

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7595018号  
(P7595018)

(45)発行日 令和6年12月5日(2024.12.5)

(24)登録日 令和6年11月27日(2024.11.27)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	19/18	(2006.01)	C 1 2 P	19/18	
C 1 2 P	19/16	(2006.01)	C 1 2 P	19/16	
A 2 3 L	11/00	(2021.01)	A 2 3 L	11/00	3 0 1 Z
A 2 1 D	2/18	(2006.01)	A 2 1 D	2/18	
A 2 1 D	13/80	(2017.01)	A 2 1 D	13/80	

請求項の数 14 (全35頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-551491(P2021-551491)  
 (86)(22)出願日 令和2年10月2日(2020.10.2)  
 (86)国際出願番号 PCT/JP2020/037581  
 (87)国際公開番号 WO2021/066159  
 (87)国際公開日 令和3年4月8日(2021.4.8)  
 審査請求日 令和5年8月7日(2023.8.7)  
 (31)優先権主張番号 特願2019-183875(P2019-183875)  
 (32)優先日 令和1年10月4日(2019.10.4)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)

(73)特許権者 397077760  
 ナガセヴィータ株式会社  
 岡山県岡山市中区藤崎6 7 5 番地 1  
 (74)代理人 110003074  
 弁理士法人須磨特許事務所  
 (72)発明者 安田 亜希子  
 日本国岡山県岡山市中区藤崎6 7 5 番地  
 1 株式会社林原内  
 (72)発明者 宮田 学  
 日本国岡山県岡山市中区藤崎6 7 5 番地  
 1 株式会社林原内  
 (72)発明者 山本 拓生  
 日本国岡山県岡山市中区藤崎6 7 5 番地  
 1 株式会社林原内  
 (72)発明者 溝手 晶子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環状四糖を含有する糖組成物とその用途並びに製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)乃至(3)の特徴を有する、サイクロ{ 6 } - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - D - グルコピラノシル - ( 1 ) で表される環状四糖を含有する糖組成物：  
 (1) 前記環状四糖に加えて、前記環状四糖に1分子又は2分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖を含有し、前記糖組成物にグルコアミラーゼ及び - グルコシダーゼを作用させたとき、得られる糖組成物の全固形物あたりの前記環状四糖含量が、無水物換算で、38質量%以上である；

(2) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 - 1 , 4 結合グルコースが占める割合が9%超15%以下である；及び

(3) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 - 1 , 4 , 6 結合グルコースが占める割合が6%未満である。

【請求項 2】

さらに、下記(4)の特徴を有する請求項1記載の糖組成物：

(4) 全固形物あたり、無水物換算で、前記環状四糖の含量が25質量%以上である。

【請求項 3】

さらに、下記(5)及び(6)の特徴を有する請求項1又は2記載の糖組成物：

(5) 全固形物あたり、無水物換算で、重合度1又は2の糖質を、合計で、16質量%以下含有する；及び

(6) 全固形物あたり、無水物換算で、前記環状四糖と前記環状四糖に1分子又は2分子のグルコースが結合した分岐環状四糖を除く重合度4乃至13の糖質を、合計で、37質量%超含有する。

【請求項4】

固形物濃度73質量%の水溶液にしたときの15での粘度が35Pa・s以下であ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糖組成物。

【請求項5】

固形物濃度73質量%の水溶液にしたときの水分活性が0.88未満であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の糖組成物。

【請求項6】

請求項1乃至5のいずれかに記載の糖組成物の還元物。

【請求項7】

請求項1乃至5のいずれかに記載の糖組成物及び/又は請求項6記載の還元物と他の材料とを含有する組成物。

【請求項8】

水溶液の形態にある請求項1乃至5のいずれかに記載の糖組成物又は請求項6記載の還元物又は請求項7記載の組成物。

【請求項9】

固形物濃度が70質量%以上である請求項8記載の組成物。

【請求項10】

食品、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、医薬品素材、飼料素材、餌料素材、肥料素材としての請求項1乃至5のいずれかに記載の糖組成物又は請求項6記載の還元物又は請求項7乃至9のいずれかに記載の組成物。

【請求項11】

澱粉部分分解物に - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と - イソマルトシル転移酵素とを作用させ、前記環状四糖を生成させる工程(工程1)と、生成した前記環状四糖を含む酵素反応物を精製し、採取する工程(工程2)を含み、工程1において澱粉枝切り酵素を併せて作用させること、さらに、全工程を通じて、単糖又は二糖を生成する作用を有するエキソ型アミラーゼを作用させる工程を含まないことを特徴とする、請求項1乃至5のいずれかに記載の糖組成物の製造方法。

【請求項12】

澱粉枝切り酵素としてイソアミラーゼ又はブルラナーゼを用いることを特徴とする請求項11記載の糖組成物の製造方法。

【請求項13】

工程1において、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを併せて作用させることを特徴とする請求項11又は12記載の糖組成物の製造方法。

【請求項14】

澱粉部分分解物に - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と - イソマルトシル転移酵素とを作用させ、前記環状四糖を生成させる工程(工程1)と、生成した前記環状四糖を含む酵素反応物を精製し、採取する工程(工程2)を含み、工程1において澱粉枝切り酵素を併せて作用させること、全工程を通じて、単糖又は二糖を生成する作用を有するエキソ型アミラーゼを作用させる工程を含まないこと、及び工程1の後、工程2における採取までの間に水素添加する工程を含むことを特徴とする、請求項6記載の糖組成物の還元物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な糖組成物に関し、詳細には、サイクロ{ (6) - - D - グルコピラノシル - (1 3) - - D - グルコピラノシル - (1 6) - - D - グルコピラノシル - (1 3) - - D - グルコピラノシル - (1 ) }で表される環状四糖を含有する新

10

20

30

40

50

規な糖組成物とその用途並びに製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイクロ{ 6 } - - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 6 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 ) で表される構造を有する環状四糖（以下、単に「環状四糖」という。）は、1994年にCoteにより発見された4分子のグルコースからなる環状の糖質（非特許文献1）であり、2000年代に本願と同じ出願人により土壌微生物由来の酵素を用いた製法が確立された（特許文献1、2）。環状四糖は、その構造ゆえに還元力を持たず安定性が高く、産業利用に期待がかかり、前記製造方法の確立を契機として、その後、応用研究が広く精力的に進められた。その結果、環状四糖が有する代表的な作用として、現在までに、例えば、低着色性（特許文献1、2）、低カロリー性（特許文献1、2）、食物繊維性（特許文献1、2）、ラジカル生成抑制作用（特許文献3）、脂質調節作用（特許文献4）、ミネラル吸収促進作用（特許文献5）などが知られるに至っている。これらの知見に基づけば、環状四糖又は環状四糖を含有する糖組成物を、例えば水あめの形態で、食品素材などとして広く普及させることができれば、安心、安全、健康への志向が高まる現代社会の要請にこたえることができると考えられる。

10

【0003】

一般に、水あめは、澱粉を酵素や酸で加水分解し、脱色、脱塩により精製し、濃縮して得られるものであることから、比較的低コストで製造でき、また、他の素材と混合等して最終製品を仕上げるまでの工程において固形の糖質を水に溶解させる必要がないので、食品製品の素材として広く好適に利用されている。かかる水あめに一般に求められる性質としては、例えば、（a）粘度が高すぎないこと、（b）水分活性が低いことが挙げられる。（a）の性質は、最終製品の製造における他の素材との混合などの工程での操作性を妨げないという観点から求められ、（b）の性質は、保存中の微生物汚染を避けるという観点から求められる性質である。また、環状四糖を含有する水あめの利用を考えた場合、これら（a）及び（b）の性質に加え、環状四糖本来の特徴を活かし、（c）十分に低着色性であり且つ（d）低カロリーであることが求められる。さらに、当然のことながら、（e）高濃度の水溶液（固形物濃度70質量%など）にした場合であっても保存中に糖の結晶が析出しないことが求められる。特許文献2などには、環状四糖を含有する水あめが種々開示されているが、本出願人が知る限り、かかる従来の水あめは、これら（a）乃至（e）の項目が食品分野で求められる水準に至らなかったために実用化には至っておらず、そのような水準を満たす水あめの提供を可能にする技術的な提案すらなされたことはない。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】国際公開第WO2002/010361号パンフレット

【文献】国際公開第WO2001/903338号パンフレット

【文献】国際公開第WO2004/020552号パンフレット

【文献】国際公開第WO2004/899964号パンフレット

【文献】国際公開第WO2005/007171号パンフレット

40

【非特許文献】

【0005】

【文献】ヨーロッパアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（European Journal of Biochemistry）、第226巻、641乃至648頁（1994年）

【文献】ジャーナル・オブ・バイオサイエンス・アンド・バイオエンジニアリング（Journal of Bioscience and Bioengineering）、第94巻、第4号、336乃至342頁（2002年）

【文献】ルミナコイド研究、第22巻、第1号、29乃至33頁（2018年）

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

かかる状況に鑑み、本発明は、比較的高濃度の糖質水溶液（水あめ）とした場合においても、粘度及び水分活性が十分に低く、十分に低着色性で低カロリーであり、しかも、保存中に糖の結晶が析出し難い性質を有する環状四糖含有水あめに適した糖組成物と、その用途並びに製造方法を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

上記した特許文献1などに記載された澱粉部分分解物に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させる環状四糖含有糖組成物の製造方法においては、通常、環状四糖とともに、環状四糖に1分子又は2分子以上のグルコースが結合した分岐構造を有する環状四糖（以下、「分岐環状四糖」という。）が生成する。そこで、本発明者らは、本発明が解決すべき課題を解決する方策を検討するにあたり、まず、酵素反応によって得られる糖組成物中、環状四糖及び分岐環状四糖の総量を糖組成物中最大とすることで環状四糖本来の特徴の一つである低カロリー性を担保することを最低限の必要条件としたうえで、その他の課題の解決策を鋭意検討することとした。この必要条件を満たすためには、特許文献1などに記載された製造方法、すなわち、澱粉部分分解物に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせることで作用させて環状四糖を生成させる方法によるのが最も好適と考えられた。しかしながら、環状四糖及びその他糖質の製造に関する長年にわたる経験を通じて本出願人に蓄積された知識とノウハウを駆使しても、低カロリー性を保持しつつ、良好な操作性と、低着色性を兼ね備えた糖組成物を得るには至らなかった。そこで、本発明者らは、従来の技術常識を排除し、さらに鋭意検討を重ねた。

## 【0008】

すなわち、本願の出願前、澱粉部分分解物に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを組合せて作用させる環状四糖の製造においては、イソアミラーゼなどにより基質とする糖質の枝切り反応を行うと、環状四糖の生成率は低下し、かかる酵素による環状四糖の生成には、 $\alpha$ -1,6グルコシド結合を介した分岐構造が基質に存在することが好適とされ（非特許文献2）、これが斯界における技術常識とされてきた。かかる状況下、澱粉枝切り酵素を併用することを含め、各種酵素の組合せにより環状四糖を含む糖組成物を調製し、その物性を広く比較、検討した。

## 【0009】

その結果、下記の(1)乃至(3)の特徴を有する環状四糖含有糖組成物は、上記に掲げた水あめに要請される性質を全て有するものであることが判明した

(1) 前記環状四糖に加えて、前記環状四糖に1分子又は2分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖を含有し、前記糖組成物にグルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させたとき、得られる糖組成物の全固形物あたりの前記環状四糖含量が、無水物換算で、38質量%以上である；

(2) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4結合グルコースが占める割合が9%超15%以下である；及び

(3) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4,6結合グルコースが占める割合が6%未満である。

## 【0010】

後に詳述する実験及び実施例に示されるとおり、上記(1)の特徴を有することで、十分に低カロリーの糖組成物とすることができ、また、上記(2)及び(3)の特徴を有することで、良好な操作性と低着色性を両立することができ、加えて、これら(1)乃至(3)の要件を満たす糖組成物は、水溶液にしたときに、十分に低い水分活性を示し、かつ、高濃度の水溶液としたときにも保存中に結晶が析出し難い画期的な糖組成物であることが判明した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 1 】

上記した特徴を有する環状四糖及び分岐環状四糖を含有する糖組成物は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを用いる環状四糖の生成反応において澱粉枝切り酵素を併用することにより初めて得られたものであり、従来の技術常識からは決して獲得しえなかった全く新規な糖組成物であるといえる。

## 【 0 0 1 2 】

加えて、本発明者らは、上記した糖組成物が食品ないしは食品素材用の水あめとして利用可能であるだけでなく、化粧品、医薬部外品などの各種用途に有用であることを確認した。

## 【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、下記(1)乃至(3)の特徴を有する、環状四糖を含有する糖組成物を提供することにより課題を解決するものである：

(1) 前記環状四糖に加えて、前記環状四糖に1分子又は2分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖を含有し、前記糖組成物にグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させたとき、得られる糖組成物の全固形物あたりの前記環状四糖含量が、無水物換算で、38質量%以上である；

(2) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4結合グルコースが占める割合が9%超15%以下である；及び

(3) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4,6結合グルコースが占める割合が6%未満である。

## 【 0 0 1 4 】

加えて、本発明は、上記特徴を有する糖組成物を含有する組成物を提供することにより、課題を解決するものである。

## 【 0 0 1 5 】

上述したとおり、上記した(1)乃至(3)の特徴を有する環状四糖及び分岐環状四糖を含有する糖組成物は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを用いる環状四糖の生成反応において澱粉枝切り酵素を併用することにより初めて得られるものである。したがって、本発明は、澱粉部分分解物に $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させ、前記環状四糖を生成させる工程(工程1)と、生成した前記環状四糖を含む酵素反応物を精製し、採取する工程(工程2)を含み、工程1において澱粉枝切り酵素を併せて作用させることを特徴とする、本発明の糖組成物の製造方法を提供することにより、課題を解決するものである。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 6 】

本発明によれば、例えば、固形物濃度70質量%程度以上の比較的高濃度の糖質水溶液(水あめ)とした場合においても、操作性がよく、微生物汚染を避けることができ、十分に低カロリーで、着色性が低く、結晶が析出し難い環状四糖含有糖組成物を提供することができるという利点が得られる。また、本発明の製造方法によれば、本発明に係る糖組成物を容易且つ安価に製造することが可能となるという利点が得られる。斯くして得られる本発明に係る糖組成物は、上述したとおり、一般に水あめ製品に求められる各種特性を備えているので、食品その他各種用途で広く利用することができるという利点を備えている。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 1 7 】

## 1. 用語の定義

本明細書において、以下に示す用語は、それぞれ以下に示す意味を有する。

## 【 0 0 1 8 】

## 1.1 環状四糖

本明細書において単に「環状四糖」という場合、グルコース4分子が $\alpha$ -1,6結合と $\alpha$ -1,3結合を介して交互に結合した環状のグルコ四糖、すなわち、サイクロ{6}- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1-3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1-6)-

10

20

30

40

50

- D - グルコピラノシル - ( 1 3 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 ) で表される環状四糖を意味する。

【 0 0 1 9 】

1 . 2 分岐環状四糖

本明細書において単に「分岐環状四糖」という場合、特に断りがない限り、環状四糖に 1 又は 2 分子以上のグルコースがグルコシド結合を介して結合した分岐構造を有する糖質を意味する。分岐環状四糖の具体例としては、環状四糖に 1 個のグルコースが - 1 , 4 グルコシド結合を介して結合した糖質、環状四糖に 1 個のイソマルトースが - 1 , 3 グルコシド結合を介して結合した糖質などが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

1 . 3 総環状四糖含量

本明細書において「総環状四糖含量」という場合、環状四糖と分岐環状四糖を含有する糖組成物にグルコアミラーゼと - グルコシダーゼを作用させたときに得られる糖組成物の全固形物あたりの無水物換算での環状四糖含量 ( 質量 % ) を意味する。総環状四糖含量は、環状四糖及び分岐環状四糖を含有する糖組成物が生体内で消化されて生成する環状四糖の多寡を反映するので、該糖組成物のエネルギー値の高低の指標とすることができる。

【 0 0 2 1 】

1 . 4 共存糖質

本明細書において単に「共存糖質」という場合、一の糖組成物に含まれる環状四糖及び分岐環状四糖以外の全ての糖質を意味する。共存糖質としては、例えば、グルコース、マルトース、イソマルトース、その他の結合様式のグルコ二糖、マルトトリオース、イソマルトトリオース、パノース、その他の結合様式のグルコ三糖、環状四糖及び分岐環状四糖以外の各種の結合様式の重合度 4 以上のグルコオリゴ糖ないしはグルカンが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

1 . 5 - 1 , 4 結合グルコース、 - 1 , 4 , 6 結合グルコースなど、並びに、それらの比率

本明細書でいう「 - 1 , 4 結合グルコース」とは、グルカンを構成する個々のグルコース残基の結合様式を決定するために一般に用いられるメチル化分析により検出される、1 位と 4 位の水酸基がそれぞれ他のグルコース残基と - グルコシド結合で結合しているグルコース残基を意味する。同様に、1 位、4 位及び 6 位の水酸基がそれぞれ他のグルコース残基と - グルコシド結合で連結している場合には、該グルコース残基を「 - 1 , 4 , 6 結合グルコース」と称する。さらに別の部位の水酸基で一のグルコース残基が他のグルコース残基と連結している場合には、その結合に与る水酸基の位置を表す番号をもって、同様にそのグルコース残基を称呼する ( 結合に与る水酸基の位置及びその組合せを本明細書では「結合様式」ということがある ) 。糖組成物を構成する全グルコース残基あたりの各結合様式のグルコース残基 ( - 1 , 4 結合グルコース、 - 1 , 4 , 6 結合グルコースなど。 ) が占める比率 ( 以下、各結合様式のグルコース残基の「含量」ということがある。 ) は、上記したメチル化分析により求めることができる。なお、1 位の水酸基のみが他のグルコース残基と結合しているグルコース残基、すなわち、非還元末端のグルコース残基は、本発明では「 - 1 結合グルコース」とは称さず、単に「非還元末端グルコース」と称する。なお、メチル化分析の原理および方法は、シューカヌ ( Ciucanu ) ら、カーボハイドレート・リサーチ ( Carbohydrate Research ) 、第 1 3 1 巻、第 2 号、2 0 9 - 2 1 7 頁 ( 1 9 8 4 ) に詳述されている。

【 0 0 2 3 】

1 . 6 - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

本明細書でいう「 - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素」とは、非還元末端の結合様式として - 1 , 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質から、還元力を実質的に増加させることなく - グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として - 1 , 6 グルコシド結合と非還元末端以外の結合様式として - 1 , 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質を生成する酵素を意味する。

10

20

30

40

50

イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性は、マルトトリオースを基質として反応させ、マルトトリオースから非還元末端のグルコースを他の糖に転移する反応により生成するマルトースを定量することにより測定する。酵素活性 1 単位は、マルトトリオースから 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のマルトースを生成する酵素量と定義する。

【0024】

#### 1.7 - イソマルトシル転移酵素

本明細書でいう「- イソマルトシル転移酵素」とは、非還元末端の結合様式として - 1, 6 グルコシド結合と非還元末端以外の結合様式として - 1, 4 グルコシド結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質から、- イソマルトシル転移を含む反応によって環状四糖を生成する酵素を意味する。- イソマルトシル転移酵素の酵素活性は、パノースを基質として反応させ、パノースからイソマルトースを他の糖に転移する反応により生成するグルコースを定量することにより測定する。酵素活性 1 単位は、パノースから 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のグルコースを生成する酵素量と定義する。

10

【0025】

#### 1.8 環状四糖生成酵素とその酵素活性単位

本明細書において単に「環状四糖生成酵素」という場合、- イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と - イソマルトシル転移酵素を含み、他の酵素を実質的に含まない酵素組成物を意味する。本明細書において、環状四糖生成酵素の酵素活性 1 単位は、可溶性デキストリンから 1 分間に環状四糖及び分岐環状四糖を環状四糖換算で合計  $1 \mu\text{mol}$  生成する酵素量と定義する。

20

【0026】

#### 1.9 イソアミラーゼの酵素活性単位

本明細書において、イソアミラーゼの酵素活性は、以下のように定義される。すなわち、0.83% (w/v) リントナー (Lintner) 可溶化ワキシコーンスターチ、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を含む基質水溶液 3 mL に対し、適宜希釈した酵素液 0.5 mL を加え、基質溶液を 40 に保ちつつ、反応 30 秒後と 30 分 30 秒後に基質溶液、を 0.5 mL ずつサンプリングし、直ちに 0.02 N 硫酸溶液を 1.5 mL ずつ加えて反応を停止させ、それぞれを対照液及び反応液とした。得られた対照液及び反応液に 0.01 N ヨウ素溶液を 0.5 mL ずつ加え、25 で 15 分間呈色させた後、吸光度計により波長 610 nm における吸光度をそれぞれ測定し、下記式 [1] により澱粉分解活性として算出する。イソアミラーゼの活性 1 単位とは、斯かる測定条件で、波長 610 nm の吸光度を 0.004 増加させる酵素の量と定義する。

30

【0027】

式 [1] :

【数 1】

$$\text{活性 (単位/mL)} = \frac{A_{610\text{nm}}^{\text{反応液}} - A_{610\text{nm}}^{\text{対照液}}}{0.004} \times \text{希釈倍率}$$

40

【0028】

#### 1.10 プルラーゼの酵素活性単位

本明細書において、プルラーゼの酵素活性は、以下のように定義される。すなわち、1.25% (w/v) プルラン (株式会社林原製、プルラーゼ活性測定用) 水溶液を基質溶液とする。この基質溶液 4 mL と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.5 mL とを試験管に取り、30 に予熱しておく。0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、適宜希釈した酵素液 0.5 mL を加え、基質溶液を 30 に保ちつつ、反応 30 秒後と 30 分 30 秒後に基質溶液を 0.5 mL ずつサンプリングし、直ちにソモジー銅液 2 mL に注入し反応を停止させ、それぞれを「対照液」及び「反応液」とした。得られた対照液及び反応液をソモジー・ネルソン法に供し、吸光度計により波長 520 nm における吸光度

50

をそれぞれ測定することにより生成した還元糖量を測定し、下記式〔2〕によりプルラン分解活性として算出する。プルラナーゼの活性1単位とは、斯かる測定条件で、1分間に1 $\mu$ molのマルトトリオースに相当する還元糖を遊離させる酵素の量と定義する。

【0029】

式〔2〕：

【数2】

$$\text{活性(単位/mL)} = \frac{A_{520\text{nm}}^{\text{反応液}} - A_{520\text{nm}}^{\text{対照液}}}{A_{520\text{nm}}^{\text{標準液}}} \times 100 \times \frac{5}{0.5} \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{30} \times \text{希釈倍率}$$

標準液には、D-グルコース(100 $\mu$ g/mL)を使用

10

【0030】

1.11 シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの酵素活性

本明細書において、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(以下「CGTase」という。)の酵素活性は以下のように定義される。すなわち、0.3%(w/v)可溶性澱粉、20mM酢酸緩衝液(pH5.5)、1mM塩化カルシウムを含む基質水溶液5mLに対し、適宜希釈した酵素液0.2mLを加え、基質溶液を40に保ちつつ、反応0分後及び反応10分後に基質溶液を0.5mLずつサンプリングし、直ちに0.02N硫酸溶液15mLに加えて反応を停止させた後、各硫酸溶液に0.1Nヨウ素溶液を0.2mLずつ加えて呈色させ、20分後、吸光度計により波長660nmにおける吸光度をそれぞれ測定し、下記式〔3〕により澱粉分解活性として算出する。CGTase活性1単位は、斯かる測定条件で、溶液中の澱粉15mgのヨウ素呈色を完全に消失させる酵素量と定義する。

20

【0031】

式〔3〕：

【数3】

$$\text{活性(単位/mL)} = \frac{A_{660\text{nm}}^{\text{反応0分}} - A_{660\text{nm}}^{\text{反応10分}}}{A_{660\text{nm}}^{\text{反応0分}}} \times \frac{1}{0.2} \times \text{希釈倍率}$$

30

【0032】

1.12 還元力

本明細書でいう「還元力」とは、D-グルコースを標準物質として用い、斯界において汎用されるソモジー・ネルソン法及びアンスロン硫酸法により糖組成物の還元糖量及び全糖量をそれぞれD-グルコース換算で求め、下記式〔4〕を用いて求めることができる、糖組成物における全糖量に対する還元糖量の百分率(%)を意味する。

【0033】

式〔4〕：

【数4】

$$\text{還元力(\%)} = \frac{\text{還元糖量}}{\text{全糖量}} \times 100$$

40

【0034】

以下、本発明の糖組成物、その用途及び製造方法を具体的に説明する。

【0035】

50



## 2. 本発明の糖組成物

本発明の糖組成物は、下記(1)乃至(3)の特徴を有する：

(1) 前記環状四糖に加えて、前記環状四糖に1分子又は2分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖を含有し、前記糖組成物にグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させたとき、得られる糖組成物の全固形物あたりの前記環状四糖含量が、無水物換算で、38質量%以上である；

(2) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4結合グルコースが占める割合が9%超15%以下である；及び

(3) メチル化分析において、該糖組成物を構成する全グルコース残基あたり、 $\alpha$ -1,4,6結合グルコースが占める割合が6%未満である。

### 【0036】

本発明の糖組成物は、環状四糖及び分岐環状四糖とともにその他の共存糖質を含む糖組成物である。特許文献2に示されるように、環状四糖及び分岐環状四糖はそれ自体、非還元性で着色のおそれがなく、かつ、エネルギー源になり難い一方、その他の共存糖質は、通常、還元力を有するため着色の原因となり、且つ、エネルギー源になりうる。したがって、上記した(1)の特徴は、環状四糖構造を有する糖質の総量が糖組成中最大になるようにすることに直接かわり、該糖組成物の低カロリー性を担保するために必要な要件である。総環状四糖含量が38質量%を下回ると、必然的に、着色の原因及びエネルギー源となりうる共存糖質の比率が高まり、低カロリーであり且つ低着色性であるという本発明に係る糖組成物の特徴は実現し難くなる。

### 【0037】

上記(2)及び(3)の特徴は、本発明の糖組成物を、それを構成するグルコース残基を結合様式によって特徴付けるものである。メチル化分析において、全グルコース残基中、 $\alpha$ -1,4結合グルコース残基が占める割合の下限が9%超、好ましくは9.2%以上、より好ましくは9.5%以上、さらに好ましくは10%以上、上限が、15%以下、好ましくは14.5%以下、より好ましくは14%以下の範囲にあり、 $\alpha$ -1,4,6結合グルコースの占める割合が6%未満である場合には、高濃度の水溶液にした場合であっても十分な低粘度と低着色性を両立することができる。加えて、以上の特徴を有する本発明の糖組成物は、通常の水あめと同様の固形物濃度の水溶液において、十分に低い水分活性を示す。

### 【0038】

本発明の糖組成物のより好適な具体例の一つとして、上記した(1)乃至(3)の特徴に加え、さらに、

(4) 全固形物あたり、無水物換算での環状四糖の含量が25質量%以上である；ことを特徴とする糖組成物を挙げることができる。上記(4)の特徴は、食物のエネルギー値を計算するための係数であるエネルギー換算係数が0 kcal/gである環状四糖(後述する参考試験に示すとおり)の含量の下限値を規定するものであり、これにより、全体として、低カロリーの本発明の糖組成物を提供することができ、さらに、全固形物あたりの無水物換算での環状四糖の含量を30質量%以上とするのがより好適である。

### 【0039】

本発明の糖組成物のより好適な別の具体例として、さらに、

(5) 全固形物あたり、無水物換算で、重合度1及び2の糖質を、合計で、16質量%以下含有する；

(6) 全固形物あたり、無水物換算で、環状四糖とグルコースが1分子又は2分子結合した分岐環状四糖を除く重合度4乃至13の糖質を、合計で、37質量%超含有する；

本発明の糖組成物を挙げることができる。上記(5)の特徴は、エネルギー源となりうる上に着色性に悪影響を及ぼす重合度1及び2の糖類の含量の上限値を規定するものであり、これにより、全体として着色性に問題がなく、より低カロリーの本発明の糖組成物を提供することができ、同含量を15質量%以下とするのがより好適である。上記(6)の特徴は、本発明者らが独自に見出した、低カロリー性と低着色性をより顕著に発揮すること

10

20

30

40

50

に関わる指標であり、本出願人が知る限り、環状四糖含有水あめを製造する従来技術の単なる組合せでは決してなしえなかった特徴である。なお、上記(6)の特徴において、前記環状四糖に3分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖が重合度4乃至13の糖質から除かれていないのは、前記環状四糖に3分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖は、同じ重合度の他の糖質と分離することが一般に難しく、それだけを取り出して定量することが困難であるとともに、本発明に係る製造方法においても、前記環状四糖に3分子以上のグルコースが結合した分岐環状四糖は生成するものの、その生成量が極微量であるためである。

#### 【0040】

以上のとおり特徴づけられる本発明の糖組成物は、固形物濃度73質量%の水溶液としたとき、15の環境下において、通常、35Pa・s以下、好適には、30Pa・s以下、より好適には、27Pa・sの粘度を示す。かかる粘度は、従来の環状四糖含有糖組成物の水溶液では、低着色性とは両立しえなかった低いレベルであり、低着色性を維持しつつ、比較的低温の作業環境においても、容器から取り出し、他の素材と混合し、最終製品に仕上げるまでの操作性が良好であるという特性を担保するものである。また、本発明の糖組成物は、同じ濃度の水溶液とした場合、水分活性が、通常、0.88未満、好適には、0.87未満、より好適には、0.86未満を示し、これは、食品製造において雑菌汚染を抑えるために通常求められるレベルに十分に達するものである。

10

#### 【0041】

さらに、本発明の糖組成物の有用な特徴として、食物繊維性を示すことが挙げられる。本発明の糖組成物は、高速液体クロマトグラフ法(酵素-HPLC法)により求められる水溶性食物繊維含量が、通常、40質量%以上、好適には、50質量%以上、さらに好適には、60質量%以上である。また、本発明の糖組成物は、還元力によっても特徴付けることができ、その還元力は、通常、7.5%以上17%以下、好適には8.0%以上15%以下である。

20

#### 【0042】

以上説明したような本発明の糖組成物は、常法に従い水素添加することで該糖組成物の還元物として提供することもできる。

#### 【0043】

### 3. 本発明の糖組成物を含有する組成物

上記したとおり、本発明の糖組成物及びその還元物は、粘度及び水分活性が十分に低く、十分に低着色性であり且つ低カロリーであり、水溶液としたときに結晶が析出し難いので、高濃度の水溶液に調整して環状四糖含有水あめとして、また、そのまま、食品として、さらに、例えば、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、肥料などの用途で用いる粉末化基材、結着剤や賦形剤などとして、さらには、適宜の他の材料と組み合わせ、例えば、飲食物、飲食物素材、化粧品素材、医薬部外品素材、医薬品素材、飼料素材、餌料素材、肥料素材などに有利に利用することができる。本発明は、これらのような本発明の糖組成物と他の材料とを含有する組成物を提供するものでもある。

30

#### 【0044】

本発明の糖組成物やその還元物を、水溶液とし、環状四糖含有水あめ乃至環状四糖含有糖組成物の還元水あめとして利用する場合、その固形物濃度は、通常、70質量%以上、望ましくは、71質量%以上、より望ましくは、73質量%上とするのが好適である。環状四糖含有水あめ乃至環状四糖含有糖組成物の還元水あめの形態にある組成物(以下、「本発明の環状四糖含有水あめ」という。)を配合ないしは仕込みすることができる飲食物の具体例としては、合成酒、醸造酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビール、リキュールなどの酒類、炭酸飲料、乳飲料、スムージー、野菜ジュース、ゼリー飲料、スポーツドリンク、酢飲料、豆乳飲料、鉄含有飲料、乳酸菌飲料、緑茶、紅茶、ココア、コーヒー、ノンアルコールドリンクなどの飲料、米飯、粥、餅、トッポギ、パンなどの主食類、うどん、蕎麦、素麺、冷や麦、ラーメンなどの麺類、スパゲッティ、ラザニア、マカロニ、ペンネなどのパスタ類、春巻きの皮、餃子の皮などの小麦粉加工品、味噌汁、トムヤムクン、クラム

40

50

チャウダー、ソルロンタンなどのスープ類、ヨーグルト、チーズ、粉ミルクなどの乳製品、ソーセージ、ハムなどの畜肉製品、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、魚肉ソーセージなどの魚肉製品、魚介類の缶詰、干物、塩辛、松前漬けなどの水産加工品、てんぷら、フライ、ハンバーグ、たこ焼き、シュウマイ、コロケ、介護食、流動食などの調理食品およびそれらを冷凍した冷凍食品、ソフトキャンディー、ハードキャンディー、グミ、ゼリー、クッキー、ソフトクッキー、せんべい、あられ、おこし、化米、求肥、餅類、わらび餅、まんじゅう、ういろう、餡類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、ペクチンゼリー、ムース、ババロア、カステラ、ビスケット、クラッカー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、生クリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ホットケーキ、マフィン、ドーナツ、チョコレート、ガナッシュ、シリアルバー、チューインガム、キャラメル、ヌガー、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、ジャム、マーマレード、マシュマロ、プロテインバー、シリアルバー、エナジーバーなどの菓子、アイスクリーム、シャーベット、ジェラートなどの氷菓、更には、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、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、トマトソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、焼き鳥のタレ、かば焼きのたれ、から揚げ粉、天ぷら粉、バター粉、たこ焼き粉、お好み焼き粉、パン粉、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、煮物つゆ、煮魚用調味液、魚卵調味液、干物の調味液、複合調味料、みりん、新みりんなどの各種調味料や調理加工品などが挙げられる。なお、発酵によって作られる飲食品に関しては、本発明の環状四糖水あめを、発酵後に添加するのみならず、発酵前に添加し本発明の環状四糖水あめを発酵原料とすることも随意である。

#### 【0045】

環状四糖は、それ自体安定な物質であるほか、保湿、離水防止、たんぱく質変性防止、脂質劣化防止などの効果があるので、本発明の環状四糖含有水あめは、化粧品に配合して利用することも有利に実施できる。かかる化粧品において、本発明の環状四糖含有水あめは、通常、皮膚への適用が許容される他の成分の1種又は2種以上、例えば、皮膚への外用が許容される、油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、エステル類、アルコール類、界面活性剤、色素、香料、ホルモン類、ビタミン類、植物エキス、動物エキス、微生物エキス、塩類、紫外線吸収剤、感光色素、抗酸化剤、防腐・殺菌剤、制汗・消臭剤、清涼剤、キレート剤、美白剤、消炎剤、酵素、糖質、アミノ酸類、増粘剤などから適宜選ばれる1種又は2種以上とともに配合される。本発明の環状四糖含有水あめが配合される化粧品としては、例えば、ローション、クリーム、乳液、ゲル、粉末、ペースト、ブロックなどの形態で、石けん、化粧石けん、洗顔クリーム、洗顔フォーム、フェイシャルリンス、ボディシャンプー、ボディリンス、シャンプー、リンス、髪洗い粉などの清浄用化粧品、セットローション、ヘアブロー、チック、ヘアクリーム、ヘアスプレー、ヘアリキッド、ヘアトニック、ヘアローション、養毛料、染毛料、頭皮用トリートメント、びん付油、つや出し油、髪油、スキ油などの頭髪化粧品、化粧水、バニシングクリーム、エモリエントクリーム、エモリエントローション、パック用化粧品(ゼリー状ピールオフタイプ、ゼリー状ふきとり型、ペースト状洗い流し型、粉末状など)、クレンジングクリーム、コールドクリーム、ハンドクリーム、ハンドローション、乳液、保湿液、アフターシェービングローション、シェービングローション、プレシェーブローション、アフターシェービングクリーム、アフターシェービングフォーム、プレシェーブクリーム、化粧用油、ベビーオイルなどの基礎化粧品、ファンデーション(液状、クリーム状など)、タルカムパウダー、ベビーパウダー、ボディパウダー、パヒュームパウダー、メイクアップベース、おしろい(クリーム状、ペースト状、液状、粉末など)、アイシャドウ、アイクリーム、マスカラ、眉墨、まつげ化粧料、頬紅、頬化粧水などのメイクアップ化粧品、香水、練香水、粉末香水、オーデオロン、パフュームコロン、オードトワレなどの芳香化粧品、日焼けクリーム、日焼けローション、日焼けオイル、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止めオイルなどの日焼け・日焼け止め化粧品、マニキュア、ペディキュア、ネイルカラー、ネイルラッカー、エナメルリムーバー、ネイルクリーム、爪化粧料などの爪化

粧品、アイライナー化粧品、口紅、リップクリーム、練紅、リップグロスなどの口唇化粧品、練歯磨、マウスウォッシュなどの口腔化粧品、バスソルト、バスオイル、浴用化粧料などの入浴用化粧品などが挙げられる。

【 0 0 4 6 】

本発明の環状四糖含有水あめは、それ自体が低カロリーであることに加え、組み合わせで配合する他の成分を安定化する効果があるので、医薬品の添加剤、賦形剤などとしても有利に利用できる。本発明の環状四糖含有水あめを配合できる医薬品としては、例えば、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、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質製剤、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製剤、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素製剤、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製剤、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、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含有液、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などが挙げられ、これらの医薬品は、液状、ペースト状、半固状、タブレット状などの剤型で提供することができる。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の糖組成物は、最終用途など目的に応じて、他の素材と組み合わせた組成物の形態で、中間製品やプレミックスなどとして提供することも随意である。飲食物や経口摂取される医薬部外品、医薬品の用途向けに利用できる他の素材としては、経口摂取される素材として許容されるものである限り特に制限はなく、例えば、ソルビトール、マルチトール、イソマルチトール、マルトトリイトール、エリスリトール、キシリトール、ラクチトール、パニトール、トレハロース、グリコシルトレハロース、セラギノース、セラギノオリゴ糖、 $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリン、 $\gamma$ -サイクロデキストリンなどの糖アルコール類を含む非還元性糖質；イソマルトデキストリン、難消化性グルカン、ポリデキストロース、デキストラン、イヌリン、フラクトオリゴ糖などの水溶性食物繊維；アラビアガム、グアガム、ローカストビーンガム、カラギニナン、ペクチン、ヘミセルロース、プルランなどの水溶性多糖類；ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -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、アセスルファムK、ソーマチン、モネリンなどの高甘味度甘味料；グリシン、アラニン、グルタミン酸、グルタミン酸塩、大豆ペプチドなどのアミノ酸およびたんぱく質；イノシン酸、イノシン酸塩、グアニル酸、グアニル酸塩などの核酸；グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチン、サポニン、カゼインナトリウムなどの乳化剤；ビタミンCおよびその糖誘導体、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチン、ヘスペリジンおよびその糖誘導体、ナリンジンおよびその糖誘導体などのビタミン類；緑茶、ウーロン茶、ルイボス茶、ジャスミン茶、コーヒー、ジュースなどの、茶葉、果実その他植物の抽出物乃至は搾汁などが挙げられる。化粧品や皮膚外用の医薬部外品、医薬品の用途向けに利用できる他の素材としては、皮膚外用に供する素材として許容されるものである限り特に制限はなく、飲食物の用途向けとして上記に例示した他の素材の他に、例えば、クインシード、アルギン酸ナトリウム、カチオン化セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチル澱粉、アルギン酸プロピレングリコール、コラーゲン、ケラチン、カゼイン、アルブミン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリドエーテル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン-ビニルアセテート共重合体、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルメチルエーテル、カルボキシビニルポリマーなどの水溶性高分子；アスコルビン酸2-グルコシド、コウジ酸、乳酸、アントラニル酸、クマリン、ベンゾトリアゾール、イミダゾリン、ピリミジン、ジオキサソリン、フラン、ピロン

20

30

40

50

、ニコチン酸、アルブチン、バイカリン、バイカレインなどの美白剤；没食子酸プロピル、没食子酸ブチル、没食子酸オクチル、没食子酸ドデシル、ノルジヒドロガイアレン酸、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、4 - ヒドロキシメチル 1 - 2 , 6 - ジターシャリーブチルフェノールなどの抗酸化剤；陰イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤、両イオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤などの界面活性剤などが挙げられる。

【0048】

以上のような特徴を有する本発明の糖組成物を含有する組成物並びに環状四糖含有水あめは、家畜、家禽、ペット、その他蜜蜂、蚕、魚介類、エビ、カニなどの甲殻類、ウニ、ナマコなどの棘皮動物、昆虫の幼虫、幼体、成体などのための飼料、餌料に配合する素材として、また、発芽植物、幼苗、移植菌などの幼体に与える肥料に配合する素材などとして、有利に利用できる。

10

【0049】

4 . 本発明の糖組成物の製造方法

以下、本発明の糖組成物の製造法について説明する。本発明の糖組成物の製造方法は、澱粉部分分解物に  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素とを作用させ、環状四糖を含有する糖組成物を生成させる工程（工程1）と、工程1により生成した糖組成物を精製し、採取する工程（工程2）を含む糖組成物の製造方法であって、工程1において澱粉枝切り酵素を併せて作用させることを特徴とする。

【0050】

本発明の製造方法で用いる  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素は、本発明の糖組成物を生成するものである限り、その給源は問わない。給源としては、具体的には、特許文献2などに開示された、バチルス属やアルスロバクター属の微生物が挙げられ、とりわけ、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9株 (FERM BP - 7143)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11株 (FERM BP - 7144)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) N75株 (FERM BP - 7951) やこれらの変異株、アルスロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) N75株 (FERM BP - 7591) やそれらの変異株は当該両酵素の給源として好適である。当該両酵素は、それぞれが分離精製された精製酵素であっても、当該両酵素を含む粗精製酵素であってもよく、さらには、給源微生物などの抽出物や培養物などであってもよい。上記に例示した微生物株やそれらの変異株は、常法により培養すると、通常、当該両酵素を培地中にも産生するので、当該培養物から菌体を濾過して得られる濾液の濃縮液は、当該両酵素を含む環状四糖生成酵素剤として利用でき、かかる酵素剤は、その製造にかかるコストや労力が少ない点でとりわけ好適である。また、当該両酵素をコードする遺伝子を単離し、遺伝子組み換えにより得られる酵素を用いてもよいことは言うまでもない。

20

30

【0051】

上記した2種の酵素により環状四糖を生成させる材料として、澱粉部分分解物を用いる。澱粉の起源には特に制限はなく、トウモロコシ、小麦、米などに由来する地上澱粉であっても、馬鈴薯、サツマイモ、タピオカなどの地下澱粉であってもよい。かかる澱粉の部分加水部分分解物は、常法により澱粉を酸又は  $\alpha$  - アミラーゼなどで処理することで得ることができる。加水分解の度合いが低い程、環状四糖の生成率が高く好適であり、加水分解の度合いを表す指標として知られるDE (Dextrose Equivalent) で示すと、通常、20以下、望ましくは、12以下、より望ましくは、7以下が好適である。

40

【0052】

本発明の糖組成物の製造方法は、上記したような澱粉部分分解物に  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる工程1において、澱粉枝切り酵素を併せて作用させることが大きな特徴の一つである。本発明で用いる澱粉枝切り酵素としては、本発明の糖組成物を生成しうる限りその種類や給

50

源に特に制限はなく、例えば、イソアミラーゼ (EC 3.2.1.68)、プルラーゼ (EC 3.2.1.41)、オリゴ-1,6-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.10)、アミロ-1,6-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.33)などを挙げる事ができ、このうち、シュードモナス・アミロデラモサ (*Pseudomonas amylooderamosa*)が産生するイソアミラーゼや、バチルス属 (*Bacillus* sp.)微生物が産生するプルラーゼは、環状四糖の生成反応を妨げることなく、結果として得られる糖組成物の粘度を低くする効果が高いので、とりわけ好適である。

#### 【0053】

上記した酵素作用により環状四糖を生成させる工程1において、CGTase (EC 2.4.1.19)を併せて作用させると、環状四糖の生成率をさらに高めることができるので、上記した酵素に加え、CGTaseを併用することも随意である。CGTaseの給源に特に制限はなく、例えば、その給源としては、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス (*Geobacillus stearothermophilus*)、パエニバチルス・イリノイセンシス (*Paenibacillus illinoisensis*)、パエニバチルス・パブリ (*Paenibacillus pabuli*)、パエニバチルス・アミロリティカス (*Paenibacillus amylolyticus*)などが挙げられ、このうち、ジオバチルス・ステアロサーモフィラスが産生するCGTaseは、環状四糖の生成率を高める効果が高く、とりわけ有用である。

#### 【0054】

本発明の糖組成物の製造方法においては、その全工程を通じ、エキソ型アミラーゼを使用しない場合、該糖組成物を水あめとして利用するときにより低粘度でより低着色性なものとする事ができ、より好適である。環状四糖を生成させる工程中又はその工程後に、かかるエキソ型アミラーゼを作用させると、還元性の単糖や二糖などの含量が高まり、結果として、低い着色性を実現し難くなり、本発明の目的を達し難くなる。本発明の糖組成物の製造方法において使用しないことが推奨されるエキソ型アミラーゼとしては、グルコアミラーゼ (EC 3.2.1.20)、 $\alpha$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20)、 $\beta$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)などの単糖又は二糖を生成する作用を有するものが挙げられる。なお、酵素による一般的な水あめの製造において、酵素反応の最終段階で、仕上げとして、 $\beta$ -アミラーゼなどのエンド型アミラーゼを作用させることがある。水あめにする糖組成物を生成する酵素反応終了時に、わずかに残存する高分子のグルカン<sub>20</sub>を低分子化し、その後の精製工程の効率を高めることが目的である。通常、この操作では糖組成は実質的に変化しない。本発明の糖組成物の製造方法においても、仕上げとして、エンド型アミラーゼを作用させることは随意であり、かかるエンド型アミラーゼとしては、液化型アミラーゼがより好適である。また、必要に応じ、単糖や二糖を生成し難い、重合度3以上のマルトオリゴ糖を生成する作用を有するエキソ型アミラーゼ、より望ましくは、重合度4以上のマルトオリゴ糖を生成する作用を有するエキソ型アミラーゼを併用することは随意である。

#### 【0055】

環状四糖を生成させる工程1における酵素を作用させる条件、例えば、原料の濃度、反応時間、反応温度、反応pHなどは、達成しようとする総環状四糖含量の値、使用する酵素の種類、起源等、目的や状況に応じ、適宜選択すればよいが、反応温度は、通常、40乃至60、好適には、45乃至55とするのが望ましく、反応pHは、通常、4.5超7.0未満、好適には、5.0乃至6.7、より好適には、5.5乃至6.3とするのが望ましい。48時間で酵素反応を終了させることを想定した場合、原料とする澱粉部分分解物の濃度は、固形物濃度として、下限は、通常、1質量%以上が望ましく、上限は、通常、40%以下、好適には、35質量%以下、より好適には、33質量%以下が望ましい。酵素の作用量は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\beta$ -イソマルトシル転移酵素として環状四糖生成酵素を用いる場合、原料の固形物1gあたり、通常、0.2単位乃至5単位、好適には、0.7単位乃至4単位、より好適には、1単位乃至3単位、さらにより好適には、1.2単位乃至2.5単位の範囲が望ましく、澱粉枝切り酵素と<sub>50</sub>

10

20

30

40

50

してイソアミラーゼを用いる場合、原料の固形物 1 g あたり、通常、100 単位乃至 200 単位、好適には、200 単位乃至 1000 単位、より好適には、400 単位乃至 600 単位の範囲が望ましく、ブルナーゼを用いる場合には、原料の固形物 1 g あたり、通常、0.5 単位乃至 10 単位、好適には、1 単位乃至 8 単位、より好適には、2 単位乃至 6 単位の範囲が望ましく、CGTase を用いる場合には、原料の固形物 1 g あたり、通常、0.1 単位乃至 5 単位、好適には、0.2 単位乃至 3 単位、より好適には、0.4 単位乃至 2 単位の範囲が望ましい。全反応時間を 48 時間以外に設定する場合、その長短に応じ、酵素作用量は適宜加減すればよい。酵素を添加するタイミングも特に制約はなく、用いる酵素を全て同時に添加しても、逐次添加してもよい。原料の仕込み濃度やその他条件にもよるけれども、得られる糖組成物の着色性を高めずに総環状四糖含量を高めるためには逐次添加することが望ましく、この場合、環状四糖生成酵素、次いで CGTase、最後に澱粉枝切り酵素の順が望ましく、澱粉枝切り酵素の添加のタイミングは、通常、全反応時間の 1/2 が経過する時点以前、好適には、全反応時間の 1/5 が経過する時点以前が望ましい。原料の固形物濃度が 30 質量% 以上の場合など諸条件により左右されるが、環状四糖の生成がプラトーに達した後に澱粉枝切り酵素を添加すると、得られる糖組成物の粘度が十分に低下しない場合があるので、他の諸条件によっては、推奨されない。環状四糖生成反応の仕上げとして、エンド型アミラーゼを用いる場合、その作用量としては、2 時間程度の反応時間を想定した場合、原料の固形物 1 g あたり、通常、1 単位乃至 40 単位、好適には、2 単位乃至 25 単位、より好適には、4 単位乃至 15 単位とするのが望ましい。

10

20

#### 【0056】

以上のようにして環状四糖を生成させる反応を終えた反応液は、次の工程 2 に移行し、精製され、採取される。精製は、斯界における常法に従えばよく、常法としては、例えば、珪藻土濾過、活性炭による脱色、H 型、OH 型のイオン交換樹脂による脱塩等が挙げられる。精製後は、適宜濃度調整の後、噴霧乾燥、真空乾燥、凍結乾燥などにより、固体として採取してもよいが、精製後に濃縮し、所望の濃度に調整して、水あめとして採取してもよい。かくして本発明の糖組成物は製造することができる。また、本発明の糖組成物の製造方法において、酵素による環状四糖の生成反応の後、採取するまでに、常法に従い水素添加を行い、当該糖組成物の還元物を得ることも随意である。なお、以上説明した本発明の糖組成物の製造方法は、本発明の糖組成物を得るためのあくまでも好適な例であって、上記した(1)乃至(3)の特徴を有する本発明の糖組成物が得られる限り、例えば、高純度の環状四糖に、別途調製した分岐環状四糖及び共存糖質を適宜配合して製造してもよい。

30

#### 【0057】

以下、実験及び実施例に基づき本発明を説明するが、これらはいくまで一具体例に過ぎず、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0058】

< 実験 1 : 各種環状四糖含有水あめの調製と物性の評価 >

< 実験 1 - 1 : 各種環状四糖含有水あめの調製 >

- イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び - イソマルトシル転移酵素による環状四糖の生成反応において、他の糖質と比べ、総環状四糖含量が十分に高い値を示すことが判明している従来技術の反応系(後述する被験試料 1 における反応系)を基本とし、用いる酵素やその添加のタイミングを種々変更して、計 7 種類の環状四糖含有糖組成物(水あめ)を被験試料として調製した。

40

#### 【0059】

< 実験 1 - 1 - 1 : 材料 >

・環状四糖生成反応の原料

環状四糖生成反応の原料として、コーンスターチを常法により高温液化酵素で部分加水分解して得た液化液を用いた。固形物濃度と DE を常法により求めたところ、それぞれ、30 質量%、DE 5 であった。

50

## 【 0 0 6 0 】

## ・ 酵素

- イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び - イソマルトシル転移酵素を含む環状四糖生成酵素として、特許文献 1 の実験 3 の方法に準じ、パチルス・グロビスポルス C 9 株 ( F E R M B P - 7 1 4 3 ) を培養し、常法に従い、その培養物を S F 膜により除菌して得た濾液を U F 膜で濃縮したものをを用いた。酵素活性測定は、次のとおり行った。すなわち、この環状四糖生成酵素を適宜希釈した液 5 0 0  $\mu$  L と、2 % ( w / v ) の可溶性デキストリン ( 商品名『パインデックス # 1 0 0』、松谷化学工業株式会社製) を含む 5 0 m M 酢酸緩衝液 ( p H 6 . 0 ) 5 0 0  $\mu$  L を混合し、4 0  $^{\circ}$  C で 1 時間保持して反応させた後、1 0 分間煮沸して反応を停止し、その後、総環状四糖含量分析 ( 後述 ) に供して上記反応で生成した総環状四糖を定量し、酵素活性を求めた。得られた環状四糖生成酵素の活性は、4 9 2 単位 / m L であった。

10

## 【 0 0 6 1 】

- グルコシダーゼとして、天野エンザイム株式会社製の同酵素 ( 商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、1 3 , 0 0 0 単位 / m L ) を用いた。グルコアミラーゼとして、ナガセケムテックス株式会社製の同酵素 ( 商品名『デナチーム G S A / R』、3 , 8 0 0 単位 / g ) を用いた。イソアミラーゼとして、株式会社林原製の同酵素 ( シュードモナス・アミロデラモサ由来、5 5 3 , 5 0 0 単位 / g ) を用いた。プルラナーゼとして、天野エンザイム株式会社製の同酵素 ( 商品名『プルラナーゼ「アマノ」3』、3 , 0 0 0 単位 / g ) を用いた。C G T a s e として、株式会社林原製の同酵素 ( ジオパチルス・ステアロサーモフィラス由来、1 , 6 3 4 単位 / g ) を用いた。 - アミラーゼとして、ナガセケムテックス株式会社製の同酵素 ( 商品名『ネオスピターゼ P K - 6 / R』、3 7 , 5 0 0 単位 / g ) を用いた。

20

## 【 0 0 6 2 】

< 実験 1 - 1 - 2 : 各種環状四糖含有水あめの調製 >

## ・ 被験試料 1

特許文献 1 の実施例 A - 9 に記載された方法に準じ、原料 ( コーンスターチ液化液、D E 5、固形物濃度 3 0 質量 % ) に対し、その固形物 1 g あたり 2 単位の環状四糖生成酵素と、同固形物 1 g あたり 1 単位の C G T a s e を加え、p H 6 . 0、5 0  $^{\circ}$  C で 4 8 時間保持して、環状四糖生成反応を行った。その後、反応液を 9 5  $^{\circ}$  C で 3 0 分間保持して反応を停止し、常温にまで冷却した後、常法に従い、濾過、H 型及び O H 型イオン交換樹脂による脱塩に供し、さらに活性炭で脱色し、エバポレーターで濃縮して固形物濃度 7 3 質量 % に調製し、被験試料 1 を得た。

30

## ・ 被験試料 2

環状四糖生成反応の開始後 5 時間を経過した時点で、原料の固形物 1 g あたり 5 0 0 単位のイソアミラーゼを添加した以外は被験試料 1 と同一の操作を行い、被験試料 2 を得た。

## ・ 被験試料 3

環状四糖生成反応の開始後 5 時間を経過した時点で、原料の固形物 1 g あたり 5 単位のプルラナーゼを添加した以外は被験試料 1 と同一の操作を行い、被験試料 3 を得た。

## ・ 被験試料 4

環状四糖生成反応を終えた後に、原料の固形物 1 g あたり 5 単位の - アミラーゼを添加し、p H 6 . 0、5 0  $^{\circ}$  C で 2 0 時間保持し、その後 9 5  $^{\circ}$  C で 3 0 分間保持して反応を停止する操作を加えた以外は被験試料 1 と同一の操作を行い、被験試料 4 を得た。

40

## ・ 被験試料 5

環状四糖生成反応を終えた後に、原料の固形物 1 g あたり 5 0 0 単位のイソアミラーゼを添加し、p H 6 . 0、5 0  $^{\circ}$  C で 2 0 時間保持し、その後 9 5  $^{\circ}$  C で 3 0 分間保持して反応を停止する操作を加えた以外は被験試料 1 と同一の操作を行い、被験試料 5 を得た。

## ・ 被験試料 6

環状四糖生成反応を終えた後に、原料の固形物 1 g あたり 5 単位の - アミラーゼ、同 1 g あたり 1 単位のグルコアミラーゼ及び同 1 g あたり 5 0 0 単位のイソアミラーゼを添

50



加し、pH 6.0、50 で20時間保持し、その後95 で30分間保持して反応を停止する操作を加えた以外は被験試料1と同一の操作を行い、被験試料6を得た。

・被験試料7

環状四糖生成反応を終えた後に、原料の固形物1gあたり5単位の -アミラーゼ、同1gあたり1単位のグルコアミラーゼ及び同1gあたり5単位のプルラーゼを添加し、pH 6.0、50 で20時間保持し、その後95 で30分間保持して反応を停止する操作を加えた以外は被験試料1と同一の操作を行い、被験試料7を得た。

・被験試料8

環状四糖生成反応時に、原料の固形物1gあたり2.5単位の環状四糖生成酵素と、同1gあたり0.5単位のCGTaseを加えたこと、環状四糖生成反応の開始後5時間を経過した時点で、原料の固形物1gあたり400単位のイソアミラーゼを添加し、環状四糖生成反応の開始後56時間保持したこと、及び、環状四糖生成反応を終えた後に、原料の固形物1gあたり5単位の -アミラーゼを添加し、80 で2時間反応させたこと以外は被験試料1と同一の操作を行い、被験試料8を得た。

【0063】

<実験1-2:分析>

・糖組成分析

得られた被験試料に含まれる環状四糖などの糖質の全固形物あたりの無水物換算での含量(質量%)を、被験試料を以下の条件で市販の高速液体クロマトグラフィシステム(商品名『Prominence』、株式会社島津製作所製)を用いた高速液体クロマトグラフィ(以下、「HPLC」という。)に供して得られたクロマトグラムに基づき百分率法で計算することにより求めた。この分析では、環状四糖、グルコースが1分子又は2分子結合した分岐環状四糖の合計、重合度1又は2の糖質としてグルコース、マルトース及びイソマルトースの合計、及びその他のすべての糖質の合計である「その他」としてそれぞれの含量を求めた。

【0064】

<HPLC条件>

カラム:『MCI GEL CK04SS』(三菱化学株式会社製)を2本直列で連結

サンプル濃度:固形物濃度として1質量%

サンプル注入量:20µL

溶離液:超純水

流速:0.4mL/分

温度:80

検出:示差屈折率

【0065】

・総環状四糖含量分析

得られた被験試料における総環状四糖含量は、固形物濃度2質量%に調整した溶液0.5mLと、400単位/mLの -グルコシダーゼ及び10単位/mLのグルコアミラーゼを含む50mM酢酸緩衝液(pH5.0)0.5mLとを混合し、50 で24時間保持して環状四糖以外のグルコースどうしの結合を完全に消化し、10分間煮沸して消化反応を停止し、常法により脱塩、メンブランフィルターによる濾過に供した後、下記の条件でのHPLCに供して得られるクロマトグラムに基づき面積百分率法により求めた。なお、この条件での酵素反応により、被験試料のような環状四糖、分岐環状四糖及び共存糖質からなる糖組成物は、環状四糖以外の糖鎖部分は完全に加水分解されてグルコースとなり、結果として、反応後は、実質的に環状四糖とグルコースのみからなる糖組成物となる。

【0066】

<HPLC条件>

カラム:『Shodex Sugar KS-801(Na型)』(昭和電工株式会社製)

流速:0.5mL/分

温度：60

なお、ここに示していない装置、条件は、上記した糖組成分析（低重合度側）の場合と同一である。

【0067】

・粘度測定

各被験試料の粘度は、レオメーター（商品名『MCR102』、アントンパールジャパン株式会社製）を用い、試料温度及び環境温度が15 の条件下で測定して求めた。

【0068】

・水分活性測定

各被験試料の水分活性は、水分活性測定系（商品名『AquaLab Series 4 TDL』、アイネクス株式会社製）を用いて測定した。

10

【0069】

<実験1-3：結果及び考察>

実験1-1で得た被験試料1～8を、実験1-2に示した方法に従って糖組成分析、総環状四糖含量分析、粘度測定、水分活性分析に供した結果を、表1に示す。なお、表1には、被験試料1乃至8の調製の際に用いた酵素の種類と添加のタイミングを併せて示しており、表中の「+」は当該酵素を添加したこと、「-」は添加していないことを示す。

【0070】

20

30

40

50

【表 1】

被験試料 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
環状四糖生成酵素	+	+	+	+	+	+	+	+
CGTase	+	+	+	+	+	+	+	+
イソアミラーゼ (反応5時間後添加)	-	+	-	-	-	-	-	+
プルラーゼ (反応5時間後添加)	-	-	+	-	-	-	-	-
$\alpha$ -アミラーゼ (反応終了後添加)	-	-	-	+	-	+	+	+
グルコアミラーゼ (反応終了後添加)	-	-	-	-	-	+	+	-
イソアミラーゼ (反応終了後添加)	-	-	-	-	+	+	-	-
プルラーゼ (反応終了後添加)	-	-	-	-	-	-	+	-
総環状四糖含量 (質量%)	49.1	48.4	44.3	48.9	49.5	48.4	48.9	49.6
環状四糖	30.4	31.7	29.2	30.5	31.1	29.8	29.2	33.2
分岐環状四糖 <sup>*2</sup>	13.8	15.0	15.5	14.0	14.4	16.3	18.0	16.4
DP1+DP2 <sup>*3</sup>	4.8	9.7	15.0	4.9	5.5	19.1	21.1	11.5
その他 <sup>*4</sup>	51.0	43.6	40.3	50.6	49.0	34.8	31.7	38.9
粘度 (Pa・s)	45.6	26.4	18.1	36.1	38.3	18.7	13.4	32.4
水分活性	0.87	0.86	0.85	0.87	0.87	0.84	0.84	0.86

\*1) 「反応5時間後添加」は、環状四糖の生成反応開始の5時間後に添加したことを、「反応終了後添加」は、環状四糖の生成反応終了後に添加したことを表す。

\*2) 「分岐環状四糖」は、グルコース残基が1分子又は2分子結合した分岐環状四糖の含量の和を表す。

\*3) 「DP1+DP2」は、グルコース、マルトース、イソマルトースの含量の和を表す。

\*4) 「その他」はその他の全ての糖質の含量の総和を表す。

## 【0071】

表1に見られるとおり、表1に記載の酵素のうち、環状四糖生成酵素及びCGTaseに加えて他の酵素を作用させた場合(被験試料2~8)にも、総環状四糖含量は、従来法によって得られた被験試料1と同等レベルの値を示した。食物のエネルギー値を計算するための係数であるエネルギー換算係数は、グルコースが4kcal/gであるのに対し、環状四糖は0kcal/gである(後述する参考試験に示すとおり)こと、及び、後述する実験4、実施例1及び比較例1におけるエネルギー値の算定結果を考え併せると、総環状四糖含量が38質量%以上であれば、糖質素材として十分に低カロリーであることを訴求できるものと考えられる。また、水分活性についても、いずれも、食品における微生物

汚染を避けるために必要とされる 0.88 以下の値を示し、この点においても申し分のないものであった。粘度について見てみると、従来技術である被験試料 1 が 45.6 Pa・s であったのに対し、環状四糖を生成させる反応中に澱粉枝切り酵素であるイソアミラーゼやプルラーゼを作用させた被験試料 2, 3 及び 8 は、粘度がそれぞれ 26.4 Pa・s、18.1 Pa・s 及び 32.4 Pa・s と、従来法によって得られた被験試料 1 と比較して著しく低下していた。

#### 【0072】

一方、澱粉枝切り酵素は作用させないで、環状四糖を生成させる反応後にエンド型アミラーゼである  $\alpha$ -アミラーゼを作用させた被験試料 4 や、同反応中にはなく反応後に澱粉枝切り酵素であるイソアミラーゼを作用させた被験試料 5 は、被験試料 1 と比較して、さしたる粘度の低下は認められなかった（粘度は、それぞれ、36.1 Pa・s 及び 38.3 Pa・s）。また、単糖を生成する活性を有するエキソ型アミラーゼであるグルコアミラーゼ、及びエンド型アミラーゼである  $\alpha$ -アミラーゼを、澱粉枝切り酵素であるイソアミラーゼ又はプルラーゼとともに、環状四糖を生成させる反応後に作用させた被験試料 6 及び 7 においては、粘度は、基本とした被験試料 1 と比較して、著しく低下していた（それぞれ、18.7 Pa・s 及び 13.4 Pa・s）。一方で、環状四糖を生成させる反応中に澱粉枝切り酵素であるイソアミラーゼを作用させ、反応後にエンド型アミラーゼである  $\alpha$ -アミラーゼのみを作用させた被験試料 8 においても、粘度は 32.4 Pa・s と、被験試料 1 と比較し、実使用上の許容レベルである 35 Pa・s 以下にまで低下していた。

#### 【0073】

粘度の測定値のみを見た場合、被験試料 2、3、6、7 及び 8 が、本発明が掲げた課題を解決しうると期待がもたれたが、その粘度の測定値が実際の操作性をどの程度反映しているかは依然として不明であり、また、着色性については、以上の結果のみからは判断できなかった。

#### 【0074】

< 実験 2：各種環状四糖含有水あめの操作性、着色性の評価 >

実験 1 の結果を受け、実験 2 では、次のことを明らかにする目的で評価を行った。

(i) 実験 1 で認められた各被験試料の粘度の違いが、実際の操作性に影響を及ぼすか否か。

(ii) 実験 1 で得た各被験試料の着色性に違いがあるか。

#### 【0075】

< 実験 2 - 1：方法 >

・操作性の評価方法

環境温度及び用いる材料の温度を全て 15 にした条件下で、1 L 容のガラス製ビーカーに実験 1 で調製した各被験試料 500 g をとり、ここに脱イオン水 200 g を静かに加え、金属製スパーテルで全体が均一になるまで混合した。対照として、あらかじめ固形物濃度 7.3 質量% に調整しておいた市販のマルトテトラオース含有水あめ（商品名『テトラップ』、株式会社林原製。マルトテトラオース含量 5.0 質量% 以上。）を同じ条件下で同様に処理し、金属製スパーテルで全体が均一になるまで混合した。被験試料を全体が均一になるまで混合するに要した時間と力を、対照試料を全体が均一になるまで混合するに要した時間及び力と比較し、次の 3 段階で評価した。

「○」（操作性「優」）：対照と同等

「△」（操作性「良」）：対照に比べ、時間と力を比較的多く要するが、操作上の支障はない

「×」（操作性「不良」）：対照に比べ、時間と力を明らかに多く要し、操作上の支障がある

#### 【0076】

・着色性の評価方法

被験試料 1 ~ 8 を固形物として 10 質量% 含み、グリシンを 1 質量% 含む 50 mM 酢酸

緩衝液（pH 6.0）を密閉容器に封入し、これを沸騰水浴中で1時間保持した。対照として、上記した市販のマルチトール含有水あめを同様に操作した。沸騰水浴中での1時間保持の終了後、急冷し、常法により460nmにおける吸光度を測定するとともに、目視により、着色度を相互に比較した。対照試料の吸光度は、0.100であった。各被験試料の結果を、対照試料と比較し、着色性を次の3段階で評価した。

「○」（着色性「低」）：吸光度が対照の1.3倍以下であり、目視では対照と比べ着色度にはほとんど差異が認められない

「」（着色性「中」）：吸光度が対照の1.3倍超1.6倍以下であり、目視では、対照と比べ、若干着色が認められるが、通常の食品製造において許容される範囲と判断される

「×」（着色性「高」）：吸光度が対照の1.6倍超であり、目視では、対照と比べ、明らかに強い着色が認められ、通常の食品製造において許容しえないと判断される

【0077】

< 2 - 2 : 結果及び考察 >

結果を表2に示す。

【0078】

【表2】

被験試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8
操作性	×	○	○	×	×	○	○	○
着色性	○	○	△	○	○	×	×	△

【0079】

表2に見られるとおり、被験試料2, 3及び8は、粘度に関連すると思われる操作上は「○」（優）と評価され、操作性に問題がなく、着色性の点でも「○」（低）又は「」（中）と評価され、問題のないものであった。一方、同じく低粘度であった被験試料6及び7は、操作性においてはいずれも「○」（優）と評価されたものの、着色性の点で満足できるものではなかった。着色性が「×」（高）と評価された被験試料6, 7は、重合度1又は2の糖質を16質量%超含有しており、着色性を問題ないものとするためには、重合度1又は2の糖質の含有量を16質量%以下するとよいと考えられた。また、被験試料4, 5は、着色性は「○」（優）と評価されたものの、操作性は「×」（不良）と評価された。実験1で確認された低カロリー性と低水分活性であることを併せ、以上をもって、被験試料2, 3, 8が、本発明の課題を解決しうるものであると考えられた。

【0080】

次に、被験試料2, 3及び8が、その他の被験試料と比較して総環状四糖含量に顕著な違いがみられないにも関わらず低粘度で良好な操作性を示したことに関わる構造上の特徴を探るため、下記に示す実験3を行った。

【0081】

< 実験3 : 環状四糖含有水あめの操作性に関わる構造の探求 >

各被験試料の操作性の違いに及ぼす構造上の差異を明らかにするため、各被験試料における各結合様式のグルコース残基の含量と中程度の重合度の糖質の含量に着目し、下記の分析を行った。

【0082】

< 実験3 - 1 : 方法 >

・メチル化分析

シューカヌ(Ciucanu)ら、カーボハイドレート・リサーチ(Carbohydrate Research)、第131巻、第2号、209-217頁(1984)に記載された方法に従い、実験1で得た各被験試料につき、まず遊離の水酸基をメチル化し、完全に加水分解してメチル化グルコースを得、これを還元してメチル化グルシトール

とし、最後に、得られたメチル化グルシトールの水酸基をアセチル化してメチル化グルコースアセテートを得た。かくして各被験試料から得たメチル化グルコースアセテートを、下記に示す条件で、市販のガスクロマトグラフィーシステム（商品名『GC-2010 Plus』、株式会社島津製作所製）を用いたガスクロマトグラフィー（以下、「GC」という。）に供し、各被験試料における結合様式の異なるグルコース残基の含量（%）を求めた。

【0083】

< GC条件 >

カラム : InertCap5 キャピラリーカラム（内径0.25mm×長さ30m×膜厚0.25μm, GL Science社製）

キャリアーガス : ヘリウム

カラム温度 : 130 で3分間保持した後、250 まで5 /分で昇温し、250 で10分間保持

流速 : 1.0 mL / 分

検出 : FID

注入量 : 1 μL（スプリット1 / 50）

分析時間 : 46分

【0084】

・中程度の重合後の糖質の含量の測定

実験1で糖組成分析の目的で行ったHPLCと同じ条件で、重合度が明らかとなっているマルトオリゴ糖の混合物を分析し、その結果得られたクロマトグラムと、実験1で各被験試料について得たクロマトグラムを対比し、実験1では詳しく評価、検討しなかった中程度の重合度の糖質、すなわち、重合度4乃至13に相当すると判断される糖質（但し、上記の条件でのHPLCの特性上、ここには、環状四糖と環状四糖にグルコースが1分子又は2分子結合した分岐環状四糖は含まれない）の含量を面積百分率法により測定した。

【0085】

・還元力の測定

還元力については、D-グルコースを標準物質として用い、以下に記載のソモジー・ネルソン法より還元糖量を、アンスロン硫酸法より全糖量をそれぞれ測定し、それらを上述した式〔4〕に代入し、計算することにより求めた。

【0086】

・ソモジー・ネルソン法による測定

ソモジー銅試薬2mLと、検量線の範囲に入るよう希釈した試料1mLを混和後、10分間煮沸し、流水にて冷却した。その後、冷却した液に、ネルソン試薬2mLを素早く加え混和した。ネルソン試薬添加後の黄緑色が青色に変わるまで放置したのち、水5mLを加えて攪拌し、波長520nmで吸光度を測定した。測定した吸光度と検量線より還元糖量を求めた。検量線はD-グルコース標準溶液を用い作成した。

【0087】

・アンスロン硫酸法による測定

氷水中で予冷した0.2%アンスロン試薬5mLに、検量線の範囲に入るよう希釈した試料0.5mLを静かに注ぎ、充分混和して10分間煮沸した後流水中で冷却し、波長620nmで吸光度を測定した。測定した吸光度と検量線より全糖量を求めた。検量線はD-グルコース標準溶液を用い作成した。

【0088】

< 実験3-2 : 結果及び考察 >

表3に、各被験試料をメチル化分析することにより求められた各結合様式のグルコース残基の含量を示した。また、中程度の重合度の糖質の含量の測定により、各被験試料が示した粘度と、重合度4乃至13に相当する糖質の含量との間に一定の関係が認められたので、該重合度に相当する糖質の含量を、表3に併せて示した。操作性と着色性の結果は表2から転記したものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

【表 3】

被験試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8
操作性*1	×	○	○	×	×	○	○	○
着色性*1	○	○	△	○	○	×	×	△
メチル化分析により 求めた各結合様式の グルコース残基*2の 含量(%)	α-1,4	15.4	11.2	10.8	15.3	15.6	8.2	9.2
	α-1,4,6	6.4	5.0	4.5	6.3	5.7	5.2	3.9
	α-1,3	33.3	34.9	34.6	33.0	33.4	35.8	33.7
	α-1,6	29.9	30.8	28.7	30.1	29.4	29.6	27.4
	α-1,3,6	3.2	3.4	3.8	3.1	3.3	3.3	5.1
α-1,2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
非還元	11.8	14.7	17.6	12.2	12.6	18.0	20.4	17.5
DP4~13の糖質の含量(質量%)	31.5	39.2	37.4	33.5	37.0	30.5	28.9	37.1
還元力(%)	4.1	8.5	13.6	7.1	5.5	17.6	19.8	12.4

\*1) 表2より転記。

\*2) 「α-1,4」は、α-1, 4結合グルコースを意味し、以下同様である。「非還元」は、非還元末端グルコースを意味する。

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

・結合様式と粘度及び着色性との関係について

表3に示した結果から、操作性及び着色性と、メチル化分析によって得られた各結合様式のグルコース残基の含量との関連性を見ると、α-1,4結合グルコース及びα-1,4,6結合グルコースの含量と操作性及び着色性に特徴的な関連性があると考えられた。すなわち、操作性が「不良」と評価された被験試料1,4,5は、α-1,4結合グルコースの含有量が比較的高く(それぞれ、15.4%、15.3%、15.6%)、一方、操作性は「優」と評価されたものの着色性が「高」と評価され、着色性の点で問題のあつ

50

た被験試料 6、7 は、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含有量が比較的低い傾向が認められた（それぞれ、8.2%、6.3%）。また、 $\alpha$ -1,4,6 結合グルコース含量について見てみると、被験試料 1、4、5 はその含量が比較的高く、被験試料 6、7 は、その含量が比較的低い傾向が認められた。以上のことから、操作性が悪いものは、着色性の点では問題がなく、これらは、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含量が高く、逆に、操作性は良いが着色性に問題があるものは、 $\alpha$ -1,4 結合グルコース及び  $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量がともに低い傾向にあると考えられた。

#### 【0091】

後に詳述する実施例 1 及び比較例 1 を併せ、総合的に見ると、澱粉部分分解物に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させる環状四糖の生成反応により得られる糖組成物においては、被験試料 2、3 及び 8 のように環状四糖生成反応と並行して澱粉枝切り酵素を作用させる場合を除き、一般に、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含量が 15% 超、又は、 $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量が 6% 以上になると、操作性に問題が生じる一方、着色性の点では問題はない糖組成物になる傾向があると考えられた。逆に、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含量が 9% 以下になると、 $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量は 6% を下回る値となり、操作性には問題がない一方、着色性の問題を有する糖組成物になる傾向があると考えられた。

#### 【0092】

これに対し、環状四糖生成反応と並行して澱粉枝切り酵素を作用させた被験試料 2、3 及び 8 においては、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースが 9% 超 15% 以下であり、 $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースが 6% を下回っていた。そして、このことと連動するようにして、被験試料 2、3 及び 8 は、操作性の問題がなく、着色性の点でも問題のないものであった。後述する実施例 1 及び比較例 1 の結果も併せ、以上のことから、 $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含量が 9% 超であっても 15% 以下にとどめ、且つ、 $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量を 6% 未満とすることで、操作性の問題がなく、着色性の点でも問題のない環状四糖含有水あめを得ることができることが判明した。なお、被験試料 2、3 及び 8 の粘度は、先に表 1 に示したとおり、それぞれ、26.4 Pa·s、18.1 Pa·s 及び 32.4 Pa·s であり、従来の製造方法によって製造された被験試料 1 の 45.6 Pa·s に比べて顕著に低い値であった。加えて、粘度がそれぞれ 36.1 Pa·s 及び 38.3 Pa·s であった被験試料 4、5 の操作性が「不良」(×)と評価されたことからみて、本発明に係る糖組成物の粘度は、35.0 Pa·s 以下が良く、より好適には 33.0 Pa·s 以下が良いと判断された。

#### 【0093】

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを用いる環状四糖の生成反応において澱粉枝切り酵素を併用することによって得られた上記の知見は、本発明者らが独自に見出した全く新規で画期的な知見といえる。

#### 【0094】

・操作性及び着色性と製造方法との関連について

製造方法との関連性で見えてみると、操作性が良好で低着色性を示す  $\alpha$ -1,4 結合グルコースの含量が 9% 超 15% 以下であり且つ  $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量が 6% 未満である環状四糖含有水あめは、表 1、2 及び 4 の結果から明らかとなり、環状四糖生成反応の進行中に澱粉枝切り酵素を作用させることで効率的に得られることが判明した。一方、澱粉枝切り酵素を作用させずにエンド型アミラーゼである  $\alpha$ -アミラーゼを作用させた場合（被験試料 4）や、澱粉枝切り酵素を環状四糖の生成反応後に作用させた場合（被験試料 5）、澱粉枝切り酵素とともにエキソ型アミラーゼであるグルコアミラーゼを作用させた場合（被験試料 6、7）には、 $\alpha$ -1,4 結合グルコース及び  $\alpha$ -1,4,6 結合グルコースの含量が上記範囲に入る環状四糖含有糖組成物（水あめ）は得られず、澱粉枝切り酵素を作用させずにエンド型アミラーゼのみを作用させる場合や、澱粉枝切り酵素を作用させたとしてもこれを環状四糖の生成反応の終了後に作用させる場合、澱粉枝切り酵素とともにエキソ型アミラーゼを作用させる場合には、本発明の目的を達し難いと考



えられた。

【 0 0 9 5 】

・重合度が中程度の糖質の含量と操作性及び着色性との関係について

表 3 に示した重合度が中程度（重合度 4 乃至 13）の糖質の含量を求めた結果を見てみると、操作性及び着色性の点で問題がなかった被験試料 2、3 及び 8 においては、重合度が 4 乃至 13 の糖質（但し、環状四糖と環状四糖にグルコースが 1 分子又は 2 分子結合した分岐環状四糖は除く）の含有量が他の場合に比べて顕著に高く、37 質量% 超であった。このことより、重合度 4 乃至 13 の糖質の含量が、操作性の良さと低着色性という相容れない特性を持つことに関わっていると考えられ、上記した特定の結合様式のグルコース残基に加えて、重合度が 4 乃至 13 の糖質の含量も、環状四糖含有糖組成物が良好な操作性と低着色性を併せ持つか否かの指標に利用できると考えられた。

10

【 0 0 9 6 】

< 実験 4：その他の分析、評価 >

上記に示した実験 1、2 及び 3 により、被験試料 2、3 及び 8 は、良好な操作性と低着色性である点で、本発明が掲げた課題を解決することが確認された。実験 4 では、その他の課題である、保存中に糖質が析出しないこと、低カロリー性であることについての評価試験を行い、併せて、食物繊維性の評価を行った。

【 0 0 9 7 】

< 実験 4 - 1：材料 >

実験 1 - 1 - 2 で調製した被験試料 2、3 及び 8 を評価の対象とした。

20

【 0 0 9 8 】

< 実験 4 - 2：方法 >

・保存中における結晶の析出性の評価

被験試料 2、3、8 及び、対照として、実験 2 で用いたのと同じマルトテトラオース含有水あめを個別にガラス製ビーカーに等量ずつとり、4 で 1 週間保持した後、目視により析出物の有無を評価した。

【 0 0 9 9 】

・エネルギー値の算定

後記する参考試験に示したとおり、環状四糖のエネルギー換算係数は、0 kcal / g と求められた。一方、実験 1 で調製したような環状四糖含有水あめは、生体内で消化され、共存糖質および分岐環状四糖における分岐構造部分は全てグルコースとなり、エネルギー源となると想定される。以上に基づき、被験試料 2、3 及び 8 の総環状四糖含量（質量%）を、100 質量% から減じた値に、グルコースのエネルギー換算係数である 4 kcal / g を乗じ、各被験試料のエネルギー値を求めた。

30

【 0 1 0 0 】

・食物繊維含量の測定

被験試料 2、3、及び 8 のそれぞれを、固形物として精密に 100 mg とり、これを、栄養表示基準（平成 8 年 5 月厚生省告示第 146 号）における栄養成分等の分析方法等（栄養表示基準別表第 1 の第 3 欄に掲げる方法）、8. 食物繊維、(2) 高速液体クロマトグラフ法（酵素 - HPLC 法）記載の方法に準じて、市販の総食物繊維測定キット（商品名『Dietary Fiber Total Assay Control Kit』、シグマ社製）を用いて、 $\alpha$ -アミラーゼ消化、プロテアーゼ消化及びアミログルコシダーゼ消化に供し、次いで、常法に従い、脱塩、濃縮の後、25 mL に定容した。この処理後の溶液を、次の条件での HPLC に供し、当該処理中のグルコースに対する他の成分（すなわち、食物繊維）のピーク面積比を求めた。

40

【 0 1 0 1 】

< HPLC 条件 >

カラム：TGK gel G2500PWXL（内径 7.8 mm × 長さ 300 mm，株式会社東ソー製）2 本を直列に連結したもの

溶離液：超純水

50

試料糖濃度：0.8質量％  
 カラム温度：80  
 流速：0.5 mL / 分  
 検出：示差屈折率  
 注入量：20 μL  
 分析時間：50分

なお、ここに示していない装置、条件は、実験1 - 2に示した糖組成分析の場合と同一である。

【0102】

次いで、上記で得た各処理液に含まれるグルコース量 (mg) を通常のグルコースオキシダーゼ法により定量し、その定量値に、上記で求めた上記の処理液中のグルコースに対する他の成分 (すなわち、食物繊維) のピーク面積比を乗じ、上記処理液に含まれる食物繊維量 (mg) を算定し、この結果と各被験試料の始発の固形物質量 (100 mg) に基づき、各被験試料における食物繊維含量 (質量%) を求めた。

10

【0103】

<実験4 - 3 : 結果及び考察>

結果を表4に示した。

【0104】

【表4】

20

被験試料No.	2	3	8
結晶の析出性 <sup>*1</sup>	○	○	○
エネルギー値 (kcal/g-無水固形物)	2	2	2
食物繊維含量 (質量%)	73	74	74

\*1) 「○」は、対照と同様、結晶の析出が認められなかったことを表す。

【0105】

表4に見られるとおり、被験試料2, 3及び8、対照としたマルトテトラオース含有水あめと同様に、上記した条件下で、全く結晶が析出することはなかった。なお、環状四糖は結晶性が高く、例えば、特許文献1の実験30に示されるとおり、純度98質量%の環状四糖は、固形物濃度50質量%の水溶液にした場合、容易に結晶が析出する。このことを踏まえれば、被験試料2, 3及び8は、水あめに求められる、高濃度の水溶液とした場合にも結晶が析出し難いという要件を十分に備えているといえる。エネルギー値は、被験試料2, 3及び8は2 kcal / gであり、完全に消化吸収される糖質が4 kcal / gであることを踏まえれば、十分に低カロリーであることを訴求できるといえる。食物繊維含量に関しても、期待されたとおりの比較的高いレベルに達していた。以上により、被験試料2, 3及び8は、本発明が掲げたすべての課題を解決する環状四糖含有糖組成物であることが確認された。

30

40

【0106】

<参考試験：環状四糖のエネルギー換算係数の算定>

1. 背景と目的

予備的な評価により、人体に経口摂取された環状四糖は消化吸収されずに大腸にまで到達することが判明している一方、その後、腸内細菌により発酵されるか否かは不明であった。このように消化吸収されず、完全に大腸に到達する糖質のエネルギー換算係数は、消化吸収されず腸内細菌によって完全に発酵を受けることが判明しており、且つ、そのエネルギー換算係数が明らかとなっているフラクトオリゴ糖 (エネルギー換算係数は、2 kcal / g) のような素材との比較により発酵性の度合いを定量的に求め、算出する必要がある (非特許文献3)。腸内細菌により発酵される糖質を経口摂取すると、その摂取量に

50

依存して呼気中の水素ガスが高まる傾向にあることが知られているので、例えば、フラクトオリゴ糖の摂取により呼気中に発生する水素ガスの総量と、評価対象の糖質の摂取により呼気中に発生する水素ガスの総量を比較することにより、評価対象の糖質の発酵性の度合いがフラクトオリゴ糖に対するパーセンテージで求められるので、フラクトオリゴ糖のエネルギー換算係数である  $2 \text{ kcal/g}$  に、求められたパーセンテージを乗じることで、評価対象のエネルギー換算係数を算定することができる。

以上の背景に基づき、下記の材料と方法を用いて、環状四糖のエネルギー換算係数を算定した。

#### 【0107】

##### 2. 材料

被験物質として、特許文献1記載の方法に従い調製した環状四糖の結晶標品を用い、対照物質として、フラクトオリゴ糖（商品名『メイオリゴ』、株式会社明治製）を用いた。

#### 【0108】

##### 3. 方法及び結果

###### ・被験者

健康な成人男女計13名を被験者とした。

###### ・食事、被験物質、対照物質の摂取、及び呼気の採取

試験前日の午後9時まで、被験者全員に食物繊維及び発酵性の素材を含まない同一メニューの食事をとらせた。試験当日の午前7時、体調不良がないことを確認のうえ、下記の呼気採取器具を用いて自身の終末呼気を採取させ、その後、固形物換算で5gの被験物質を100mLの水に溶かした液を2分以内に摂取させた。摂取後14時間が経過するまで、1時間おきに同様にして終末呼気を採取させた。この間、食物繊維及び発酵性の素材を含まない同一メニューの食事を3時間おきに提供したが、摂取の有無及び量は自由とした。飲料についても食物繊維及び発酵性の素材を含まない特定の品目を常時提供したうえで、その摂取のタイミング及び量は自由とし、砂糖の添加も自由とした。

被験物質を摂取した試験から1か月が経過した後に、被験物質に代えて対照物質を用いて、被験者に、同様に摂取及び呼気の採取を行わせた。

#### 【0109】

###### ・呼気中の水素ガス濃度の測定

呼気の採取には、市販の呼気採取器具（商品名『終末呼気（肺胞気）採取システム』、株式会社呼気生化学栄養代謝研究所製）を用いた。採取した呼気中の水素ガス濃度は、市販の呼気ガス分析装置（商品名『呼気水素・メタン分析装置 BGA-1000D』、株式会社呼気生化学栄養代謝研究所製）により計測した。

#### 【0110】

###### ・呼気中の水素ガス濃度の測定結果に基づく環状四糖のエネルギー換算係数の算定

各被験者の呼気中に排出された水素ガス量は、呼気の採取時刻を横軸とし水素ガス濃度を縦軸とするグラフに、試験中の各時刻で計測した呼気中のガス濃度をプロットして描かれる曲線の曲線下面積（Area Under Curve (AUC)）を測定することにより評価した。各被験者における対照物質のAUCに対する被験物質のAUCのパーセンテージを求め、平均値を求めた。このパーセンテージの平均値を、フラクトオリゴ糖のエネルギー換算係数である  $2 \text{ kcal/g}$  に乗じ、その計算値を、エネルギー換算係数は小数点以下第1桁を四捨五入して表示するという斯界における標準（非特許文献3）に従い評価した結果、環状四糖のエネルギー換算係数は、 $0 \text{ kcal/g}$  と結論された。

#### 【実施例1】

#### 【0111】

##### <環状四糖含有水あめ>

###### ・実施例1-1

原料として、DE5、固形物濃度20質量%の馬鈴薯澱粉液化液を用い、原料の固形物1gあたり2.5単位の環状四糖生成酵素（パチルス・グロビスポルス（FERM BP-7143）由来、株式会社林原製）と、同1gあたり1.2単位のCGTase（ジオ

10

20

30

40

50

パチルス・ステアロサーモフィラス由来、株式会社林原製）、及び同 1 g あたり 300 単位のイソアミラーゼ（シュードモナス・アミロデラモサ由来、株式会社林原製）を加え、pH 6.0、50 で 48 時間保持して、環状四糖生成反応を行った。その後、反応液を 95 で 30 分間保持して反応を停止し、常温にまで冷却した後、常法に従い、濾過、H 型及び OH 型イオン交換樹脂による脱塩に供し、さらに活性炭で脱色し、エバポレーターで濃縮して固形物濃度 73 質量%に調製し、本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 1）を得た。

【0112】

・実施例 1 - 2

上記した条件で環状四糖生成反応を行い、反応を停止した後に、仕上げとして、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ PK-6/R』、ナガセケムテックス株式会社製）を、原料の固形物 1 g あたり 5 単位添加し、80 で 2 時間反応させ、その後反応液を 95 で 30 分間保持して反応を停止した以外は、上記した実施例 1 - 1 の環状四糖含有水あめの調製と同様に操作し、本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 2）を得た。

10

【0113】

・実施例 1 - 3

環状四糖生成反応において、環状四糖生成酵素の添加量を、原料の固形物 1 g あたり 1 単位、CGTase の添加量を、同 1 g あたり 0.5 単位、イソアミラーゼの添加量を、同 1 g あたり 250 単位として環状四糖生成反応を行い、停止した後に、実施例 1 - 2 と同様に  $\alpha$ -アミラーゼを添加した以外は、上記した実施例 1 - 1 の環状四糖含有水あめの調製と同様に操作し、本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 3）を得た。

20

【比較例 1】

【0114】

・比較例 1 - 1

実施例 1 - 1 の環状四糖含有水あめの調製条件において、イソアミラーゼの添加を省略し、これに代え、実施例 1 - 2 の環状四糖含有水あめの調製に用いた  $\alpha$ -アミラーゼを原料の固形物 1 g あたり 10 単位加えたこと以外は実施例 1 - 1 の場合と同様に操作し、本発明外の環状四糖含有水あめ（比較例 1 - 1）を得た。

・比較例 1 - 2

実施例 1 - 1 の環状四糖含有水あめの調製条件において、イソアミラーゼの添加量を原料の固形物 1 g あたり 200 単位に変更したこと、環状四糖生成酵素の添加時に、実施例 1 - 2 において用いた  $\alpha$ -アミラーゼを原料の固形物 1 g あたり 2 単位とともに、実験 1 で用いたグルコアミラーゼを同 1 g あたり 0.2 単位添加したこと以外は、実施例 1 - 1 の場合と同様に操作し、本発明外の環状四糖含有水あめ（比較例 1 - 2）を得た。

30

【0115】

上記した実施例 1（実施例 1 - 1、1 - 2 及び 1 - 3）および比較例 1（比較例 1-1 及び 1 - 2）で得た環状四糖含有水あめについて、実験 1 - 2 に示した総環状四糖含量分析、糖組成分析、水分活性測定、実験 2 - 2 に示した粘度に起因する操作性の評価、着色性の評価、実験 3 - 1 に示したメチル化分析、中程度の重合度の糖質の含量測定、実験 4 - 2 に示したエネルギー値の算定に従い、これら分析、評価を行った。分析及び評価の結果を、それぞれの環状四糖含有水あめの調製方法の概略とともに、下記の表 5 にまとめた。

40

【0116】

【表 5】

被験試料 No.		実施例 1-1	実施例 1-2	実施例 1-3	比較例 1-1	比較例 1-2
使用酵素の 添加時期と 添加量 (単位) *1	環状四糖生成酵素	2.5	2.5	1	2.5	2.5
	CGTase (最初から)	1.2	1.2	0.5	1.2	1.2
	イソミラーゼ (最初から)	300	300	250	—	200
	α-アミラーゼ (反応終了後)	—	5	5	—	—
	α-アミラーゼ (最初から)	—	—	—	10	2
	グルコアミラーゼ (最初から)	—	—	—	—	0.2
総環状四糖含量 (質量%)		50	50	38	48	50
糖組成*2 (質量%)	環状四糖	35	35	26	32	35
	DP1+DP2	10	10	8	8	18
	DP4~DP13	40	40	40	45	30
各結合様式の グルコース残基*3 の含量 (%)	α-1, 4	13	13	14	11	9
	α-1, 4, 6	4	4	5	7	5
粘度 (Pa・s)		27	26	29	40	20
操作性		○	○	○	×	○
着色性		○	○	○	○	×
水分活性		0.86	0.86	0.87	0.88	0.86
エネルギー値 (Kcal/g-無水固形物)		2	2	2	2	2

\*1) 各酵素名に添えてその酵素の添加時期を記載しており、その意味は、次のとおり：

「最初から」＝環状四糖生成酵素の添加と同時に添加

「反応終了後」＝環状四糖生成酵素の反応を、反応液の加熱により停止した後に添加

数値は、原料の無水固形物1gあたりの酵素添加量 (単位) を意味する

\*2) 「DP1+DP2」は、グルコース、マルトース、イソマルトースの含量の和を表し、「DP4~13」は、環状四糖とグルコースが1分子又は2分子結合した分岐環状四糖を除く重合度4乃至13の糖質の含量の和を表す。

\*3) メチル化分析により求めた各結合様式のグルコース残基の含量のうち、α-1, 4結合グルコース (表中では「α-1, 4」と表記) 及びα-1, 4, 6結合グルコース (表中では「α-1, 4, 6」と表記) の測定結果を表示した。

## 【0117】

得られた実施例 1-1 乃至 1-3 の環状四糖含有水あめは、いずれも、操作性、着色性ともに良好な水あめであった。これらは、総環状四糖含量が 38 質量% 以上であり、メチル化分析における α-1, 4 結合グルコースの含量が 9% 超 15% 以下であり、且つ、α-1, 4, 6 結合グルコースの含量が 6% 未満であるという、本願発明における糖組成物の特徴を有していた。さらに、水分活性及び粘度が十分に低かった。これらの特徴を踏まえると、得られた実施例 1-1 乃至 1-3 の環状四糖含有水あめは、低着色性であり操作性の良い高品質の環状四糖含有水あめであり、食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、肥料などの用途で幅広く利用できる。なお、実施例 1-1 乃至 1-3 の環状四糖含有水あめを、実験 4-2 に示した食物繊維含量の測定に従い、食物繊維含量を測定したところ、全て 60% 以上であり、これらの環状四糖含有水あめは食物繊維性を有していた。

## 【0118】

一方、得られた比較例 1-1 の環状四糖含有水あめは、粘度が 40 Pa・s と高く、操作性が悪いものであった。糖組成などの構成について見てみると、粘度の大きさ及び操作性の悪さと呼応するように、メチル化分析による α-1, 4, 6 結合グルコースの含量が 7% と、本発明のものより高い値を示した。また、比較例 1-2 の環状四糖水あめは、粘度、操作性の点では問題がないものの、糖組成中の重合度 1 又は 2 の糖質 (DP1 + DP2

)を18質量%と比較的多く含むことから、着色性が高く、本発明の目的を達しないものであった。

【実施例2】

【0119】

<環状四糖含有糖組成物>

実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)を、常法に従い噴霧乾燥に供し、粉末状の本発明の環状四糖含有糖組成物を得た。本品は、そのまま、食物繊維を補給できる低カロリーの食品として有利に利用できる。また、本品は、適宜、他の糖質、高甘未度甘味料、脂質、たんぱく質、核酸、アミノ酸、ビタミン、界面活性剤、乳化剤、滑沢剤、収れん剤、香料、色素などと混合し、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、

10

【実施例3】

【0120】

<環状四糖含有糖組成物の還元物>

実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-2)を、常法に従い、ニッケル触媒の存在下で水素添加反応に供し、反応停止後、常法に従い精製し、濃度調整して、水溶液の形態にある本発明の環状四糖含有糖組成物の還元物を得た。本品は、原料とした環状四糖含有水あめに含まれる共存糖質が糖アルコールに転換されているので、より低カロリーで低着色性の食品素材、医薬部外品素材、医薬品素材などとして有用である。また、より低着色性であることを活かし、化粧品や皮膚外用の医薬部外品用の素材として、

20

【実施例4】

【0121】

<シフォンケーキ>

常法に従い、卵黄150質量部、砂糖60質量部、牛乳54質量部、サラダ油54質量部、薄力粉126質量部を混合し、卵黄生地を調製した。別途、卵白260質量部、砂糖68質量部と、実施例1で調製した本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)56質量部(固形物として41質量部)とを常法に従い混合し、メレンゲを調製した。調製した卵黄生地とメレンゲをできるだけ少ない攪拌回数で均一になるように混合し、シフォンケーキ用の型に流し込み、生地の割れ目まで薄い褐色になるまで焼き上げ、シフォンケーキを得た。なお、このレシピは、一般的なシフォンケーキのレシピにおける砂糖の量の20%を環状四糖含有水あめの固形物に置き換えたものに相当する。

30

【0122】

得られたシフォンケーキは、しっとりした食感で、穏やかな甘味を呈し、風味良好であった。本品は、通常のレシピに比べてカロリーが低く、安心して食することができるだけでなく、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、健康を維持、増進する効果も期待できる上質のシフォンケーキである。なお、通常のレシピにおける砂糖の置換の割合を40%にまで上げて、食感、呈味、風味ともに良好なものであった。

【実施例5】

【0123】

<うどん>

常法に従い、水31質量部、食塩4質量部と、実施例1で調製した本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)15質量部とを混合し、食塩を完全に溶解させた。ここに、中力粉100質量部を添加し、20分以上かけて十分に混練して、うどん生地を調製した。そのままの状態です1時間寝かせた後、麺棒で厚さ3mm程度になるまで生地を広げ、折りたたんだ後、幅4mm程度に切り出して、うどんを得た。

40

【0124】

得られたうどんは、沸騰水で15分程度茹であげ、冷水にさらした後、加温しただし汁をかけて食すると、柔らかな食感と喉ごしの調和がとれた良質のうどん、風味も良好であった。本品は、安心、安全な、良質の食物繊維強化用のうどんとしても有用である。な

50

お、上記したレシピにおいて、環状四糖含有水あめの添加量を20質量部に変更しても、同様に良質のうどんが得られた。

【実施例6】

【0125】

< 餡 >

水700質量部と砂糖560質量部を鍋に入れ、直火で加熱して完全に溶解させた後、ここに、小豆を煮た後に十分に搗りつぶして得た生餡1000質量部を、穏やかに攪拌しながら3回に分けて投入し、さらに弱火で加熱を続け、十分に煮詰めた。ここに、実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)の320質量部を加え、さらに加熱を続け、Brix(ショ糖換算の固形物濃度)が58%になるまでに煮詰め、餡を得た。

10

【0126】

得られた餡は、豊かな艶、上品な甘味を呈するものであった。また、生餡における砂糖の使用量を減らしたときに通常みられる保形性の低下も全く認められなかった。また、本品は、製造過程における粘度上昇が激しくなく、製造時の操作性も良好であった。本品は、通常のレシピに比べてカロリーが低いうえ、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、安心して食することができるだけでなく、健康を維持、増進する効果も期待できる上質の生餡である。さらに、得られた餡を、寒天などを用い固めることで、羊羹とすることもできる。なお、通常のレシピにおける砂糖の置換の割合を70%

20

【実施例7】

【0127】

< グミ >

砂糖100質量部、麦芽糖水あめ(商品名『マルトラップ』、株式会社林原製)60質量部、実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)87質量部、ゼラチン18質量部、水36質量部、50質量%クエン酸水溶液7.5質量部、香料0.6質量部と、着色料の適量を、常法に従い、混合しながら加熱し、総量が300質量部、Brixが80%になるまで煮詰め、成型して、グミを得た。なお、このレシピは、一般的なグミのレシピにおける麦芽糖水あめの量の60%を環状四糖含有水あめに置き換えたものである。

30

【0128】

得られたグミは、環状四糖水あめによる置き換えのない一般的なグミと比べて全く遜色のない色艶を呈するうえ、一般的なグミよりも咀嚼したときの反発力が強く、食感が良好で、表面のべたつきもない高品質のグミであった。また、本品は、製造過程における粘度上昇が激しくなく、製造時の操作性も良好であった。本品は、通常のレシピに比べてカロリーが低いうえ、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、安心して食することができるだけでなく、健康を維持、増進する効果も期待できる高品質のグミである。

【実施例8】

【0129】

< ハードキャンディー >

常法により、砂糖6質量部、麦芽糖水あめ(商品名『マルトラップ』、株式会社林原製)2質量部、実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-2)2質量部、水10重量部と、適量の香料を混合し、155で加熱して十分に煮詰め、成型し、ハードキャンディーを得た。比較対照として、本発明の環状四糖含有水あめに代えて、澱粉を酸の存在下で焙煎し、酵素消化して生成するグルコース等を除去して調製された難消化性グルカンを用い、同様に操作して、キャンディーを得た。

【0130】

上記で得た、本発明の環状四糖含有水あめを含むハードキャンディーは、琥珀色を呈し

40

50

ていたのに対し、比較対象のハードキャンディーは濃い褐色であった。この結果より、本発明の環状四糖含有水あめが低着色性であり、他の素材と配合し、加熱して調製される製品の色合いに悪影響を与えないことが確認された。

【0131】

本品は、一般的なハードキャンディーに比べてカロリーが低いうえ、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、安心して食することができるだけでなく、健康を維持、増進する効果も期待できる高品質のハードキャンディーである。

【実施例9】

【0132】

<アイスクリーム>

常法に従い、35%生クリーム150質量部、脱脂粉乳45質量部、ヤシ油50質量部、実施例1で得た本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-3)266質量部、ローカストビーンガム2質量部、ショ糖脂肪酸エステル1質量部を弱火で加温しながら均一になるまで混合し、次いで、常温で激しく攪拌混合した後、容器にとりわけ、-20で冷凍し、アイスクリームを得た。なお、このレシピは、標準的なアイスクリームのレシピにおける果糖ブドウ糖液糖を全て環状四糖含有水あめに置き換えたものである。

【0133】

得られたアイスクリームは、冷凍して3日間を経過しても容器との間に隙間が生じるいわゆるシュリンクと呼ばれる現象が起きず、また、冷凍して7日を経過した時点で容器から取り出して観察すると、表面が極めてなめらかであった点で、良質なアイスクリームであるといえる。また、本品は、製造過程における粘度上昇が激しくなく、製造時の操作性も良好であった。呈味は、すっきりとした爽やかな甘味であり、食感、風味も良好であった。本品は、通常のレシピに比べてカロリーが低いうえ、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、安心して食することができるだけでなく、健康を維持、増進する効果も期待できる良質なアイスクリームである。

【実施例10】

【0134】

<どら焼きの皮>

卵65質量部、砂糖50質量部、実施例1で調製した本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-1)20質量部(固形物として15質量部)、はちみつ5質量部、みりん2質量部に水20質量部を加えよく混合し、そこへ、水2質量部に溶かした重曹0.6質量部、ふるった小麦粉63質量部を加え、生地とした。生地を1時間ほど寝かした後に、鉄板で焼成し、どら焼きの皮を得た。

【0135】

得られたどら焼きの皮は、ふっくらとしており、上品な甘味を有していた。本品は、通常のレシピに比べて、カロリーが低いうえ、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、安心して食することができるだけでなく、健康を維持、増進する効果も期待できる高品質のどら焼きの皮である。さらに、実施例6で得た餡を挟み込むことで、皮と餡両方に食物繊維を含有する、高品質のどら焼きとすることもできる。

【実施例11】

【0136】

<黒糖蒸しパン>

卵60質量部、黒糖180質量部、実施例1で調製した本発明の環状四糖含有水あめ(実施例1-2)140質量部(固形物として102質量部)、水160質量部を混ぜ合わせ混合物とし、湯煎にかけ30程度まで温めた。温めた前述の混合物に、薄力粉200質量部、イスパタ5質量部をふるいにかけてものを混ぜ合わせ、さらに、太白ごま油30質量部を加え、よく混ぜ合わせる。出来上がった生地を型に流し込み、20分間蒸し、黒糖蒸しパンを得た。

【0137】

得られた蒸しパンは、ふっくらと膨らんだ、上品な甘味を有する、良好な食感・食味を

10

20

30

40

50



持った蒸しパンである。本蒸しパンは環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、健康を増進する効果も期待できる。

【実施例 1 2】

【0138】

<オレンジゼリー>

砂糖 200 質量部、カラギーナン 2.5 質量部、ローカストビーンガム 2.5 質量部、クエン酸ナトリウム 2.5 質量部、塩化カリウム 1 質量部、アセスルファムカリウム 0.2 質量部をよく混ぜ、水 650 質量部を入れた鍋に、ダマにならないように加えた。そこへ、実施例 1 で調製した本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 3）

140 質量部（固形物として 102 質量部）を加えた後に、煮詰め、800 質量部となるよう水分を蒸発させた。その後、70 程度まで冷却し、200 質量部のオレンジジュース、適量のオレンジ香料を加え、pH が 3.2 ~ 4.0 の範囲内に収まるように、50% クエン酸水溶液を用いて調整した。この溶液を、ゼリーカップに充填し、冷蔵庫で固まるまで静置し、オレンジゼリーを得た。

10

【0139】

得られたゼリーは、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するうえに、保形性が高く、なめらかな食感とすっきりとした甘みを有していた。なお、ゲル化剤を、ゼラチン、キサンタンガム、寒天、ペクチンなどに置き換えても、離水は見られず、良好な食感を持ったゼリーとすることができた。

【実施例 1 3】

【0140】

<クッキー>

無塩バター 100 質量部を湯煎にかけ溶かし、そこへ篩った砂糖 40 質量部、薄力粉 170 質量部を加え、混ぜ合わせた。そこへ、卵黄 20 質量部、及び、実施例 1 で調製した本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 1）を 50 質量部加え、さらに混ぜ合わせ、生地を完成させた。完成した生地は、冷蔵庫で寝かしたのち、形を整えた後にオーブンで焼き上げ、クッキーを得た。

20

【0141】

得られたクッキーは、サクサクとした食感を持つとともに、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有するので、健康に良いクッキーである。更に、ビタミン類、ミネラル類、粉末タンパクなどを添加することで、栄養補給もできるクッキーとすることもできる。

30

【実施例 1 4】

【0142】

<炭酸飲料>

実施例 1 で調製した本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 2）を 60 質量部、果糖ぶどう糖液糖 20 質量部、アセスルファムカリウムを 0.1 質量部、スクラロースを 0.02 質量部、クエン酸を 2 質量部、クエン酸ナトリウムを 0.5 質量部、を、水 170 質量部と混合し、溶解するまでよくかき混ぜた。そこへ適量のレモン香料を加え、良く攪拌した後に、炭酸水 750 質量部を加え、炭酸飲料を得た。

40

【0143】

得られた炭酸飲料は、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有し低カロリーでありながら、すっきりとした甘味と良好なボディ感を併せ持った炭酸飲料であった。なお、上記のレシピにおいて、果糖ぶどう糖液糖をなくし、本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 2）を 140 質量部まで増やした処方（水を 90 質量部とした）においても、異味異臭がせず、キレの良い甘味をと良好なボディ感を併せ持った飲みやすい炭酸飲料とすることができた。逆に、上記のレシピにおいて、本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 2）を 20 質量部に減らし、甘味を補填するためアセスルファムカリウムを 0.15 質量部に増やした処方において、固形分が少ないにも関わらず良好なボディ感を有した炭酸飲料とすることができた。

50

## 【実施例 15】

【0144】

&lt;チューハイ&gt;

実施例 1 で調製した本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 3）を 40 質量部、アセスルファミカリウムを 0.1 質量部、スクラロースを 0.02 質量部、クエン酸を 4 質量部、クエン酸ナトリウムを 1 質量部、を、50%（v/v）アルコールを含有するウオッカ（ニッカウヰスキー社 ウヰルキンソン・ウオッカ 50°）を 170 質量部と混合し、溶解するまでよくかき混ぜた。そこへ、適量のレモン香料を加え、良く攪拌した後に、炭酸水 750 質量部を加え、チューハイを得た。

【0145】

得られたチューハイは、アルコール 9% と高いアルコール度数のチューハイでありながら、アルコールの刺激臭や味を感じさせない、飲みやすくチューハイであった。また、砂糖を含まないにもかかわらず、強いボディ感を持ち、飲みごたえのあるチューハイであった。なお、本発明の環状四糖水あめ（実施例 1 - 3）を 10 質量部まで減らした処方（減った分を炭酸水で補う）においても、アルコールの刺激臭を感じない、かつ、ボディ感を持った、チューハイとすることができた。

【実施例 16】

【0146】

&lt;缶入りコーヒー&gt;

L 値（色差計で測定した、コーヒー豆の明度）が 18 となるよう焙煎したアラビカ種のコーヒー豆 100 質量部を粉碎し、熱湯で抽出した。コーヒー豆抽出液を Brix 2 となるように調整した液 500 質量部に対し、生乳 150 質量部、実施例 1 で調製した本発明の環状四糖含有水あめ（実施例 1 - 1）を 150 質量部、水 200 質量部、適量の乳化剤及び香料を加え、ホモジナイズ処理を行った。得られたホモジナイズ後の液に、pH 調整を行った後に缶に容器詰めを行い、レトルト殺菌し、缶入りコーヒーを得た。

【0147】

得られた缶入りコーヒーは、環状四糖含有水あめを配合していることから食物繊維を含有し、異味異臭がせず、すっきりとした、飲みやすい缶入りコーヒーであった。食物繊維量は環状四糖含有水あめの添加量を調整することにより任意に調整することができ、甘味は砂糖や人工甘味料で調整することもできる。

【産業上の利用可能性】

【0148】

以上のとおり、本発明は、比較的高濃度の糖質水溶液（水あめ）とした場合においても粘度及び水分活性が十分に低く、十分に低着色性であり且つ低カロリーであり、保存中に糖の結晶が析出し難い高品質の環状四糖含有水あめを提供するものであり、従来は、物性や機能性の点で多大な期待がもたれながら、実用化に成功していなかった環状四糖の実用化に貢献するものであり、本発明の環状四糖含有水あめは、食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、肥料などの用途で幅広く利用できる産業上の利用価値の甚だ高い発明であると言える。

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		
A 2 3 L	7/109(2016.01)	A 2 3 L	7/109	C
A 2 3 G	3/42 (2006.01)	A 2 3 G	3/42	
A 2 3 G	9/34 (2006.01)	A 2 3 G	9/34	
A 2 1 D	13/00 (2017.01)	A 2 1 D	13/00	
A 2 3 L	29/231(2016.01)	A 2 3 L	29/231	
A 2 3 L	29/238(2016.01)	A 2 3 L	29/238	
A 2 3 L	29/281(2016.01)	A 2 3 L	29/281	
A 2 3 L	2/00 (2006.01)	A 2 3 L	2/00	B
C 1 2 G	3/04 (2019.01)	A 2 3 L	2/00	G
A 2 3 F	5/24 (2006.01)	C 1 2 G	3/04	
A 6 1 K	8/73 (2006.01)	A 2 3 F	5/24	
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 K	8/73	
A 2 3 K	20/163(2016.01)	A 6 1 Q	19/00	
A 2 3 L	29/30 (2016.01)	A 2 3 K	20/163	
C 1 3 K	13/00 (2006.01)	A 2 3 L	29/30	
		C 1 3 K	13/00	

日本国岡山県岡山市中区藤崎 6 7 5 番地 1 株式会社林原内

(72)発明者 三鼓 仁志

日本国岡山県岡山市中区藤崎 6 7 5 番地 1 株式会社林原内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 2 / 0 7 2 5 9 4 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 5 5 2 ( W O , A 1 )  
 Biosci.Biotechnol.Biochem. , 2022年 , Vol.86,No.6 , p.780-791  
 応用糖質科学 , 2023年 , 第13巻 , 第 2 号 , p.103-109

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P

A 2 3 L

C 0 7 H

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )