(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3793590号

(P3793590)

(45)発行日　平成18年7月5日(2006.7.5)　(24)登録日　平成18年4月14日(2006.4.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C08B 37/00	(2006.01)	C08B	37/00	G
C12P 19/16	(2006.01)	C12P	19/16	
C12P 19/18	(2006.01)	C12P	19/18	

請求項の数 14　(全 52 頁)

(21)出願番号　特願平7-116583
(22)出願日　平成7年4月19日(1995.4.19)
(65)公開番号　特開平8-73504
(43)公開日　平成8年3月19日(1996.3.19)
審査請求日　平成13年6月21日(2001.6.21)
(31)優先権主張番号　特願平6-165815
(32)優先日　平成6年6月27日(1994.6.27)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

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

(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　万代　隆彦
岡山県岡山市政津１４２８番地
(72)発明者　渋谷　孝
岡山県総社市下原３１８番地
(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
岡山市伊島町１丁目３番２３号

審査官　左海　匡子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非還元性糖質とその製造方法並びに用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

澱粉を液化した溶液に、グルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する非還元性糖質生成酵素を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とともに作用させるか、又は、非還元性糖質生成酵素及びα－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素を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とともに作用させて、トレハロース、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、及び分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質から選ばれる１種又は２種以上の非還元性糖質を生成せしめ、該非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取することを特徴とする非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項２】

非還元性糖質生成酵素の理化学的性質が、

（１）　作用

グルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する。

（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。
また、トレハロース遊離酵素の理化学的性質が、
（１）　作用
α－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。
（２）　分子量
ＳＤＳ－ゲル電気泳動法により、約５７，０００乃至６８，０００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３．３乃至４．６。
（４）　至適温度
ｐＨ７．０、３０分間反応で、３５乃至４５℃付近。
（５）　至適ｐＨ
４０℃、３０分間反応で、ｐＨ約６．０乃至７．５。
（６）　温度安定性
ｐＨ７．０、６０分間保持で、３０乃至４５℃付近まで安定。
（７）　ｐＨ安定性
２５℃、１６時間保持で、ｐＨ約５．０乃至１０．０。
であることを特徴とする請求項１記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項３】
澱粉を液化した溶液が、濃度１０ｗ／ｗ％以上の澱粉をＤＥ１５未満に液化した溶液である請求項１又は２記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項４】
酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約０．０１乃至１００単位から選ばれ、また、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場合、約０．０５乃至５００単位から選ばれる量である請求項１乃至３のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項５】
非還元性糖質生成酵素を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とともに作用させるとき、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を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とともに作用させるときに、さらに澱粉枝切酵素を併用することを特徴とする請求項１又は２記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項６】
澱粉枝切酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、約１乃至１０，０００単位から選ばれる量である請求項５記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項７】
得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質に、さらにβ－アミラーゼ、グルコアミラーゼ又はα－グルコシダーゼを作用させて非還元性糖質及び夾雑糖質含有溶液とし、これをカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させた非還元性糖質

を採取することを特徴とする請求項１乃至６のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項８】

カラムクロマトグラフィーが、塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーである請求項７記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項９】

トレハロースが含水結晶又は無水結晶である請求項１乃至８のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項１０】

澱粉を液化した溶液に、グルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する非還元性糖質生成酵素か、又は、非還元性糖質生成酵素及びα－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素を作用させるに際し、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用することを特徴とするトレハロース、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、及び分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質から選ばれる１種又は２種以上の非還元性糖質の増収方法。

【請求項１１】

非還元性糖質生成酵素の理化学的性質が、

（１）　作用

グルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する。

（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。

また、トレハロース遊離酵素の理化学的性質が、

（１）　作用

α－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

（２）　分子量

ＳＤＳ－ゲル電気泳動法により、約５７，０００乃至６８，０００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３．３乃至４．６。

（４）　至適温度

ｐＨ７．０、３０分間反応で、３５乃至４５℃付近。

（５）　至適ｐＨ

４０℃、３０分間反応で、ｐＨ約６．０乃至７．５。

（６）　温度安定性

ｐＨ７．０、６０分間保持で、３０乃至４５℃付近まで安定。

（７）　ｐＨ安定性

２５℃、１６時間保持で、ｐＨ約５．０乃至１０．０。

であることを特徴とする請求項１０記載の非還元性糖質の増収方法。
【請求項１２】
酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約０．０１乃至１００単位から選ばれ、また、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場合、約０．０５乃至５００単位から選ばれる量である請求項１０又は１１記載の非還元性糖質の増収方法。
【請求項１３】
さらに澱粉枝切酵素を併用することを特徴とする請求項１０乃至１２のいずれかに記載の非還元性糖質の増収方法。
【請求項１４】
澱粉枝切酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、約１乃至１０，０００単位から選ばれる量である請求項１３記載の非還元性糖質の増収方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、非還元性糖質とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースなどの非還元性糖質と該非還元性糖質の澱粉からの製造方法、並びに該非還元性糖質、又は、これを含む低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）及び『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・ホスホリラーゼ及びトレハロース・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】

これを解決するために、本発明者等は、先に、特願平５－３４９２１６号明細書（特開平７－１４３８７６号公報）で、グルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物から分子の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新規非還元性糖質生成酵素（本酵素を、本明細書を通じて、非還元性糖質生成酵素と称する。）を開示し、本非還元性糖質生成酵素を利用して、還元性澱粉部分分解物から分子末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質とこれを含む低還元性糖質並びにこれら糖質からのトレハロースの製造方法を確立した。

【０００９】

しかしながら、この方法で得られる低還元性糖質は、原料の還元性澱粉部分分解物が比較的高分子の場合には、その還元力をよく低減しているものの粘度が高すぎるきらいがあり、また、原料の還元性澱粉部分分解物が比較的低分子の場合には、還元力の低減が不充分であることが判明した。また、このようにして得られた低還元性糖質にグルコアミラーゼを作用させて生成されるトレハロースは、原料の還元性澱粉部分分解物からの収量が、工業的に生産するにはあまりに低すぎることも判明した。これらを改善するためには、還元性澱粉部分分解物から更に低分子の非還元性糖質をより高収量で製造する方法の確立が望まれる。

【００１０】

また、本発明者等は、特願平６－７９２９１号明細書（特開平７－２１３２８３号公報）で、分子の末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する新規トレハロース遊離酵素（本酵素を、本明細書を通じて、トレハロース遊離酵素と称する。）を開示し、前述の非還元性糖質生成酵素と本トレハロース遊離酵素とを併用して還元性澱粉部分分解物から比較的高収量のトレハロースの製造方法を確立した。しかしながら、トレハロースを工業的に大量生産するには、その収量を更に向上させる製造方法の確立が望まれる。

【００１１】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、安価で安定供給の容易な澱粉を原料として、比較的低分子の分子末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質（以下、本物質を、本明細書では、α－グリコシルトレハロースと称する。）、トレハロースの両グルコースに重合度１若しくは２以上のグルコースを有している非還元性糖質、換言すれば、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質（以下、本物質を、本明細書では、α－グリコシル　α－グリコシドと称する。）及びトレハロースなどの非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を高収量で製造する方法を確立し、併せて、これら糖質の用途を提供するものである。
【００１２】
【課題を解決するための手段】
本発明者等は、前記課題を解決するために、澱粉を原料に非還元性糖質の製造方法について鋭意研究を続けてきた。その結果、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させるに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトトランスフェラーゼを併用することにより目的を達成し得ることを見いだし、本発明を完成した。
【００１３】
すなわち、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液、望ましくは、ＤＥ１５未満の溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させてα－グリコシルトレハロース、又は、これを含む低還元性糖質を製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又は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ともに作用させて得られる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、非還元性糖質生成酵素だけを作用させた場合と比較して、その還元性をほとんど増加させることなく、その分子量を著しく低減し、粘度を低下し、その取扱いを容易にすることが判明した。更に、このようにして得られた低還元性糖質にグルコアミラーゼを作用させたところ、その構造中に含まれるトレハロース含量が大幅に増加していることも判明した。また、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液、望ましくはＤＥ１５未満の溶液に非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させてトレハロースを製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又は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ともに作用させて得られるトレハロースは、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを作用させた場合と比較して、その収量が大幅に増加することが判明した。このようにして得られる非還元性糖質やこれを含む低還元性糖質は、安定性が高く、取扱い容易で、広範な用途に利用でき、例えば、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。
【００１４】
まず、本発明で用いる非還元性糖質生成酵素としては、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液に含まれるグルコース重合度３以上から選ばれる１種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する酵素であればよく、例えば、特願平５－３４９２１６号明細書（特開平７－１４３８７６号公報）に開示されるリゾビウム属、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及びテラバクター属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性の非還元性糖質生成酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平６－１６６０１１号明細書（特開平８－６６１８８号公報）で開示したスルフォロブス属由来の耐熱性非還元性糖質生成酵素を用いることも有利に実施できる。また、トレハロース遊離酵素としては、澱粉を液化した溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させて生成されるα－グリコシルトレハロースを、そのトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する酵素であればよく、例えば、特願平６－７９２９１号明細書（特開平７－２１３２８３号公報）に開示されているリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、及びミクロコッカス属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性のトレハロース遊離酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平６－１６６１２６号明細書（特開平８－６６１８７号公報）で開示したスルフォロブス属に属するトレ

ハロース遊離酵素を用いることも有利に実施できる。微生物から非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を調製する方法は、これら酵素の産生能を有する微生物を培養して調製すればよい。

【００１５】

微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を産生し得る栄養培地であればよく、合成培地及び天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化し得る物であればよく、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、又はその塩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、菌の生育及び増殖からは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及び、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。

【００１６】

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。また、耐熱性酵素を産生する微生物の場合には、通常、温度４０乃至９０℃、好ましくは５０乃至８０℃、ｐＨ２乃至１０、好ましくはｐＨ３乃至９から選ばれる条件で行われる。培養時間は微生物が増殖し得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、回分培養又は連続培養のいずれでもよい。

【００１７】

このようにして、微生物を培養した後、酵素を回収する。酵素活性は、培養物の菌体及び除菌液いずれにも認められ、菌体及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、アセトン及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。

【００１８】

更に、除菌液及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、樹脂及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、ガラスビーズ及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、遠心分離又は膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【００１９】

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、

東ソー株式会社製『ＤＥＡＥ－トヨパール』など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、同社製『ブチルトヨパール』などを用いた疎水カラムクロマトグラフィー、同社製『トヨパール　ＨＷ－５５』など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。

【００２０】

このようにして得られる非還元性糖質生成酵素は、一般的には、例えば、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種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成する。

（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。

【００２１】

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。

【００２２】

また、前述のようにして得られるトレハロース遊離酵素は、一般的には、例えば、下記の理化学的性質を有する。

（１）　作用

α－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

（２）　分子量

ＳＤＳ－ゲル電気泳動法により、約５７，０００乃至６８，０００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３．３乃至４．６。

（４）　至適温度

ｐＨ７．０、３０分間反応で、３５乃至４５℃付近。

（５）　至適ｐＨ

４０℃、３０分間反応で、ｐＨ約６．０乃至７．５。

（６）　温度安定性

ｐＨ７．０、６０分間保持で、３０乃至４５℃付近まで安定。

（７）　ｐＨ安定性

２５℃、１６時間保持で、ｐＨ約５．０乃至１０．０。

【００２３】

トレハロース遊離酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトトリオシルト

レハロース（別名、α－マルトテトラオシル　α－Ｄ－グルコシド）１．２５ｗ／ｖ％（５０ｍＭリン酸緩衝液、ｐＨ７．０）４ｍｌに酵素液を１ｍｌ加え４０℃で３０分間反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、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のグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を１単位と定義する。

【００２４】

次に、本発明で用いる澱粉枝切酵素は、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液、望ましくは、ＤＥ１５未満の液化溶液に作用し、澱粉の枝分かれ結合を加水分解する酵素であって、公知のプルラナーゼ、イソアミラーゼなどが有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。また、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は、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液、望ましくは、ＤＥ１５未満の液化溶液に作用し、澱粉糖を糖転移し、不均化（ｄｉｓｐｒｏｐｏｒｔｉｏｎａｔｉｏｎ）反応する酵素であって、公知のバチルス属、クレブシーラ属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。

【００２５】

また、前述の澱粉枝切酵素及び／又は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に加えて、必要に応じて、他のアミラーゼ、望ましくは、澱粉を比較的低ＤＥに液化した溶液に作用して、主としてグルコース重合度３以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼ、例えば、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、マルトヘプタオース生成アミラーゼなどを用いることも有利に実施できる。

【００２６】

本発明で使用される澱粉は、とうもろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。澱粉を液化するには、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは濃度１０％以上、更に望ましくは約２０乃至５０％とし、これを加熱して機械的に液化しても、酸又は酵素で液化してもよい。液化の程度は、比較的低いものが適しており、望ましくはＤＥ１５未満、更に望ましくはＤＥ１０未満のものが好適である。酸で液化する場合には、例えば、塩酸、燐酸、蓚酸などで液化し、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで必要ｐＨに中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、α－アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型α－アミラーゼの使用が適している。

【００２７】

このようにして得られる澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又は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とともに作用させるか、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又は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とともに作用させるには、これら酵素が作用し得るｐＨ、温度で行えばよく、通常、ｐＨ４乃至１０、好ましくは、ｐＨ５乃至８、温度約１０乃至８０℃、好ましくは、約３０乃至７０℃で行われる。また、澱粉を液化した溶液にこれら酵素を加える順序は問わず、いずれかの酵素を先に加え、他の酵素をその後に加えて作用させることも、また、これら酵素を同時に加えて作用させることも随意である。

【００２８】

酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよいが、通常、基質である澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約０．０１乃至１００単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約１乃至１０，０００単位から選ばれ、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場合、約０．０５乃至５００単位から選ばれる。このようにして得られる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、澱粉を液化した溶液に、澱粉枝切酵素及び／又は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が非還元性糖質生成酵素又は非

還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに作用するため、比較的低分子のα－グリコシルトレハロース及び／又はα－グリコシル　α－グリコシドを多量に含有するか、又はトレハロースを多量に含有する特長を有している。なお、α－グリコシル　α－グリコシドは、本出願人が、特願平６－５４３７７号明細書（特開平７－７０１６５号公報）で開示したα－Ｄ－オリゴグルコシル　α－Ｄ－オリゴグルコシドを含む呼称である。

【００２９】

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、アルコール及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種又は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。

【００３０】

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。

【００３１】

このようにして得られた本発明の分子中にトレハロース構造を有する非還元性糖質、又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、又は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。

【００３２】

とりわけ、本発明の分子中にトレハロース構造を有する非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼ又は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、これらの非還元性又は低還元性糖質にグルコアミラーゼ又は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又は無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【００３３】

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、必要に応じて、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。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスキットからトレハロース含水結晶又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。

【００３４】

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又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、これを粉砕又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【００３５】

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。

【００３６】

このようにして製造される本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、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。

【００３７】

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。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。

【００３８】

また、本発明のトレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。また、安定な甘味料であることにより、結晶高含有製品の場合には、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。

【００３９】

さらに、本発明のトレハロースは、保湿剤、増量剤、増粘剤などとして化粧用クリーム、ヘアリンス、乳液、化粧水などに使用され、その際、トレハロースとともに、例えば、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポリオキシエチレンオレイルアルコールなどの保湿剤と併用することも、更には、α－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸、酵素処理ルチンなどのビタミン類を配合して、水分保持効果に優れ、紫外線によるシミやソバカスを防止する効果、美白効果も期待される化粧品としても有利に実施できる。

【００４０】

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、又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。

【００４１】

従って、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、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。

【００４２】

本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、そのまま甘味付け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種又は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。

【００４３】

また、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、そのままで、又は必要に応じて、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。

【００４４】

また、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、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け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【００４５】

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。

【００４６】

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、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、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、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【００４７】

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、又は呈味改良剤、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。

【００４８】

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又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、インターフェロン－β、インターフェロン－γ、ツモア・ネクロシス・ファクター－α、ツモア・ネクロシス・ファクター－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、ペースト状又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。

【００４９】

以上述べたような各種組成物に非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質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。

【００５０】

次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【００５１】

まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１及びアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６からの非還元性糖質生成酵素について説明し、次いで、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。

【００５２】

【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％及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。

【００５３】

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。

【００５４】

【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、大日本製薬株式会社製『ミニラ

ボ』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、遠心分離して上清を回収した。

【００５５】

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』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。

【００５６】

本酵素は『ＤＥＡＥ－トヨパール』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して不溶物を除き、得られる上清を東ソー株式会社製『ブチルトヨパール　６５０』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』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。

【００５７】

【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

【００５８】

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。

【００５９】

【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・ラッド・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。

【００６０】

精製酵素標品を２％アンフォライン含有ポリアクリルアミドゲル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。

【００６１】
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。

【００６２】
【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、又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、和光純薬工業株式会社製『ワコービーズ　ＷＢ－Ｔ－３３０』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、東ソー株式会社製『ＲＩ－８０１２』で分析した。その結果を表２に示す。

【００６３】
【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	６．６

（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。

【００６４】
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。

【００６５】
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、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂、東京有機化学工業株式会社製『ＸＴ－１０１６』（架橋度４％）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％、ＰＩＶ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。

【００６６】

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。

【００６７】

【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

【００６８】

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れなかった。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。

【００６９】

【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、又は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、又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。

【００７０】

【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

【００７１】
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。
【００７２】
【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又は、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）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。
【００７３】
【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

【００７４】
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。
【００７５】
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、又は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。
【００７６】
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、基質の低分子化及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及び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及び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。
【００７７】
【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、又は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（同社販売）、又はラット小腸アセトン粉末酵素（同社販売）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－グルコシダーゼ及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。

【００７８】

【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。

【００７９】

【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

【００８０】

【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

【００８１】
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、及び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。
【００８２】
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。
【００８３】
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。
【００８４】
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種又は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、α－グリコシルトレハロースを生成している。
（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。
【００８５】
【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、及び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。

【００８６】

【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及び約０．７単位／ｍｌであった。

【００８７】

【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。

【００８８】

【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

【００８９】

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。

【００９０】

【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、及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。

【００９１】

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。

【００９２】
【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及び実験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種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成することが判明した。
【００９３】
【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。
【００９４】
【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）　表中、微生物名の略記は、下記の微生物を意味する。

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

【００９５】

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種又は２種以上の還元性澱粉部分分解物からα－グリコシルトレハロースを生成することが判明した。

【００９６】

次に、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１及びアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６からのトレハロース遊離酵素について説明し、次いで、公知微生物からのトレハロース遊離酵素について説明する。

【００９７】

【実験１４　リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１からのトレハロース遊離酵素の生産】

澱粉部分分解物、松谷化学工業株式会社製『パインデックス＃４』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％及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。

【００９８】

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を入れて殺菌、冷却して温度２７℃とした後、種培養液１ｗ／ｖを接種し、温度２７℃、ｐＨは６．０乃至８．０に保ちつつ、約７２時間通気撹拌培養した。

【００９９】

培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約１．５単位／ｍｌで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約２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、菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約０．６単位／ｍｌ、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約０．８単位／ｍｌ認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約０．９単位／ｍｌ、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約１．２単位／ｍｌ認められた。

【０１００】

【実験１５　酵素の精製】

実験１４の方法で得られた培養液約１８ｌを超高圧菌体破砕装置『ミニラボ』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の遠心上清液を得た。その液に飽和度０．２になるように硫安を加え溶解させ、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。

【０１０１】

更に、その液に硫安を飽和度０．６になるように溶解させ、４℃、２４時間放置した後、遠心分離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、遠心分離し、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』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。

【０１０２】

本発明のトレハロース遊離酵素、非還元性糖質生成酵素とも『ＤＥＡＥ－トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから異なる食塩濃度においてそれぞれ溶出した。『ＤＥＡＥ－トヨパール』からの溶出パターンを図９に示す。非還元性糖質生成酵素は食塩濃度約０．２Ｍで、トレハロース遊離酵素は食塩濃度約０．３Ｍで溶出し、それぞれの酵素活性画分を回収し、以下、両酵素を別々に精製した。

【０１０３】

非還元性糖質生成酵素活性画分を２Ｍ硫安を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を

遠心分離し不溶物を除き、得られる上清を『ブチルトヨパール　６５０』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２Ｍから０Ｍ硫安のリニアグラジエントでカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、『トヨパール　ＨＷ－５５』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量３００ｍｌ）を行い、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。

【０１０４】

トレハロース遊離酵素の精製は、『ＤＥＡＥ－トヨパール』から溶出したトレハロース遊離酵素活性画分を用いて、上記の非還元性糖質生成酵素の精製方法と同様に、２Ｍ硫安を含む緩衝液に対して透析し、次いで疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【０１０５】

精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を、非還元性糖質生成酵素の場合は表１１に、本発明のトレハロース遊離酵素の場合は表１２に示す。

【０１０６】

【表１１】

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）	収率（％）
培養液	２８，５００		１００
破砕後の上清	２２，９００	０．１２	８０
硫安塩析後の透析液	２１，１００	０．４３	７４
イオン交換カラム溶出液	１５，２００	６．２	５３
疎水カラム溶出液	７，９５０	１０１	２８
ゲル濾過溶出液	５，９８０	１９７	２１

【０１０７】

【表１２】

工程	トレハロース遊離酵素の活性量（単位）	比活性（単位／ｍｇ蛋白）	収率（％）
培養液	３７，４００		１００
破砕後の上清	３１，５００	０．１７	８４
硫安塩析後の透析液	２９，２００	０．６０	７８
イオン交換カラム溶出液	２５，４００	５．３	６８
疎水カラム溶出液	１８，７００	９８．５	５０
ゲル濾過溶出液	１１，６００	２４０	３１

【０１０８】
表１１及び表１２の工程でそれぞれゲル濾過溶出液として得られた、精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離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。
【０１０９】
【実験１６　トレハロース遊離酵素の性質】
実験１５の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素標品を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・ラッド・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５８，０００乃至６８，０００ダルトンであった。
【０１１０】
精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル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３．３乃至４．３であった。
【０１１１】
本酵素活性に対する温度の影響、ｐＨの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図１０（温度の影響）、図１１（ｐＨの影響）に示した。酵素の至適温度は、ｐＨ７．０、３０分間反応で、４５℃付近、至適ｐＨは、４０℃、３０分間反応で、約６．０乃至７．５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１２（温度安定性）、図１３（ｐＨ安定性）に示した。本酵素の熱安定性は約４０℃付近までであり、ｐＨ安定性は約５乃至１０であった。
【０１１２】
【実験１７　α－グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製】
基質として用いるα－グリコシルトレハロースは、特願平５－３４９２１６号明細書に記載する方法に従って調製した。即ち、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及びマルトヘプタオースから選ばれる還元性澱粉部分分解物の２０％水溶液に実験１５の方法で得られた精製非還元性糖質生成酵素標品を基質固形物グラム当りそれぞれ２単位の割合で加え、４０℃、ｐＨ７．０で４８時間作用させた

後、常法に従って、加熱失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『ＸＴ－１０１６』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。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、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が３以上の非還元性糖質の高純度標品を調製した。得られた高純度標品のうち、グルコシルトレハロース標品の純度は９７．６％で、マルトシルトレハロース標品の純度は９８．６％で、マルトトリオシルトレハロース標品の純度は９９．６％で、マルトテトラオシルトレハロース標品の純度は９８．３％で、マルトペンタオシルトレハロース標品の純度は９８．１％であった。

【０１１３】

上記５種の非還元性糖質（α－グリコシルトレハロース）の２０％水溶液を調製し、それぞれに実験１５で得られた精製トレハロース遊離酵素を基質固形物グラム当り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』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。対照として、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に精製トレハロース遊離酵素を同様に作用させ、高速液体クロマトグラフィーで分析した。それらの結果を表１３に示す。

【０１１４】

【表１３】

基質	反応物	ＨＰＬＣ溶出時間（分）	組成比（％）
グルコシルトレハロース	トレハロース	２７．４	１７．５
	グルコース	３３．８	６．５
	グルコシルトレハロース	２３．３	７６．０
マルトシルトレハロース	トレハロース	２７．４	４４．３
	マルトース	２８．７	４４．４
	マルトシルトレハロース	２１．６	１１．３
マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	２７．４	３９．５
	マルトトリオース	２５．９	６０．０
	マルトトリオシルトレハロース	１９．７	０．５
マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	２７．４	３４．２
	マルトテトラオース	２４．１	６５．５
	マルトテトラオシルトレハロース	１８．７	０．３
マルトペンタオシルトレハロース	トレハロース	２７．４	２９．１
	マルトペンタオース	２２．６	７０．６
	マルトペンタオシルトレハロース	１７．８	０．３
マルトトリオース	マルトトリオース	２５．９	１００
マルトテトラオース	マルトテトラオース	２４．１	１００
マルトペンタオース	マルトペンタオース	２２．６	１００
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	２１．８	１００
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	２１．０	１００

【０１１５】
表１３の結果から明らかなように、
（１）　トレハロース遊離酵素は、α－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とグ

リコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度が１以上の還元性糖質とを生成する。
（２）　マルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけない。
これらの結果から、本発明のトレハロース遊離酵素は、α－グリコシルトレハロースのトレハロース部分とその他のグリコシル部分との間の結合を極めて特異的に加水分解し、トレハロースを遊離する全く新しい作用機構の酵素であると判断される。
【０１１６】
次いで、それぞれの反応物からトレハロースを精製するため、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『ＸＴ－１０１６』を用いたカラム分画を行い、トレハロース含量９７％以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を濃縮して濃度約６５％にし、２５℃で２日間放置して含水トレハロース結晶を晶出させ、分蜜し、真空乾燥して、トレハロース含量９９％以上の高純度標品を調製した。原料基質に対するそれぞれの収率は、固形物換算で、グルコシルトレハロースから９．５％、マルトシルトレハロースから１４．９％、マルトトリオシルトレハロースから１６．０％、マルトテトラオシルトレハロースから１８．５％、マルトペンタオシルトレハロースから１７．７％であった。得られたそれぞれの高純度トレハロース標品用いて、市販の試薬トレハロース（和光純薬工業株式会社販売）を標準品として、融点、融解熱、比旋光度、赤外線吸収スペクトル、粉末Ｘ線回折パターン及びブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社製）での分解性について比較したところ、調製したすべての高純度トレハロース標品は、融点９７．０±０．５℃、融解熱５７．８±１．２ＫＪ／ｍｏｌｅ、比旋光度＋１８２±１．１°で、試薬トレハロースの実測値とよく一致し、また、赤外線吸収スペクトル及び粉末Ｘ線回折パターンについても、試薬トレハロースのスペクトル又はパターンとよく一致した。更に、ブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社製）によって、高純度トレハロース標品は試薬トレハロースと同様にグルコースに分解された。以上の結果から明らかなように、α－グリコシルトレハロースに本発明のトレハロース遊離酵素を作用させ生成した糖質はトレハロースであると確認された。
【０１１７】
【実験１８　還元性澱粉部分分解物からのトレハロースの調製】
５％ワキシーコーンスターチ懸濁液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）を澱粉グラム当り４，０００単位の割合になるように加え、２０時間反応させた。その反応液をオートクレーブ（１２０℃、１０分間）し、次いで６０℃に冷却し、これを東ソー株式会社製『トヨパールＨＷ－５０Ｓ』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量７５０ｍｌ）でグルコース重合度３５乃至１０の還元性澱粉部分分解物を調製した。
【０１１８】
得られた還元性澱粉部分分解物、又はグルコース重合度３のマルトトリオースを、１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）で１％濃度に調整し、これに実験１５の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離酵素標品をそれぞれ基質固形物グラム当り４単位の割合で加え、４０℃で２４時間作用させた後、一部を採り、脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。
【０１１９】
残りの反応液は、更に、５０℃、ｐＨ４．５に調整した後、グルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製）を基質固形物グラム当り５０単位の割合で加え、２４時間作用させ、同様に脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。それらの結果を表１４に示す。
【０１２０】
【表１４】

還元性部分分解物のグルコース重合度	反応物	組成比（％）	
		非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素反応後	グルコアミラーゼ反応後
３４．１	トレハロース	８０．８	８３．５
	グルコース	０．２	１６．５
	還元性オリゴ糖	１４．４	０．０
	グリコシルトレハロース	４．６	０．０
２６．２	トレハロース	７９．７	８２．５
	グルコース	０．２	１７．５
	還元性オリゴ糖	１５．３	０．０
	グリコシルトレハロース	４．８	０．０
１８．１	トレハロース	７７．７	８０．７
	グルコース	０．２	１９．３
	還元性オリゴ糖	１７．０	０．０
	グリコシルトレハロース	５．１	０．０
１５．２	トレハロース	７５．０	７８．５
	グルコース	０．３	２１．５
	還元性オリゴ糖	１８．６	０．０
	グリコシルトレハロース	６．１	０．０
１０．０	トレハロース	６６．１	７０．１
	グルコース	０．３	２９．９
	還元性オリゴ糖	２７．６	０．０
	グリコシルトレハロース	７．７	０．０
３（マルトトリオース）	トレハロース	４．２	２０．８
	グルコース	２．１	７９．２
	マルトトリオース	６５．０	０．０
	グルコシルトレハロース	２８．７	０．０

（注）表中、グリコシルトレハロースは、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が３以上の非還元性糖質を意味する。

【０１２１】

表１４に示すように、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させた後の

トレハロース生成率は、グルコース重合度３のマルトトリオースでは４．２％と低い値であったが、グルコース重合度１０乃至３４．１の澱粉部分分解物では６６．１乃至８０．８％の高い値が得られた。また、原料の還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が高い程、得られるトレハロース純度が高いことも判明した。更に、該両酵素を作用させた反応液にグルコアミラーゼを作用させ、残存するグルコース重合度が３以上のα－グリコシルトレハロースをトレハロースとグルコースとに分解することにより、生成するトレハロース純度がより高まることも判明した。

【０１２２】

【実験１９　メイラード反応】

実験１７の方法で得られた高純度トレハロース標品（純度９９．５％）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、グルコース、マルトースを用いて、同様に処理し、４８０ｎｍにおける吸光度を測定した。結果を表１５に示す。

【０１２３】

【表１５】

糖質標品	着色度（４８０ｎｍ）
トレハロース（本発明）	０．００６
グルコース　（対照）	１．６７１
マルトース　（対照）	０．９２６

【０１２４】

表１５の結果から明らかなように、トレハロース標品は、メイラード反応による着色度は僅かであり、グルコースやマルトースの着色度の僅か０．４乃至０．６％程度であり、本発明のトレハロース標品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。従って、本糖質は、アミノ酸と混合しても、アミノ酸を損なうことが少ない糖質である。

【０１２５】

【実験２０　生体内での利用試験】

厚治等が、『臨床栄養』、第４１巻、第２号、第２００乃至２０８頁（１９７２年）で報告している方法に準じて、実験１７の方法で得られた高純度トレハロース標品（純度９９．５％）３０ｇを２０ｗ／ｖ％水溶液とし、これをボランティア６名（健康な２６才、２７才、２８才、２９才、３０才、３１才の男性）にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値及びインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値ともに、投与後、約０．５乃至１時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸収、代謝、利用されて、エネルギー源になることが判明した。

【０１２６】

【実験２１　急性毒性試験】

マウスを使用して、実験１７の方法で得られた高純度トレハロース標品（純度９９．５％）を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、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、そのＬＤ５０値は、５０ｇ／ｋｇ以上であった。

【０１２７】

【実験２２　アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６からのトレハロース遊離酵素の生産】
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１４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１．３単位／ｍｌで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約１．８単位／ｍｌであった。実験１４と同様にして菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約０．５単位／ｍｌ、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約０．５単位／ｍｌ認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約０．８単位／ｍｌ、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約１．３単位／ｍｌ認められた。

【０１２８】
【実験２３　酵素の精製】
実験２２の方法で得られた培養液約１８ｌを用いて、実験１５と同様の方法で精製した。精製の各工程結果は非還元性糖質生成酵素の場合は表１６に、トレハロース遊離酵素の場合は表１７にまとめた。

【０１２９】
【表１６】

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）	収率（％）
培養液	２３，７００		１００
破砕後の上清	２２，４００	０．１５	９５
硫安塩析後の透析液	２０，２００	０．５１	８５
イオン交換カラム溶出液	１５，１００	６．５	６４
疎水カラム溶出液	８，４５０	１１５	３６
ゲル濾過溶出液	６，１２０	２１７	２６

【０１３０】
【表１７】

工程	トレハロース遊離酵素の活性量（単位）	比活性（単位／ｍｇ蛋白）	収率（％）
培養液	３２，５００		１００
破砕後の上清	３０，１００	０．１９	９３
硫安塩析後の透析液	２５，４００	０．７２	７８
イオン交換カラム溶出液	２２，７００	２２．３	７０
疎水カラム溶出液	１５，２００	２１５	４７
ゲル濾過溶出液	１１，６００	４９７	３６

【０１３１】
表１６及び表１７の工程で、それぞれゲル濾過溶出液として得られた精製非還元性糖質生成酵素及び精製トレハロース遊離酵素を、実験１５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、得られた両精製酵素は電気泳動的に単一な純度の高い標品であった。
【０１３２】
【実験２４　酵素の性質】
実験２３の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素を、実験１６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５７，０００乃至６７，０００ダルトンであった。また、本酵素の等電点を実験３の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、等電点は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、及び本酵素の温度安定性、ｐＨ安定性について、実験１６の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図１４に、ｐＨの影響を図１５に、温度安定性を図１６に、ｐＨ安定性を図１７に示した。
【０１３３】
図から明らかなように酵素の至適温度は４５℃付近、至適ｐＨは約６．０乃至７．５である。温度安定性は４５℃付近までであり、ｐＨ安定性は約５．０乃至１０．０である。
【０１３４】
【実験２５　α－グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製】
実験２３の方法で得られた精製酵素を用いて、実験１７の方法に従って、グルコース重合度が３以上のα－グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、α－グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。
【０１３５】
【実験２６　公知微生物からのトレハロース遊離酵素の生産とその性質】
公知微生物のうち、本発明のトレハロース遊離酵素産生能の確認されたブレビバクテリウム・ヘロボルムＡＴＣＣ１１８２２及びミクロコッカス・ロゼウスＡＴＣＣ１８６を、実験１４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１５の場合と同様に、培養液を破砕装置で処理し、その遠心上清を回収し、続いて、硫安塩析、透析、イオン交換カラムクロマトグラフィーし、得られた部分精製酵素標品の性質を調べた。これらの結果を、前述のリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１及びアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６の場合とともに表１８にまとめた。

【０１３６】
【表１８】

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
ブレビバクテリウム・ヘロボルム ＡＴＣＣ１１８２２	６，０７０	４０℃付近	約６．５乃至６．８	４０℃付近まで	約５．５乃至９．５
ミクロコッカス・ロゼウス ＡＴＣＣ１８６	３，０１０	３５℃付近	約６．８	３０℃付近まで	約６．５乃至７．２
リゾビウム・スピーシーズ Ｍ－１１	２５，４００	４５℃付近	約６．０乃至７．５	４０℃付近まで	約５．０乃至１０．０
アルスロバクター・スピーシーズ Ｑ３６	２２，７００	４５℃付近	約６．０乃至７．５	４５℃付近まで	約５．０乃至１０．０

【０１３７】

また、これらの公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験２５の方法に従って、グルコース重合度が３以上のα－グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、α－グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。

【０１３８】

【実験２７　トレハロース高含有糖質を製造するための澱粉の液化程度と使用酵素の影響】

澱粉からトレハロース高含有糖質を製造するために、澱粉の液化程度と使用する酵素の組合わせの影響を調べた。濃度２０％のとうもろこし澱粉乳に炭酸カルシウムを０．１％加えてｐＨ６．５に調整した後、これにα－アミラーゼ、ノボ社販売『ターマミール』を澱粉当たり０．１乃至２．０％を加え、９５℃で１５分間反応させ、１２０℃にオートクレーブして１０分間保って、ＤＥ２．５乃至２０．５の液化溶液とし、これを急冷したものに実験２の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり５単位及び実験１５の方法で調製した精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり１０単位加え、更に澱粉枝切酵素イソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所販売）を澱粉グラム当たり５００単位及び／又は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（株式会社林原生物化学研究所販売）を澱粉グラム当たり５単位加えてｐＨ６．０、４５℃で２４時間反応させた。本反応液を９５℃、１０分間加熱した後、冷却し、次いで、グルコアミラーゼを澱粉グラム当たり１０単位加えてｐＨ５．０で１０時間反応させた。本反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析し、糖質中のトレハロース含量（％）を求めた。対照として、澱粉液化溶液に非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを同様に作用させ、同様に、グルコアミラーゼを作用させて、高速液体クロマトグラフィーで分析した。結果は、表１９に示す。

【０１３９】

【表１９】

αーアミラーゼ使用量澱粉当たり（％）	ＤＥ	酵素の組合わせ			
		Ｎ＋Ｔ	Ｎ＋Ｔ＋Ｄ	Ｎ＋Ｔ＋Ｃ	Ｎ＋Ｔ＋Ｄ＋Ｃ
０．１	２．５	２１．３	７９．６	７６．２	８４．３
０．４	４．８	２２．５	６９．７	６７．７	７６．９
０．６	７．８	２３．３	６３．２	５９．１	６８．２
１．０	１２．５	２３．７	５６．０	５１．３	６２．５
１．２	１４．８	２５．３	５０．３	４４．７	５８．４
１．５	１７．３	２２．４	４４．２	３９．２	４８．３
２．０	２０．５	１８．６	３８．４	３４．９	４６．１

（注）表中、Ｎは非還元性糖質生成酵素を意味し、Ｔはトレハロース遊離酵素を意味し、Ｄは澱粉枝切酵素を意味し、Ｃは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意味する。

【０１４０】
表１９の結果から明かなように、澱粉からトレハロース高含有糖質を製造するには、その液化の程度は比較的低いものが適しており、望ましくは、ＤＥ１５未満、更に望ましくはＤＥ１０未満が好適であることが判明した。また、それに使用する酵素は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを作用させるよりも、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又は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とともに作用させた方が、澱粉からのトレハロース収量を約２乃至４倍にも向上することとなり、澱粉からトレハロースを工業的に大量生産する上で、極めて有利であることが判明した。

【０１４１】
以下、本発明の非還元性糖質、それを含む低還元性糖質及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及び／又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。

【０１４２】
【実施例Ａ－１】
馬鈴薯澱粉を濃度約２０％の澱粉乳とし、これに蓚酸を０．３％加えてオートクレーブし、冷却し、炭酸カルシウムでｐＨ６．５に中和して、ＤＥ約１２の液化溶液を得た。本液化溶液に実験２の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり２単位及びイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）澱粉グラム当たり３００単位加え、温度４５℃で２４時間反応させた、本反応液を９５℃に加熱して酵素を失活させた後、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、更に濃縮して濃度約７０％のシラップを固形物当たり約９０％の収率で得た。本品は、α－グリコシルトレハロースを含むＤＥ約８の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、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。

【０１４３】

【実施例Ａ－２】

タピオカ澱粉を濃度約２５％澱粉乳とし、これにα－アミラーゼ、ナガセ生化学工業株式会社製『ネオスピターゼ』を澱粉グラム当たり０．２％加え、８５乃至９０℃で約２０分間反応させ、次いで１２０℃にオートクレーブし、急冷してＤＥ約４の液化溶液を得、これに実験９の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり５単位、プルラナーゼ（株式会社林原生物化学研究所販売）を澱粉グラム当たり１００単位及びマルトテトラオース生成アミーラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり５単位加え、ｐＨ６．５、温度４０℃で３６時間反応させた。本反応液を、実施例Ａ－１と同様に、加熱して酵素を失活させた後、精製し、濃度約６０％に濃縮した。本濃縮液を原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『ＸＴ－１０１６』を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径５．４ｃｍのジャケット付きステンレス製カラム４本に充填し、直列につなぎ樹脂層長全長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ＳＶ０．２で流して分画し、非還元性糖質高含有のグルコース重合度４乃至６の画分を採取した。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たり約６３％の収率で得た。本品は、α－グリコシルトレハロースを含むＤＥ５．４の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、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。

【０１４４】

【実施例Ａ－３】

とうもろこし澱粉を濃度約３０％の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム０．１％加え、ｐＨ６．５に調整し、α－アミラーゼ、ノボ社製『ターマミール６０Ｌ』を澱粉グラム当たり０．３％加え、９５℃で１５分間反応させ、次いで１２０℃にオートクレーブし、急冷してＤＥ約４の液化溶液を得、これに実験２の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり４単位、イソアミラーゼを澱粉グラム当たり３００単位及び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（株式会社林原生物化学研究所販売）を澱粉グラム当たり５単位加え、ｐＨ６．３、温度４５℃で４８時間反応させた。本反応液を９５℃で１０分間保った後、冷却し、これにβ－アミラーゼを澱粉グラム当たり１０単位加えてｐＨ５．５、温度５５℃で１６時間反応させた。本反応液を、加熱して酵素を失活させた後、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約７０％のシラップを固形物当たり約９０％の収率で得た。本品は、α－グリコシルトレハロース及びα－グリコシル　α－グリコシドなどの非還元性糖質を含む低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、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。

【０１４５】

【実施例Ａ－４】

実施例Ａ－３の方法で得たシラップを濃度約５５％にして原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、実施例Ａ－２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って、非還元性糖質高含有のグルコース重合度３乃至６の画分を採取し、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たり３８％の収率で得た。本品は、本品は、α－グリコシルトレハロース及びα－グリコシル　α－グリコシドなどの非還元性糖質を多量含むＤＥ８の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、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。

【０１４６】

【実施例Ａ－５】

とうもろこし澱粉を濃度約３０％の澱粉乳とし、これに実施例Ａ－３の方法に準じて、α－アミラーゼを作用させてＤＥ４の液化溶液を得、次いで、実験２の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり５単位、実験１５記載の精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり１０単位及びイソアミラーゼを澱粉グラム当たり５００単位加え、ｐＨ６．０、温度４０℃で４８時間反応させた。本反応液には、糖組成でトレハロースを７６．３％含有していた。本反応液を加熱して酵素を失活させた後、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約８５％にして助晶機にとり、撹拌しつつ徐冷して助晶し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で２日間放置し、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てトレハロース含水結晶粉末を、原料の澱粉に対して固形物当たり９２％の収率で得た。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。

【０１４７】

【実施例Ａ－６】

タピオカ澱粉を濃度約３０％の澱粉乳とし、これに実施例Ａ－２の方法に準じて、α－アミラーゼを作用させてＤＥ５の液化溶液を得、次いで、実験１０の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり３単位、実験２３の方法で得た精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり５単位及びプルラナーゼを２００単位及び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澱粉グラム当たり３単位加え、ｐＨ６．０、温度４５℃で４８時間反応させた。本反応液には、固形物当たりトレハロースを８４．７％含有していた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり約５５％の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

【０１４８】

【実施例Ａ－７】

実施例Ａ－６の方法で得た加熱失活した反応液に、グルコアミラーゼを基質グラム当たり１０単位加え、ｐＨ５．０、温度５０℃で１０時間反応させた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃度約７０％に濃縮した後、助晶機にとり撹拌しつつ徐冷して助晶し、晶出率約４０％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、同時に乾燥塔の上部より８５℃の熱風を送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を補集した。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、原料の澱粉に対して、固形物当たり約８７％の収率で得た。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。

【０１４９】

【実施例Ａ－８】

リゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）の変異株を実験１の方法に準じて、ファーメンターで約７０時間培養した。培養後、ＳＦ膜を用いて除菌濾過し、約１００ｌの培養濾液を回収し、更に、その濾液をＵＦ膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素（約４１０単位／ｍｌ）とトレハロース遊離酵素（約４９０単位／ｍｌ）とを含む濃縮酵素液約５ｌを回収した。とうもろこし澱粉を濃度約３３％の澱粉乳とし、これに実施例Ａ－３の方法に準じて、α－アミラーゼを作用させてＤＥ約４の液化溶液を得、次いで、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当たり０．０２ｍｌ、イソアミラーゼを澱粉グラム当たり５００単位及び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澱粉グラム当たり５単位加え、ｐＨ

６．２、温度４０℃で４８時間反応させた。本反応液を加熱失活し、次いで、グルコアミラーゼを基質グラム当たり１０単位加え、ｐＨ５．０、温度５０℃で１０時間反応させた。本反応液には、固形物当たりトレハロースを８５．６％含有していた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり６４％の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

【０１５０】

【実施例Ａ－９】

実施例Ａ－８の方法で得た反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度５５％のシラップを得た。本糖液を原糖液とし、トレハロース含量を高めるため、カルシウム型強酸性カチオン交換樹脂、ダウケミカル社製『ダウエックス９９』（架橋度６％）を用いて、実施例Ａ－２と同様にカラムクロマトグラフィーにかけ、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有画分は、固形物当たりトレハロースを９７％含有していた。本高含有画分を、常法に従って、脱色、脱塩精製し、次いで蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約３．０％のシラップとした。次いで助晶機に移し、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、１２０℃で撹拌助晶し、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、原料のトレハロース高含有糖液に対して、固形物当たり約７５％の収率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、又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、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。

【０１５１】

【実施例Ｂ－１　甘味料】

実施例Ａ－７の方法で得たトレハロース含水結晶粉末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『αＧスイート』０．０１重量部及び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『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。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けに好適である。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けにも好適である。

【０１５２】

【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－１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重量部及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。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。

【０１５３】

【実施例Ｂ－３　チョコレート】

カカオペースト４０重量部、カカオバター１０重量部、蔗糖３０重量部、実施例Ａ－８の方法で得た高純度トレハロース含水結晶２０重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて５０℃で２昼夜練り上げる。この間に、レシチン０．５重量部を加え充分に混和分散させた。次いで、温度調節機で３１℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、１０℃の冷却トンネルを２０分間くぐ

らせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

【０１５４】

【実施例Ｂ－４　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重量部及び実施例Ａ－５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。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。

【０１５５】

【実施例Ｂ－５　加糖練乳】

原乳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３重量部及び蔗糖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。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。

【０１５６】

【実施例Ｂ－６　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重量部及び特開平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。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。

【０１５７】

【実施例Ｂ－７　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－６の方法で得た高純度トレハロース含水結晶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－６の方法で得たトレハロース高含有反応液の精製濃縮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。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。

【０１５８】

【実施例Ｂ－８　カスタードクリーム】

コーンスターチ１００重量部、実施例Ａ－１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重量部及び食塩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。本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【０１５９】

【実施例Ｂ－９　ういろうの素】

米粉９０重量部に、コーンスターチ２０重量部、蔗糖４０重量部、実施例Ａ－５の方法で得たトレハロース含水結晶粉末８０重量部及びプルラン４重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて６０分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当りも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【０１６０】

【実施例Ｂ－１０　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重量部及び水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。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。

【０１６１】

【実施例Ｂ－１１　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－４の方法で得た非還元性糖質含有粉末１重量部及び無機フード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。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。

【０１６２】

【実施例Ｂ－１２　ハム】

豚もも肉１，０００重量部に食塩１５重量部及び硝酸カリウム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－４の方法で得た非還元性糖質含有粉末４０重量部及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。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【０１６３】

【実施例Ｂ－１３　粉末ペプチド】

濃度４０％食品用大豆ペプチド溶液、不二製油株式会社製『ハイニュートＳ』１重量部に、実施例Ａ－６の方法で得た高純度トレハロース含水結晶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。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。

【０１６４】

【実施例Ｂ－１４　粉末味噌】

赤味噌１重量部に実施例Ａ－９の方法で得た無水結晶トレハロース粉末３重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して１個当り約４ｇの固形味噌を得、これを粉砕機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

【０１６５】

【実施例Ｂ－１５　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－９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。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。

【０１６６】

【実施例Ｂ－１６　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重量部及び防腐剤の適量を、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重量部及び精製水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。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。

【０１６７】

【実施例Ｂ－１７　ヘアリンス】

実施例Ａ－６の方法で製造したトレハロース１重量部、α－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸（株式会社林原生物化学研究所製造）２重量部、酵素処理ルチン、東洋精糖株式会社製『αＧルチン』２重量部、塩化ジステアリルメチルアンモニウム２重量部、セタノール２重量部、シリコンオイル２重量部及びポリオキシエチレンオレイルアルコールエーテル１重量部及び適量の香料を加熱溶解し、これに１，３－ブチレングリコール３重量部、精製水８９重量部及び適量の防腐剤からなる混合物を撹拌しながら加え、冷却した後、放置してヘアリンスを得た。本品は、α－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸と酵素処理ルチンとを配合したヘアリンスであり、ヒト及び動物の発育毛促進やフケ、カユミ、抜毛の治療、予防に有利に使用することができる。

【０１６８】

【実施例Ｂ－１８　乳液】

次の処方にしたがい、常法により乳液を製造した。

POE(20)POP(2)セチルアルコールエーテル	１重量部
シリコーンＫＦ９６(20CS)（信越化学）	２重量部
流動パラフィン	３重量部
プロピレングリコール	５重量部
グリセリン	１重量部
実施例Ａ－７で得られたトレハロース	１重量部
エチルアルコール	１５重量部
カルボキシビニルポリマー	０．３重量部
ヒドロキシプロピルセルロース	０．１重量部
２－アミノメチルプロパノール	０．１重量部
POEヒマシ油	０．１重量部
α－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸	１重量部
赤色１０６号	０．０００１重量部
防腐剤	適量
香料	０．１重量部
蒸留水	７０重量部

本品はα－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸を含む乳液であり、美白効果、安定性、香料の保留効果に優れていた。

【０１６９】

【実施例Ｂ－１９　化粧水】

次の処方にしたがい、常法により化粧水を製造した。

ソルビトール	２重量部
実施例Ａ－８で得られたトレハロース	０．５重量部
プラセンタリキッド	０．５重量部
α－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸	０．５重量部
ジメチルステアリルアミンオキシド	０．０５重量部
ラウリル硫酸ナトリウム	０．０１重量部
エチルアルコール	２０重量部
防腐剤	適量
香料	適量
蒸留水	７５重量部

本品はα－グルコシル－Ｌ－アスコルビン酸を含む化粧水であり、美白効果、安定性、安全性に優れていた。

【０１７０】

【実施例Ｂ－２０　粉末薬用人参エキス】

薬用人参エキス０．５重量部に実施例Ａ－９の方法で得た無水結晶トレハロース粉末１．５重量部を混捏した後、バットに移し、２日間放置してトレハロース含水結晶に変換させ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、分級して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量のビタミンＢ１及びビタミンＢ２粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【０１７１】

【実施例Ｂ－２１　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）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－６の方法で得た高純度トレハロース含水結晶を５％含有する生理食塩水を用いて溶出した。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『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。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。

【０１７２】

【実施例Ｂ－２２　糖衣錠】

重量１５０ｍｇの素錠を芯剤とし、これに実施例Ａ－８の方法で得た高純度トレハロース含水結晶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重量部及び酸化チタン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重量部及び水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。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。

【０１７３】

【実施例Ｂ－２３　練歯磨】
配合

第２リン酸カルシウム	４５．０重量部
プルラン	２．９５重量部
ラウリル硫酸ナトリウム	１．５重量部
グリセリン	２０．０重量部
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	０．５重量部
防腐剤	０．０５重量部
実施例Ａ－５の方法で得たトレハロース含水結晶粉末	１２．０重量部
マルチトール	５．０重量部
水	１３．０重量部

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。
【０１７４】
【実施例Ｂ－２４　流動食用固体製剤】
実施例Ａ－７の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末５００重量部、粉末卵黄２７０重量部、脱脂粉乳２０９重量部、塩化ナトリウム４．４重量部、塩化カリウム１．８重量部、硫酸マグネシウム４重量部、チアミン０．０１重量部、アスコルビン酸ナトリウム０．１重量部、ビタミンＥアセテート０．６重量部及びニコチン酸アミド０．０４重量部からなる配合物を調製し、この配合物２５グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、１袋分を約１５０乃至３００ｍｌの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。
【０１７５】
【実施例Ｂ－２５　輸液剤】
実施例Ａ－８の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約１０ｗ／ｖ％に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してパイロジェンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度１０ｗ／ｖ％で血液と等張で、グルコースの場合の２倍濃度でエネルギー補給できる。
【０１７６】
【実施例Ｂ－２６　輸液剤】
実施例Ａ－８の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ酸配合物とがそれぞれ５ｗ／ｖ％、３０ｗ／ｖ％になるように水に混合溶解し、次いで実施例Ｂ－２５と同様に精製してパイロジェンフリーとし、更に、プラスチック製バックに充填し施栓して製品を得た。
アミノ酸配合物の組成（ｍｇ／１００ｍｌ）

Ｌ－イソロイシン	１８０
Ｌ－ロイシン	４１０
Ｌ－リジン塩酸塩	６２０
Ｌ－メチオニン	２４０
Ｌ－フェニルアラニン	２９０
Ｌ－スレオニン	１８０
Ｌ－トリプトファン	６０
Ｌ－バリン	２００
Ｌ－アルギニン塩酸塩	２７０
Ｌ－ヒスチジン塩酸塩	１３０
グリシン	３４０

本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である

。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

【０１７７】

【実施例Ｂ－２７　外傷治療用膏薬】

実施例Ａ－５の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末２００重量部及びマルトース３００重量部に、ヨウ素３重量部を溶解したメタノール５０重量部を加え混合し、更に１０ｗ／ｖ％プルラン水溶液２００重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

【０１７８】

【発明の効果】

上記から明らかなように、澱粉からα－グリコシルトレハロース及びα－グリコシル　α－グリコシドなどのトレハロース構造を有する非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を製造するに際し、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又は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とともに作用させることにより、澱粉からの非還元性糖質の収量を高め、比較的低分子、低粘度で取扱い容易な低還元性糖質となり、その工業的生産を容易にする。また、澱粉からトレハロースを製造するに際し、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又は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とともに作用させることにより、澱粉からのトレハロース収量を著しく高め、その工業的実施を容易にする。このようにして得られるα－グリコシルトレハロース、α－グリコシル　α－グリコシド及びトレハロースなどの非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質は、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。とりわけ、トレハロースは非経口的にも使用され、よく代謝利用される。従って、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質は、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に有利に利用できる。

【０１７９】

本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉から、従来望むべくして容易に得られなかった非還元性糖質、又は、これを含む糖質を工業的に大量かつ安価に提供できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響は、食品、化粧品、医薬品業界は言うに及ばず、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。

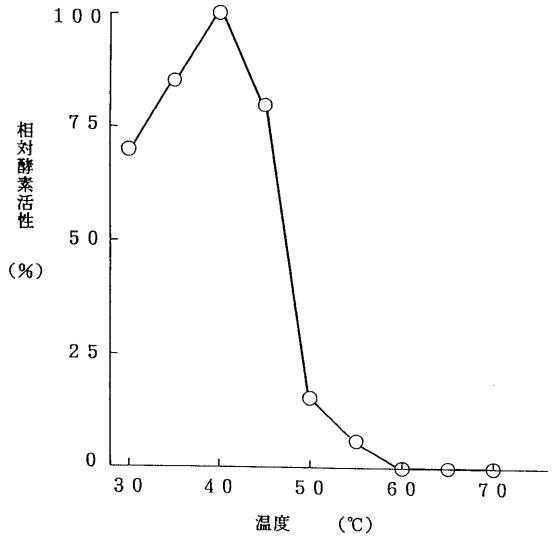
【図６】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。

【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。

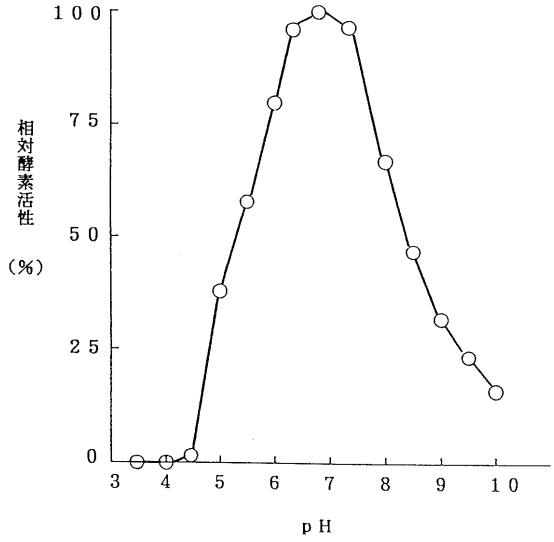
【図８】アルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来の非還元性糖質生成酵素のｐＨ安

定性を示す図である。
【図９】ＤＥＡＥ－トヨパールからの本発明のトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素の溶出パターンを示す図である。
【図１０】本発明のリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。
【図１１】本発明のリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。
【図１２】本発明のリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。
【図１３】本発明のリゾビウム・スピーシーズ　Ｍ－１１由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。
【図１４】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。
【図１５】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。
【図１６】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。
【図１７】本発明のアルスロバクター・スピーシーズ　Ｑ３６由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼすｐＨの影響を示す図である。

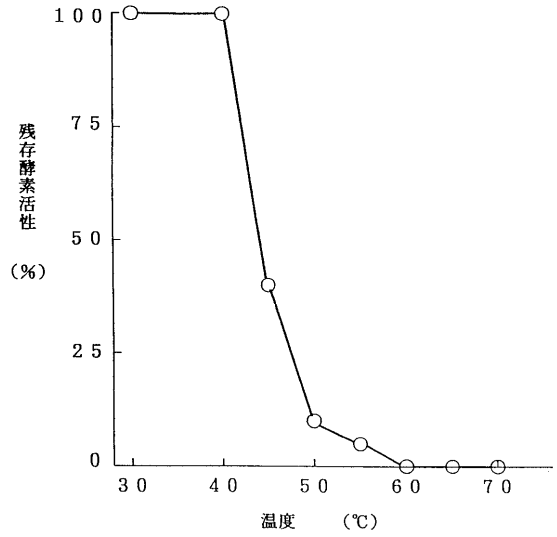
【図１】



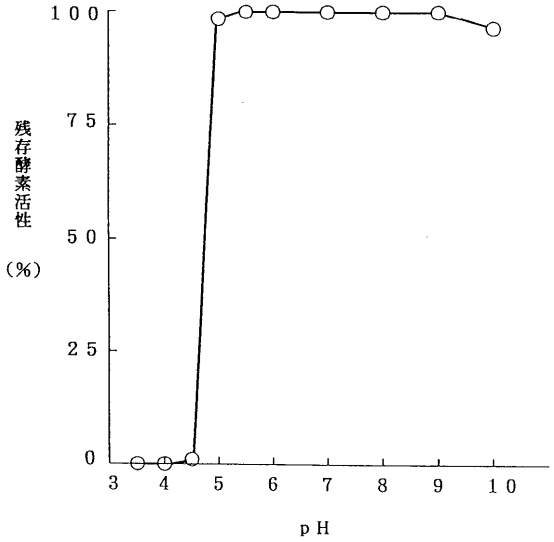
【図２】



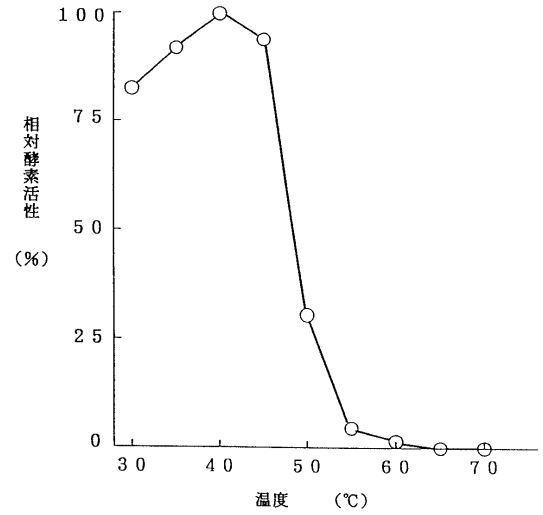
【図３】


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

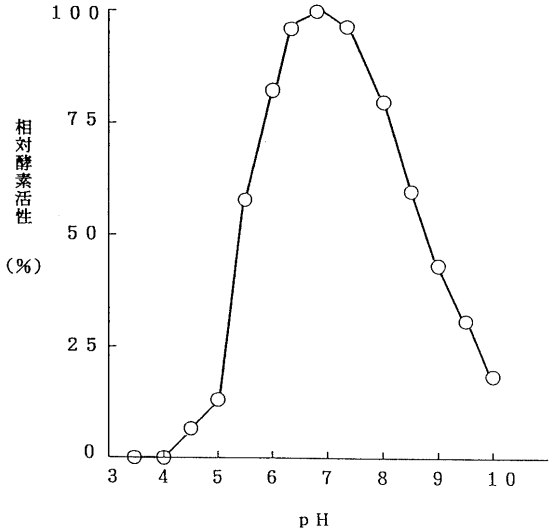
【図４】


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

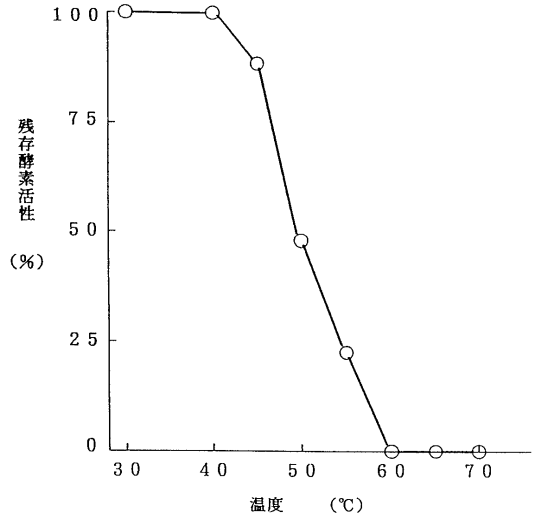
【図５】


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

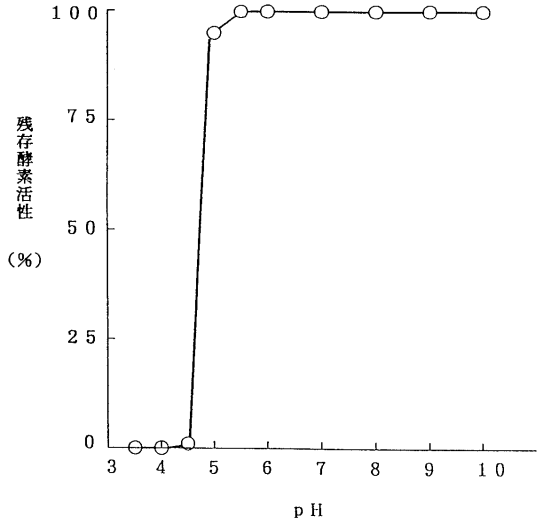
【図６】


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

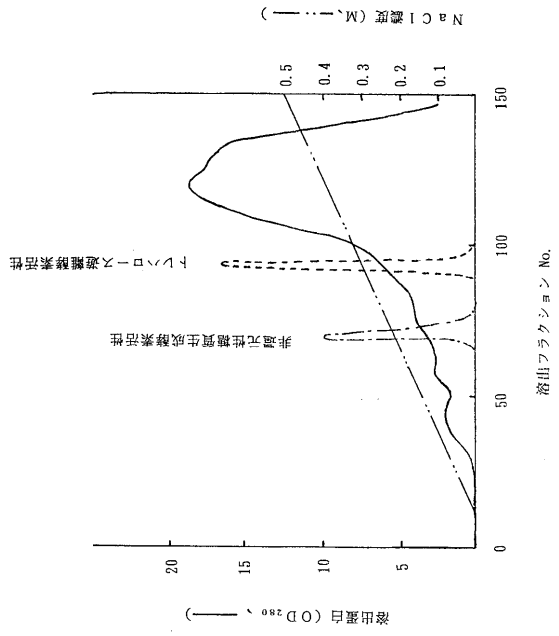
【図７】


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

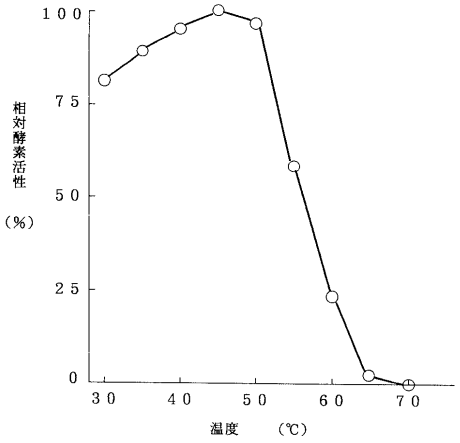
【図８】


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

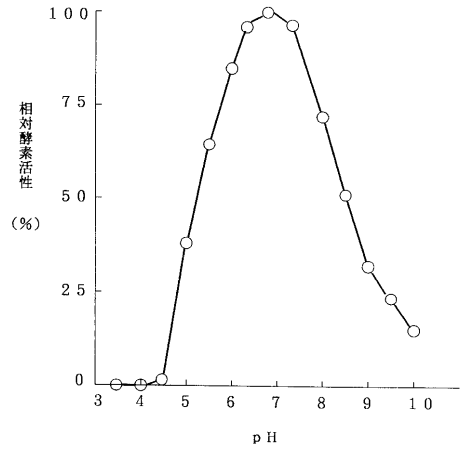
【図９】


NaCl濃度（M、——）
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
150
100
50
0
溶出フラクションNo.
トレハロース遊離酵素活性
非還元性糖質生成酵素活性
20
15
10
5
溶出蛋白（OD280、——）

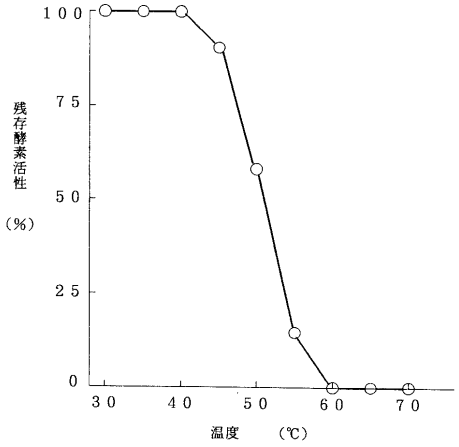
【図１０】


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

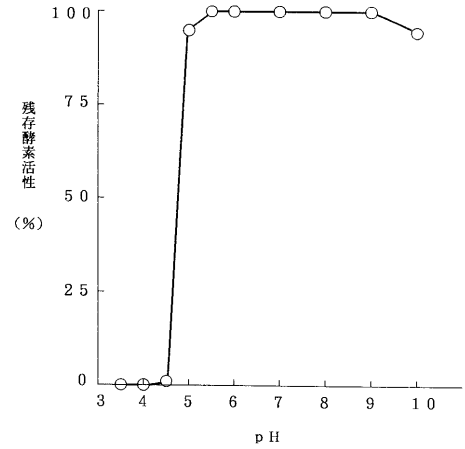
【図１１】



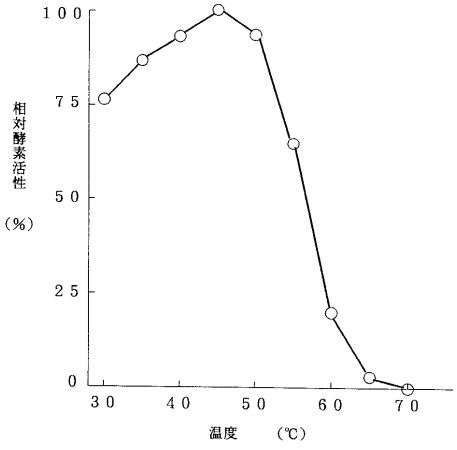
【図１２】



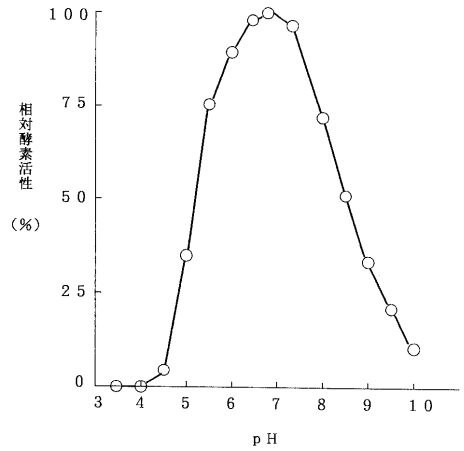
【図１３】



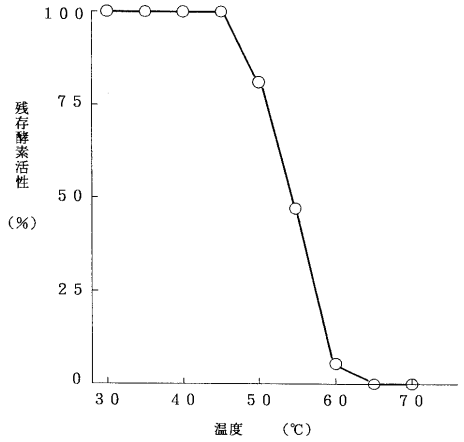
【図１４】



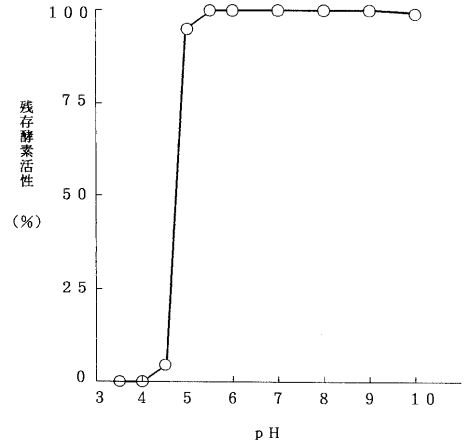
【図１５】


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

【図１６】


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

【図１７】


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 特開平０５－２９２９８６（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０４３５９４５８（ＵＳ，Ａ）
特開昭６３－２１６４９２（ＪＰ，Ａ）
Biotechnology Forum. Eur., １９９１年, Vol.8, No.4 , p. 201-203

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C08B 37/00
C12P 19/00-64
C12N 9/00-86
EUROPAT(QUESTEL)
JSTPlus(JOIS)
MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
REGISTRY(STN)
CA(STN)