

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4092689号
(P4092689)

(45) 発行日 平成20年5月28日(2008.5.28)

(24) 登録日 平成20年3月14日(2008.3.14)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/26 (2006.01) C 1 2 N 9/26 A

請求項の数 17 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2002-563317 (P2002-563317)	(73) 特許権者	502095878
(86) (22) 出願日	平成14年1月30日(2002.1.30)		ダニスコ シュガー オイ
(65) 公表番号	特表2004-520830 (P2004-520830A)		フィンランド国 エフアイエヌー0246
(43) 公表日	平成16年7月15日(2004.7.15)		0 カントピク ソケリテターンティエ
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000070		20
(87) 国際公開番号	W02002/062980	(74) 代理人	100068618
(87) 国際公開日	平成14年8月15日(2002.8.15)		弁理士 粵 経夫
審査請求日	平成17年1月28日(2005.1.28)	(74) 代理人	100093193
(31) 優先権主張番号	20010221		弁理士 中村 壽夫
(32) 優先日	平成13年2月6日(2001.2.6)	(74) 代理人	100104145
(33) 優先権主張国	フィンランド(FI)		弁理士 宮崎 嘉夫
		(74) 代理人	100104385
			弁理士 加藤 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β-アミラーゼの抽出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

穀物を、セルラーゼの存在下において水性媒体中で抽出して - アミラーゼを含む抽出物を得、続いて前記媒体から前記 - アミラーゼを回収することを特徴とする - アミラーゼを抽出する方法。

【請求項2】

- アミラーゼが、大麦、小麦又はライ麦から抽出されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

- アミラーゼが、脱穀した大麦から抽出されることを特徴とする請求項1記載の方法

10

【請求項4】

- アミラーゼが、脱穀、製粉、粉碎、研磨及びそれらの組み合わせから選択された方法によって、処理された穀物の穀粒から抽出されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】

抽出が、還元条件中で実施されることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記還元条件が、穀粒の構造タンパク質に結合している - アミラーゼを解離すること

20

が可能な還元活性を与えるように適合されていることを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記還元条件が、 SO_2 を含む水によって与えられることを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

脱穀した大麦が、5 : 8 ないし 2 : 3 (脱穀した大麦 : SO_2 を含む水) の比で SO_2 を含む水で抽出されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

抽出が、25 ないし 33、好ましくは 29 ないし 31 の温度において実施されることを特徴とする前記請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

抽出時間が 48 ないし 66 時間、好ましくは 55 ないし 62 時間であることを特徴とする前記請求項 1 ないし 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記セルラーゼがセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、及び/又は - グルカナーゼ活性を有する酵素配合物を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

セルラーゼが、糸状菌のセルラーゼからなることを特徴とする前記請求項 1 ないし 11 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 13】

トリコデルマ糸状菌のセルラーゼが使用されることを特徴とする前記請求項 1 ないし 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

セルラーゼが、フミコラ、フサリウム、ミセリオプトラ (Myceliophthora)、アスペルギルス、ペニシリウム及びトリコデルマからなる群から選択された属のセルラーゼ又は該セルラーゼの組み合わせを含むことを特徴とする前記請求項 1 ないし 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

- アミラーゼが、製粉された穀粒から抽出されることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記回収した - アミラーゼが、精製、濃縮及びそれらの組み合わせから選択された処理法によって処理されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

穀物からの - アミラーゼの抽出におけるセルラーゼの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素技術に関する。より厳密には、本発明は、穀物から - アミラーゼを抽出するための方法及び前記抽出における酵素の使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

- アミラーゼは、- 1, 4 結合を加水分解する澱粉分解酵素である。それは、例えば、細菌及び植物中で見られ、そしてそれは、澱粉鎖の非還元末端で澱粉を主にマルトースへ分解する。- アミラーゼは、例えば、穀粒中に豊富であり、そしてそれは、必要に応じて、穀物の栄養貯蔵、例えば澱粉を糖へ転換する。穀物中では、澱粉は主にアミロース及びアミロペクチンの形状で貯蔵される。- アミラーゼは、アミロースは全てマルトースへ転換するのに対し、アミロペクチンの約 60% をマルトースへ転換し、残りはデキストリンへ転換する。

【0003】

50

- アミラーゼは、例えば、澱粉産業において、マルトースを製造するために使用される産業上重要な酵素である。多量のマルトースを含む製品は、例えば菓子及び食品産業で使用される。 - アミラーゼは細菌及び植物の両方から単離されている。例えば、それは、バシルス菌（US 4 9 7 0 1 5 8 及び JP 6 0 1 2 6 0 8 0）及び耐熱性のクロストリジウム菌（US 4 6 7 4 5 3 8）から得られてきた。細菌から誘導された - アミラーゼは、マルトースに加えて、多量のマルトトリオースも製造するのに対し、植物ベースの - アミラーゼは、比較的より多くのマルトースを製造するので、それらは、できるだけ甘い及び/又は醗酵性の製品を得ることを目的とした方法にはより適当である。そのうえ、細菌からの - アミラーゼの大規模製造は困難である。産業上使用される - アミラーゼは、植物ベースのものであり、そしてその場合には、通常穀物、特に大麦又は小麦が酵素源として使用されるが、大豆もまた使用される。

10

【特許文献1】米国特許第4970158号明細書。

【特許文献2】特開昭60-126080号公報。

【特許文献3】米国特許第4674538号明細書。

【0004】

成長の間に、 - アミラーゼは穀粒中に形成され、貯蔵される。穀粒は、例えば穀粒の胚及び澱粉含有内胚乳から成り、そしてそれは胚盤によって、互いに分離される。内胚乳は、糊粉層に囲まれ、そして穀粒全体は、果皮層、種皮層及び真皮に囲まれている。小麦は、特定の皮はないが、果皮、種皮が硬い外殻を形成する。 - アミラーゼは、主に、内胚乳及び胚盤に貯蔵される。多量の - アミラーゼは、糊粉層の直接下の内胚乳の最も外側部分に見られる。

20

【0005】

大麦の - アミラーゼは、十分に研究されている。この - アミラーゼ及びその製造は例えば以下の刊行物に記載されている：D. E.ブリッグス, Barley, チャップマン&ホール, ロンドン, 1978年; クック, Barley and Malt, アカデミックプレス, ロンドン, 1962年; J. R. A.ポロック, Brewing Science, アカデミックプレス, ロンドン, 1979年。酵素分類名は、1, 4 - D - グルカンマルトヒドロラーゼ (EC スペック 3. 3. 1. 2) である。これまでは、穀物の - アミラーゼは、まず穀粒を粉碎又は製粉し、続いて水又は緩衝液で - アミラーゼを抽出することによって分離されてきた。この種の抽出物からの酵素の精製は、酵素自身に加えて、抽出物が、穀粒の、多くの他の可溶性成分を含むため、元来困難かつ面倒である。それを含む溶液からの - アミラーゼの分離を改善するための試みが、例えば、硫酸アンモニウムの存在下においてポリマーで酵素を吸着することによって行なわれてきた (US 5 2 9 4 3 4 1)。グルテンからの - アミラーゼの解離はプロテアーゼで実験されている (JP 6 3 0 7 9 5 9 0)。

30

【非特許文献1】D. E.ブリッグス, Barley, チャップマン&ホール, ロンドン, 1978年。

【非特許文献2】クック, Barley and Malt, アカデミックプレス, ロンドン, 1962年。

【非特許文献3】J. R. A.ポロック, Brewing Science, アカデミックプレス, ロンドン, 1979年。

40

【特許文献4】米国特許第5294341号明細書

【特許文献5】特開昭63-079590号公報

【0006】

- アミラーゼは、アルギン酸ナトリウムを添加し、凝固した酵素を回収すること (JP 6 0 0 2 7 3 8 3) 又はリン酸カルシウムゲルを形成し、酵素を吸着させ、続いてそこから酵素を回収すること (JP 6 3 2 4 8 3 8 9) によって、小麦澱粉製造の廃液から単離されている。澱粉製造の廃液は、それは非常に薄くかつ多量の他の成分を含んでいるので、精製及び濃縮が困難なので、結果として収率は低いので、良好な - アミラーゼ源ではない。

50

【特許文献6】特開昭60-027383号公報

【特許文献7】特開昭63-248389号公報

【0007】

より純粋な粗抽出物を得、かつ困難な下流加工を避けるために、完全に又は部分的に脱穀された穀粒から - アミラーゼを抽出することが示唆されている。例えば、大麦の穀粒が、それらの内胚乳が壊れないような方法で脱穀された場合、内胚乳の最も外側の層は、浸漬水への不溶性物質の出入りを防止し、かつ可溶性物質の出入りを制限するフィルター類のように機能する。穀粒の他のタンパク質から - アミラーゼを解離する還元物質の存在下において抽出を実施することが好ましい(FI6156及びUS4675296)。

【特許文献8】フィンランド国特許第6156号明細書

【特許文献9】米国特許第4675296号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

穀物抽出時間を減少させかつ酵素の収率を改善する、穀物からの - アミラーゼ抽出法が、今や発明された。方法は簡単に実施でき、かつ脱穀した穀物を加工するために特に適しており、そしてそれは、酵素の更なる精製も容易にする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明に従った - アミラーゼを抽出するための方法は、穀物を、セルラーゼの存在下において水性媒体中で抽出して - アミラーゼを含む抽出物を得ることを特徴とする。本発明は、更に穀物からの - アミラーゼの抽出におけるセルラーゼの使用に関する。

【0010】

セルラーゼは、例えば製粉した穀物からの澱粉製造において、スラリーの粘度を減少させ、タンパク質から澱粉を分離するために使用される。 - アミラーゼの抽出水へのセルラーゼの添加が、 - アミラーゼの収率を改善し、かつ抽出時間を減少させることが、驚くべきことに今や発見された。本発明の好ましい態様は、従属請求項中に開示されている。

【0011】

図1は、時間関数に対する - アミラーゼの収率における温度の影響を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の方法は、種々の - アミラーゼ含有穀物の抽出、例えば、小麦、大麦、ライ麦及び大豆の加工に適用可能である。それは、好ましくは、小麦及びライ麦の、特に好ましくは大麦の - アミラーゼを抽出するために使用される。発芽していない穀粒は、 - アミラーゼ以外の酵素を多量に含まないため、このような穀粒から - アミラーゼを抽出することは価値がある。酵素は、脱穀されていない穀粒からも抽出され得るが、好ましくは脱穀、製粉、粉碎又は研磨された穀粒から抽出される。ライ麦及び大麦を脱穀することが望ましい。最良の結果は、脱穀した大麦の穀粒を抽出することによって得られる。

【0013】

穀粒の内胚乳から抽出物への澱粉の出入りを防止するために、脱穀は、実際の生きている穀粒を粉砕しないように実施される必要がある。しかしながら、実際の穀は、できるだけ注意深く取り除かれなければならない。これは、穀が - アミラーゼの浸透を妨げるほど稠密なためである。従って、脱穀された大麦とは、穀粒の実際の殻は取り除かれているが、内胚乳はそのまま残されている大麦を意味する。実際には、これは、脱穀されていない穀粒の重量の最大約20%が、脱穀によって取り除かれることを意味する。通常10ないし20%が、殻物質として取り除かれる。その場合は、内胚乳の最も外側の層(果皮層、種皮層及び糊粉層)は、抽出水への不溶性物質の出入り及び本質的には、可溶性物質の出入りも防止する限外フィルター類のように機能する。この方法によって加工された穀粒から得られた抽出物は、比較的純粋であり、そしてそれは、酵素の精製及び濃縮のような

10

20

30

40

50

更なる加工を促進する。加圧濾過及び限外濾過のような酵素産業において一般的に知られている方法が、更なる加工において使用され得る。

【0014】

穀物は、水のような水性媒体中、又は緩衝溶液中で抽出される。抽出の間、pHは通常、6.0から6.5の間である。抽出は、好ましくは還元条件で実施される。穀粒の構造タンパク質に結合している α -アミラーゼが解離される程の還元活性が使用される。還元条件は、本質的に既知の方法において、実際には、たいてい SO_2 を用いて、例えばメタ重亜硫酸ナトリウム及び/又は亜硫酸ナトリウムを添加することによって調整される。脱穀した穀粒と水性媒体の比は、好ましくは5:8から2:3の間である(重量/体積)。本発明の方法は、工業規模の方法として適しており、抽出は、スチールサイロ中で実施され、そしてそこへ、例えば脱穀された大麦19トン及びメタ重亜硫酸ナトリウムを0.5%及び亜硫酸ナトリウムを0.5%含む水29m³が添加される。

10

【0015】

上記の方法で大麦を抽出することにより、大麦の総 α -アミラーゼ含有量の約45%ないし50%を含む抽出収量が、穀粒内部に残っている水を分離することなく得られ得る。その場合における、抽出時間は約72時間である。セルラーゼが抽出水へ添加される場合、穀物中の α -アミラーゼの総量の65%ほどが抽出され得ると同時に、抽出時間が約60時間まで減少する。

【0016】

セルロースは、グルコース単位が β -1,4-グルコシド結合によって結合している直鎖グルコース多糖である。それは、植物の細胞壁中で見られ、そこに通常、リグニン及びヘミセルロースと共に存在する。セルロースの分解反応に関係する酵素は、セルラーゼだと考えられている。セルラーゼは、産業上、例えば澱粉製造、紙素材加工、布加工、醸造所における β -グルカンの分解、及び製パン所における穀粉の質の改善に使用される。本発明に従った方法において、セルラーゼは、生きている穀粒のいかなる殻の下にある表面構造を分解する。

20

【0017】

市販で入手可能なセルラーゼ製品は、バシラス属等の細菌、又は酵母菌(例えば、サッカロミセス)もしくは糸状菌等の菌類から誘導される。特に、多量のセルラーゼは、糸状菌から単離される。最も一般的に使用されるセルラーゼ産生菌は、フミコラ、フサリウム、ミセリオプトラ(Myceliophthora)、アスペルギルス、ペニシリウム及びトリコデルマ属に属する。産生菌株のいくつかは、遺伝子変性される。本発明では、好ましくは糸状菌、特にトリコデルマ糸状菌から誘導されたセルラーゼを使用する。

30

【0018】

市販の酵素配合物は、種々の酵素活性を有し、それらの量及び割合は、製造業者によってわずかに変化し得る。製品が少なくともセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及び β -グルカナーゼ活性を有することが、本発明にとって必須である。これに関連して言い換えれば、セルラーゼは、少なくともセルロース、ヘミセルロース及び β -グルカンを分解する酵素配合物として言及される。出願者によって試験された全ての市販のセルラーゼ製品(ジーンコアインターナショナル(Genencor International)、ロームエンザイマーゲーエムベーハー(Rohm Enzymer GmbH)及びノボノルディスク(Novo Nordisk)社製)は、 α -アミラーゼの収率を改善した。セルラーゼ、ヘミセルラーゼ及び β -グルカナーゼ活性は、例えば、ノボ社の実用生物工学手引き書、1986年に記載されている。

40

【0019】

セルラーゼは、例えば、エンドセルラーゼ、エキソセルラーゼ、エキソセロビオヒドロラーゼ及びセルピアーゼに分類され得る。エンドセルラーゼ、とりわけ、 β -D-グルカングルカノヒドロラーゼは、分子内部のセルロースの β -1,4結合をランダムに開裂し、オリゴ糖を形成する。エキソセルラーゼ、とりわけ、 β -D-グルカングルコヒドロラーゼは、分子末端の β -1,4結合を開裂し、グルコースを解離する。

50

セルビオースに対するそれらの効果は遅い。エキソセロビオヒドロラーゼ、とりわけ、1,4-β-D-グルカンセロビオヒドロラーゼは、分子の非還元末端で、上記結合を開裂し、セルビオースを形成し、そしてセルビアーゼ、とりわけ、β-D-グルコシドグルコヒドロラーゼは、セルビオースをグルコースへ開裂する。グルコースへのセルロースの加水分解は、分子の内部及び置換基質も開裂するが、結晶化セルロースは分解しないエンドグルカナーゼ(1,4-β-D-グルカングルカノヒドロラーゼ, EC 3.2.1.4)、結晶化セルロースを開裂するセロビオヒドロラーゼ(1,4-β-D-グルカンセロビオヒドロラーゼ, EC 3.2.1.91)及びセルビオース及びセル-オリゴ糖をグルコースへ開裂するセルビアーゼであるβ-D-グルコシダーゼ(β-D-グルコシドグルコヒドロラーゼ, EC 3.2.1.21)を必要とする。

10

【0020】

ヘミセルロース、とりわけ自然に存在するような多糖を分解し、ペントース、例えば、アラビナン、ガラクトサン、マンナン及びキシランを含む酵素群は、ヘミセルラーゼと呼ばれる。β-D-グルカナーゼは、β-D-グルカン、とりわけ、枝分かれされ得り、かつ1,3及び1,4結合の両方を含むグルコースポリマーを分解する。β-D-グルカナーゼは、例えば、穀粒の内胚乳細胞の細胞壁中で見られる。リケナーゼは、1,3及び1,4結合を含むβ-D-グルカンの1,4結合を開裂するエンドβ-D-グルカナーゼ(1,3,1,4-β-D-グルカン-4-グルカノヒドロラーゼ)である。ラミナリナーゼ(1,3-β-D-グルカン-3-グルカノヒドロラーゼ)は、ラミナリン型炭水化物の1,3結合のような、1,3結合のみを含むβ-D-グルカンを開裂し、そしてエキソグルカナーゼ(1,3-β-D-グルカングルコヒドロラーゼ)は、1,3-グルカンの1,3結合を開裂し、主にグルコースを形成する。

20

【0021】

α-D-アミラーゼの抽出において、所望の結果、例えば、ジーンコア インターナショナル(Genencor International)社製のセルラーゼ配合物、スペザイムCE(Spezyme CE)及びGC440を用いて達成される。最後に言及したものは、遺伝子変性されたトリコデルマ ロンギブラチアタム菌株から誘導され、そしてそれは、セルロース、ヘミセルロース及びβ-D-グルカンを、特に効果的に分解する。その活性は、カルボキシメチルセルロース(RBB-CMC)上の効果として表され、すなわち、RBB-CMC活性は、少なくとも1400IU/gである。GC440は、セルラーゼ活性に加えて、β-D-グルカナーゼ、β-D-グルコシダーゼ、α-D-キシロシダーゼ、キシラナーゼ及びアセチルエステラーゼ活性を有する。GC440の典型的なバッチは、平均約7000ないし9000U/mLのDNS-CMC、約6000ないし8000U/mLのβ-D-グルカナーゼ、約80ないし90U/mLのβ-D-グルコシダーゼ、約500ないし600nKat/mLのα-D-キシロシダーゼ、約1700ないし2000nKat/mLのアセチルエステラーゼ、約700ないし1400U/mLのRBBキシラナーゼ及び約1900ないし2100U/mLのDNSキシラナーゼを含む。非常に良好な結果は、ローム エンザイム ゲーエムベーハー(Rohm Enzyme GmbH)社製のセルラーゼを使用しても達成され、そしてそれは、商標名ロハラゼセブ(登録商標: Rohalase)として売られている。配合物は、トリコデルマレーセイ(Trichoderma reesei)菌株から誘導され、そしてそれは多量の1,4-エンドグルカナーゼ活性(少なくとも4700CU/g)及びキシラナーゼ(少なくとも3000XylH/g)及び、少量のセロビオヒドロラーゼ活性を含む。それは、1,3-グルカナーゼ活性、とりわけラミナリナーゼも含む。上記酵素配合物を使用する場合、セルラーゼの適当量は、穀物の重量の、少なくとも0.015%、好ましくは、少なくとも0.020%、例えば、0.018ないし0.040%及び特には、0.024ないし0.030%である。

30

40

【0022】

α-D-アミラーゼは、セルラーゼの存在下において、20ないし45℃の温度において抽出され得る。温度は、好ましくは25ないし32℃、例えば29ないし31℃である。抽

50

出時間は、30ないし72時間であり得り、通常、少なくとも48時間、例えば48ないし66時間及び特には、55ないし62時間である。30 においての適当な抽出時間は、約60時間である。抽出が完了した後、穀粒、ひき割り小麦又は穀粉を、例えば篩を用いて、抽出水から分離し、そして - アミラーゼを抽出水から回収し、そして、所望により、それを精製及び/又は濃縮する。

【0023】

抽出後、この方法で抽出及び分離された穀物は、例えば、澱粉を製造するために使用され得る。本発明に従って、 - アミラーゼが抽出され及び抽出物は、澱粉が分画され、穀物から分離される前に、穀物から分離される。もしも、破壊されていない穀粒から、酵素が抽出された場合、抽出された穀粒は、まず製粉され、その後、澱粉製造加工が、本質的に既知の方法、とりわけ、製粉した穀粒を水へ混合し、穀物を、篩いかけ及び遠心力を利用して画分化することによって実施される。製粉の間、粘度を減少させ、タンパク質から澱粉を分離するために、通常、セルラーゼを - グルカナーゼと一緒に添加する。

10

【0024】

以下の実施例は、そこに開示された態様に制限することなく、本発明を説明する。

【実施例1】

【0025】

- アミラーゼの決定

穀物からの - アミラーゼの総量を決定する前に、いかなる殻も取り除き、乾燥して微細な穀粉になる場合には、分析される穀物を製粉し、そしてその10gを100mL三角ボトル中に入れる。0.5% (重量/体積) 亜硫酸ナトリウム溶液100mLを添加し、その物質を、適当に混合した。混合物は、ボトル内に24時間放置されるが、それは時々、振とうされる。この後、それを適当に混合し、薄い濾紙 (MW640W) を通して、濾過した。濾液を、蒸留水を用いて1:50の比で希釈し、その活性を下記の方法によって決定した。この酵素検定は、下記の実施例において、抽出溶液の - アミラーゼ含有量を決定するため等にも使用される。

20

【0026】

原則として、 - アミラーゼは、食物化学処方集 第4巻, 一般試験及び装置, 485頁に記載された通りに決定された。

30

【0027】

ここで、DP (糖化力) は、20 において、1時間に、基質100mLからフェーリング溶液5mLを還元するのに十分な量の還元糖を生ずる5%試料希釈溶液0.1mL中の酵素の量として定義される (決定方法は、DPの定義に相当しない)。

【0028】

酵素活性は、20、pH4.6において、30分間、澱粉を加水分解することによって決定された。結果として生じた還元糖は、アルカリ性フェリシアン化物を用いた滴定によって決定された。澱粉基質を製造するために、澱粉 (ベーカー (Baker) 1130) 20g (乾燥物質) を水約50mLと共に混合した。熱湯約500mLを添加し、その混合物を厳密に2時間煮沸した。酢酸緩衝液20mL (0.5M, pH4.6) を冷却した澱粉溶液へ添加し、蒸留水で1Lまで希釈した。20 に調節した澱粉基質200mLを、250mLメスフラスコ中へピペットで移し、希釈した酵素試料10mLを添加し、物質を十分に混合した。試料を、厳密に30分間、水浴中で20 において保温し、0.5NのNaOH20mLを添加した。物質を十分に混合し、250mLまで希釈した。酵素希釈液10mL及び0.5NのNaOH20mLを、0 - 試料として、250mLメスフラスコ中へピペットで移した。物質を十分に混合し、澱粉基質200mLを添加し、そして250mLまで希釈した。

40

【0029】

0.05Nのフェリシアン化試薬を、フェリシアン化カリウム ($K_3Fe(CN)_6$) 16.5g及び炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) 22gを水中に溶解させ、1Lまでそれ

50

を希釈することによって調製した。A - P - Z 溶液は、塩化カリウム (K C l) 7 0 g 及び硫酸亜鉛 (Z n S O ₄ × 7 H ₂ O) 2 0 g を蒸留水 7 0 0 m L 中に溶解させ、濃酢酸 2 0 0 m L を添加し、1 L までそれを希釈することによって調製した。ヨウ化カリウム溶液を、ヨウ化カリウム (K J) 5 0 g を蒸留水 1 0 0 m L 中に溶解させ、5 0 % 水酸化ナトリウム (N a O H) を 2 滴添加することによって調製した。フェリシアン化試薬 1 0 m L 及び試料 5 m L を、2 5 0 m L メスフラスコ中へピペットで移した。これらを十分に混合し、熱湯浴中で、厳密に 2 0 分間加熱した。溶液を冷まし、A - P - Z 試薬 2 5 m L 及び K J 溶液 1 m L を添加した。青色が消えるまで (紺青色 > 白色) 、混合物を、0 . 0 5 N 硫酸ナトリウム溶液で滴定した。

【 0 0 3 0 】

- アミラーゼ活性は、次式

$$\text{活性} = (V 0 - V 1) \times 2 3 \times K / 1 0 0 \quad D P ^ \circ / m L$$

V 0 = 0 - 試料での滴定による消費量 (m L)

V 1 = 試料での滴定による消費量 (m L)

K = 希釈率

から計算した。

【 実施例 2 】

【 0 0 3 1 】

- アミラーゼの抽出時間におけるセルラーゼの効果を研究した。 - アミラーゼを、セルラーゼなし及びセルラーゼ有りで大麥から抽出した。脱穀機で脱穀した大麥 1 0 k g を、メタ重亜硫酸ナトリウム 0 . 5 % 及び亜硫酸ナトリウム 0 . 5 % を含む水 1 5 L 中で抽出した。更に、ジーンコア (G e n e n c o r) 社製のセルラーゼ、G C 4 4 0 を第二バッチへ添加したが、セルラーゼの量は、脱穀した大麥の重量の 0 . 0 2 9 % に相当する。抽出を 3 0 において実施した。抽出に使用された穀粒の活性は、実施例 1 に従って決定し、1 5 5 D P ° / g であった。結果を表 1 及び 2 に示す。

表 1 : セルラーゼなしでの抽出

【 表 1 】

時間 (時間)	抽出溶液の β - アミラーゼ活性 (DP°/mL)
10	20
24	47
30	55
48	83
60	92
66	98
72	102
96	86

表 2 : セルラーゼ有りでの抽出

10

20

30

40

【表 2】

時間 (時間)	抽出溶液のβ-アミラーゼ活性 (DP°/mL)
10	23
24	55
30	70
48	92
60	104
66	104
72	100
96	90

10

【0032】

結果は、抽出水へのセルラーゼの添加がβ-アミラーゼの抽出時間を減少させることを示している。

【実施例 3】

【0033】

20

抽出収率におけるセルラーゼの影響を研究した。155 DP°/gのβ-アミラーゼ活性を有する脱穀した大麦10kgを、メタ重亜硫酸ナトリウム0.5%及び亜硫酸ナトリウム0.5%を含む水15L中で抽出した。抽出を、セルラーゼなし又はセルラーゼ存在下のどちらかにおいて、30分で行った。

【0034】

セルラーゼなしのものの抽出時間は、72時間であった。使用した大麦の総量の総活性は、1550 k DP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、95° DP/mLの活性を有する抽出物を8175 mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、776.6 k DP°であり、抽出物収率は、50.1%であった。

【0035】

30

相当する抽出を、脱穀した大麦の重量の0.025%に相当する量のGC440を添加することによって、セルラーゼの存在下において実施した。抽出時間は60時間であった。使用した大麦の総量の総活性は、1550 k DP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、102° DP/mLの活性を有する抽出物を9825 mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、1002.2 k DP°であり、抽出物収率は、64.7%であった。

【0036】

結果は、抽出水へのセルラーゼの添加がβ-アミラーゼの収率を非常に増加させることを示している。

【実施例 4】

40

【0037】

β-アミラーゼの抽出における温度の効果を研究した。脱穀した大麦を、セルラーゼの存在下で異なる温度において、上記実施例に記載した方法で抽出した。セルラーゼ、GC440の用量は、脱穀した大麦の重量の0.027%に相当し、そして抽出温度は、20°C、25°C、30°C又は40°Cであった。結果を図1に示す。最良の結果は、30°Cにおいて得られた。

【実施例 5】

【0038】

小麦からのβ-アミラーゼ収率におけるセルラーゼの効果を研究した。128 DP°/gのβ-アミラーゼ活性を有する粉碎した小麦10kgを、メタ重亜硫酸ナトリウム0.5%

50

5%及び亜硫酸ナトリウム0.5%を含む水15L中で抽出した。抽出を、セルラーゼなし又はセルラーゼ存在下のどちらかにおいて、30℃で実施した。

【0039】

セルラーゼなしのものの抽出時間は、72時間であった。使用した小麦の総活性は、1280kDP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、55°DP/mLの活性を有する抽出物を9175mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、504.6kDP°であり、抽出物収率は、39.4%であった。

【0040】

相当する抽出を、粉碎した小麦に相当するひき割り小麦の重量の0.036%に相当する量のセルラーゼ、GC440を添加することによって、セルラーゼの存在下において実施した。抽出時間は60時間であった。使用した小麦の総活性は、1280kDP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、72°DP/mLの活性を有する抽出物を10080mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、725.8kDP°であり、抽出物収率は、56.7%であった。

10

【0041】

結果は、抽出水へのセルラーゼの添加が - アミラーゼの収率を非常に増加させることを示している。

【実施例6】

【0042】

研磨した小麦からの - アミラーゼ収率におけるセルラーゼの効果を研究した。精米機を用いて、表面を壊し、最外部を取り除くことによって、言い換えれば、果皮の大部分を取り除きかつ種皮を少ししか傷つけずに小麦を研磨した。128DP°/gの - アミラーゼ活性を有する研磨した小麦10kgを、メタ亜硫酸ナトリウム0.5%及び亜硫酸ナトリウム0.5%を含む水15L中で抽出した。抽出を、セルラーゼなし又はセルラーゼ存在下のどちらかにおいて、30℃で実施した。

20

【0043】

セルラーゼなしのものの抽出時間は、72時間であった。使用した小麦の総活性は、1280kDP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、15°DP/mLの活性を有する抽出物を9780mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、146.7kDP°であり、抽出物収率は、11.5%であった。

30

【0044】

相当する抽出を、粉碎した小麦に相当する研磨した小麦の重量の0.036%に相当する量のセルラーゼ、GC440を添加することによって、セルラーゼの存在下において実施した。抽出時間は60時間であった。使用した小麦の総活性は、1280kDP°であった。篩を用いて抽出物を分離することにより、35°DP/mLの活性を有する抽出物を9250mL得た。従って、得られた抽出物の総活性は、323.8kDP°であり、抽出物収率は、25.3%であった。

【0045】

結果は、抽出水へのセルラーゼの添加が - アミラーゼの収率を非常に増加させることを示している。

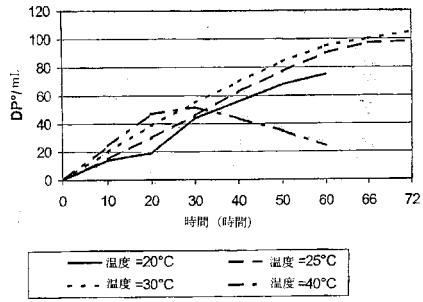
40

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】時間関数に対する - アミラーゼの収率への温度の影響。

【 1】



フロントページの続き

(72)発明者 ケッキ, ペッカ

フィンランド エフアイエヌ - 3 0 1 0 0 フォーサー サーテリンカツ 5

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 米国特許第 0 4 6 7 5 2 9 6 (U S , A)

米国特許第 0 3 4 9 2 2 0 3 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 9/00

PubMed

JSTPlus(JDream2)