に対して、実施例Ａ－８の方法で得た無水結晶トレハロース粉末４重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

【０１５２】

本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【０１５３】

【実施例Ｂ－１３　化粧用クリーム】

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール２重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン５重量部、実施例Ａ－２の方法で得た非還元性糖質高含有粉末２重量部、α－グリコシル　ルチン１重量部、流動パラフィン１重量部、トリオクタン酸グリセリル１０重量部および防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにＬ－乳酸２重量部、１，３－ブチレングリコール５重量部および精製水６６重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて撹拌混合しクリームを製造した。

【０１５４】

本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【０１５５】

【実施例Ｂ－１４　固体製剤】

ヒト天然型インターフェロン－α標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン－α抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン－αを吸着させ、安定剤であるウシ血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、ｐＨを変化させて、ヒト天然型インターフェロン－αを実施例Ａ－５の方法で得た高純度非還元性糖質粉末を５％含有する生理食塩水を用いて溶出した。

【０１５６】

本液を精密濾過し、約２０倍量の無水結晶マルトース粉末（株式会社林原商事販売、商品名ファイントース）に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、１錠（約２００ｍｇ）当たりヒト天然型インターフェロン－αを約１５０単位含有する錠剤を得た。

【０１５７】

本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人１乃至１０錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リューマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【０１５８】

【実施例Ｂ－１５　糖衣錠】

重量１５０ｍｇの素錠を芯剤とし、これに実施例Ａ－６の方法で得たトレハロース含水結晶粉末４０重量部、プルラン（平均分子量２０万）２重量部、水３０重量部、タルク２５重量部および酸化チタン３重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約２３０ｍｇにな

るまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末６５重量部、プルラン１重量部および水３４重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢の在る外観の優れた糖衣錠を得た。

【０１５９】

本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【０１６０】

【発明の効果】

上記から明らかなように、本発明の新規非還元性糖質生成酵素は、温和な酵素反応条件下で還元性の澱粉部分分解物をそのグルコース重合度を変えることなく非還元性糖質に高収率で変換する。その非還元性糖質の分離、精製も容易であり、このようにして得られる非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびトレハロースは、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物の製造に有利に利用できる。

【０１６１】

従って、本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉に由来する澱粉部分分解物から、従来、望むべくして容易に得られなかったトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、およびこれから容易に製造されるトレハロースを、工業的に大量かつ安価に供給できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響の大きさは、澱粉科学、酵素科学、生化学などの学問分野は言うに及ばず、産業界、とりわけ食品、化粧品、医薬品分野は勿論のこと、農水畜産業、化学工業にも及び、これら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

【図１】リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図２】リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。

【図３】リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図４】リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来の非還元性糖質生成酵素のｐＨ安定性を示す図である。

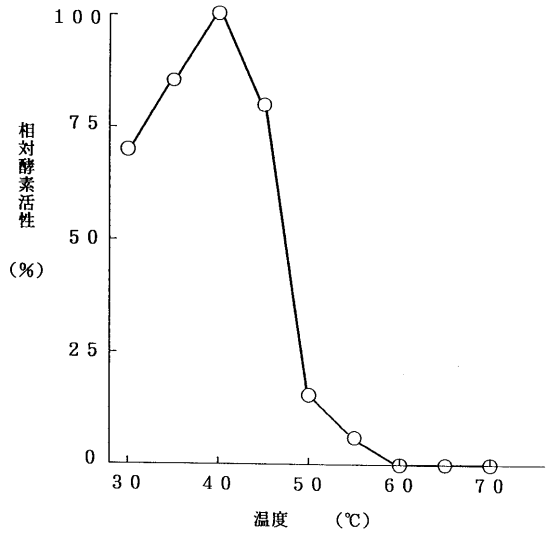
【図５】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図６】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。

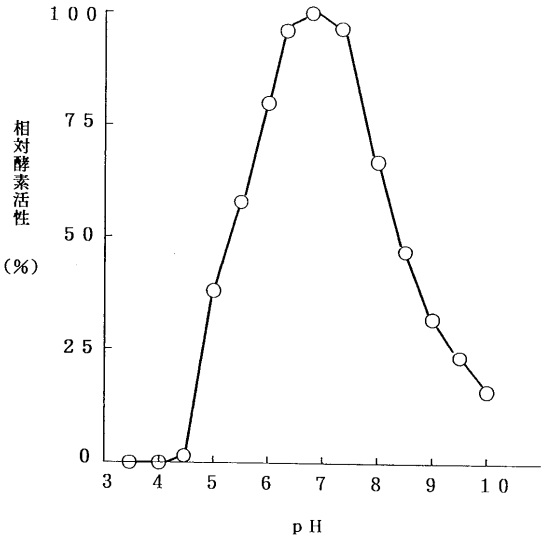
【図７】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図８】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素のｐＨ安定性を示す図である。

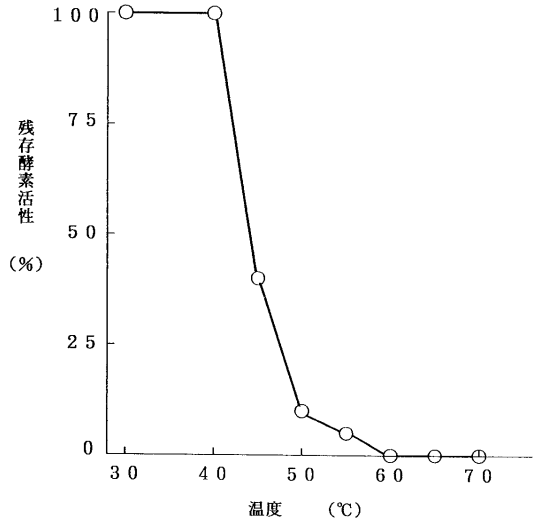
【図１】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
(%)
30
40
50
60
70
温度 (℃)

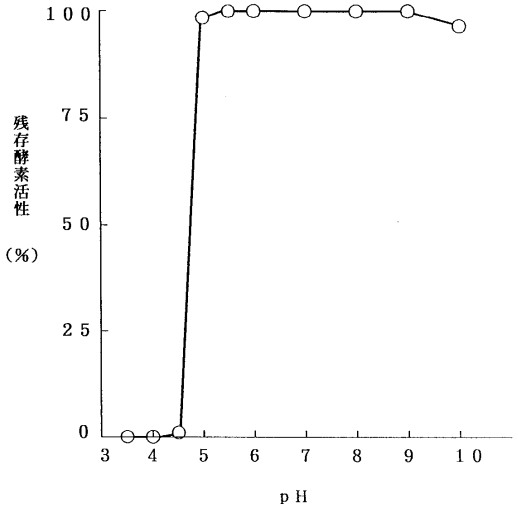
【図２】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

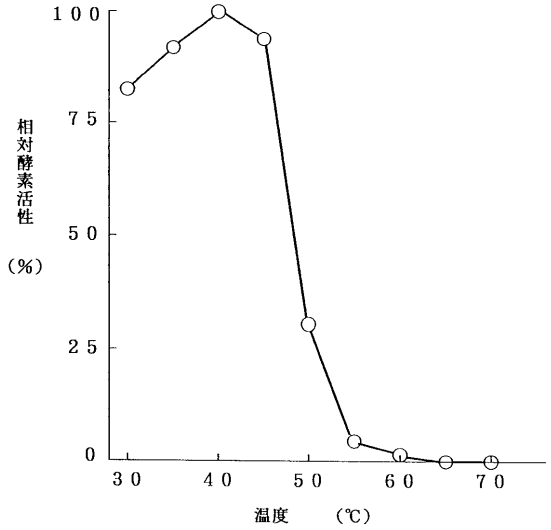
【図３】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
30
40
50
60
70
温度 (℃)

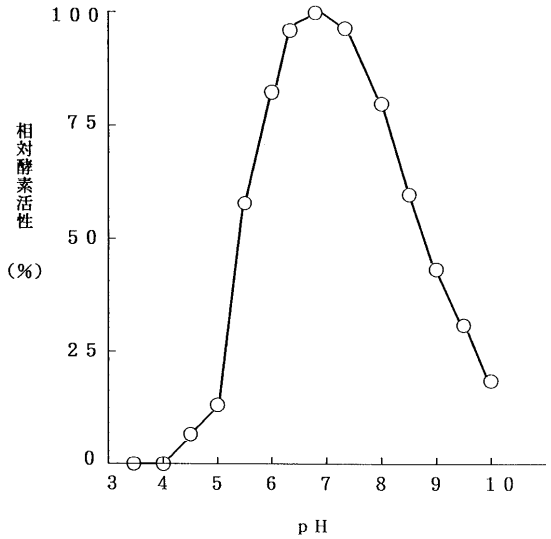
【図４】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

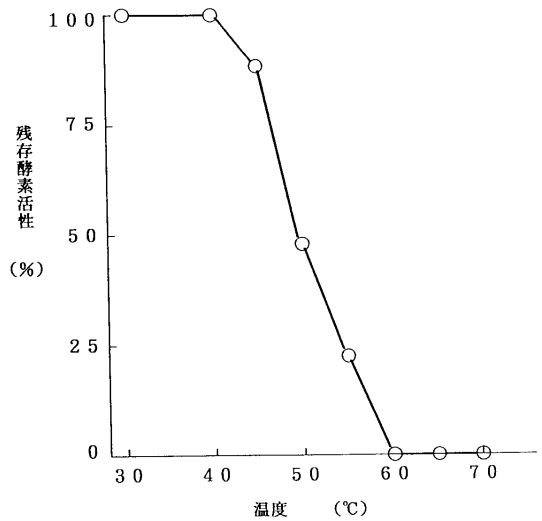
【図５】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
(%)
30
40
50
60
70
温度 (℃)

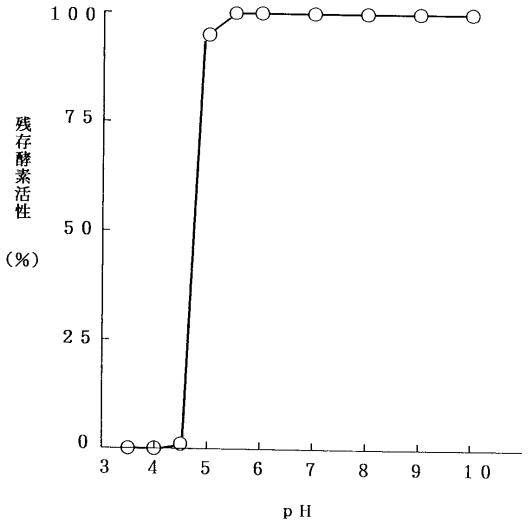
【図６】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

【図７】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
30
40
50
60
70
温度 (℃)

【図８】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

フロントページの続き

(56)参考文献 Bitechnology Letter, 1990, Vol.12, No.6, pages 431-2
Biotechnology Forum. Eur., 1991, Vol.8, No.4, pages 201-3

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12N 9/14-9/46
JSTPlus(JOIS)
BIOSIS/WPI(DIALOG)