

琉球大学学術リポジトリ

蔗糖を結合した水飴の製造(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 仲村, 実久, 角, 満雄, 田幸, 正邦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3962

蔗糖を結合した水飴の製造

仲村実久・角満雄・田幸正邦

Sanehisa NAKAMURA, Mitsuo SUMI and Masakuni TAKO
: Preparation of sucrose-bound syrup

Summary

Cyclodextrin glycosyltransferase was prepared from the culture fluid of *Bacillus macerans* and was purified partially by the fractionation by addition of ammonium sulphate, and the adsorption method on starch. In order to prepare sucrose-bound syrup, cyclodextrin glycosyltransferase was allowed to react with a mixed solution of soluble starch and sucrose. In the initial stage of the reaction, specific viscosity of a reaction mixture decreased remarkably and, then it increased at the starch concentration of 20% in both of 10 and 20% sucrose-mixed solution. Cyclodextrin production decreased with an increase in sucrose. The final product separated by paperchromatography was identified as maltooligosaccharides substituting sucrose at reducing end.

緒 言

Cyclodextrin glycosyltransferase (以下CGT-aseと略す)は、古くから*Bacillus macerans*の分泌する酵素として知られ澱粉単独に作用させると分子内転移作用によりcyclodextrinを生成する。Cyclodextrinとは、D-glucoseが6個以上環状に α -1,4結合したオリゴ糖で、分子内に筒状の空洞を有するため、種々の物質と包接複合体を形成することが出来る。¹⁾また、適当な受容体の存在下で澱粉に作用させると分子間転移作用により、受容体にグリコシル基を転移させる作用を併せもち、この反応はCoupling反応と呼ばれている。その他にCGT-aseは、マルトオリゴ糖間でもCoupling反応を起こし、重合度の異なる種々のマルトオリゴ糖を生成する。この反応は、homologizing, またはdisproportionation, と呼ばれている。

以上のようにCGT-aseは種々の反応を触媒する興味深い酵素であり、酵素化学的あるいはその利用を目的として現在盛んに研究され、cyclodextrinの製造およびcyclodextrinを利用した製品が多数実用化されている。さらに転移反応を利用し、合成困難のグルコ2糖や3糖類、または有用な配糖体の合成も行われている。その一方ではCGT-ase生産菌の検索も行われ、*B. macerans*²⁾の他に、*B. megaterium*³⁾、*B. circulans*、*B. species* (アルカリ性生育菌)⁴⁾、*B. stearothermophilus* および、

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 株式会社生科研

Klebsiella pneumoniae 等に存在することが報告されている。⁵⁾

本報では、供試菌株として *B. macerans* を用い、蔗糖を受容体として、蔗糖にオリゴ糖の結合した水飴状物質の製造を試みた。

実験材料および方法

1. 実験材料

供試菌株は、財団法人醱酵研究所(大阪)より入手した *Bacillus macerans* I F O 3490を用いた。基質として可溶性澱粉は片山化学工業(株)、特級、蔗糖は関東化学製、特級、を用いた。

2. 酵素活性測定法

酵素液 0.5 ml に 0.05 M Acetate buffer (pH 5.5) に溶解した 0.05% 可溶性澱粉液 2.5 ml を混合し、40°C、10分間反応させ、その 0.5 ml を取り 4.0 ml の 0.01 M I₂ (0.25 M KI を含む) 溶液に加え、全量の水で 20 ml に定容した後、日立 139 型分光光度計により、660 nm で吸光度を測定し、次式により透過率を求めた。

$$OD_0 - OD_{10} / OD_0 \times 100 \quad (1)$$

OD₀ : 反応ゼロ分の OD 値

OD₁₀ : 反応 10 分後の OD 値

なお、酵素活性の表示はこの条件下で 1 分間に 1.0% 透過率を増大させる酵素を 1 単位とした。

3. ペーパークロマトグラフィー (PPC)

PPC は東洋濾紙 No. 51 (20×20 cm) を使用し、65% プロパノールを展開溶媒として、上昇法により 3 重展開を行った。

環元糖はアニリンフタル酸、ケトースは尿素-リン酸試薬、cyclodextrin は 1.0% ヨウ素アルコール溶液により発色させ、呈色判定を行った。

4. 粘度の測定

各反応時間における反応液を、10 ml ホールピペットで吸い上げ、流下速度を測定した。粘度は反応ゼロ分の流下速度を 100 として、相対粘度で表わした。

5. タンパク質の定量

280 nm における吸光度を、日立 139 型分光光度計により測定した。

実験結果

1. 酵素液の調製

500 ml 容坂口フラスコに 1.0% コーンステープリカー、0.5% 硫酸アンモニウム、1.0% 炭酸カルシウムおよび 1.0% 可溶性澱粉を含む水道水 (pH 7.0) 70 ml を分注し、あらかじめ同液体培地に試験管で培養した *B. macerans* を 5.0 ml 接種し、30°C、70~72 時間振盪培養を行った。得られた培養液を 10,000 rpm、20 分間遠心分離を行い、菌体を除去した上清を粗酵素液とした。

次に粗酵素液に 0.25 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、1 夜放置し生じた不溶物をあらかじめ 0.25 飽和にしておいた Celite 545 で濾過した。

仲村ほか：蔗糖を結合したシロップ

ここで、この酵素が澱粉に吸着する性質を利用して、濾液 100 ml に対して 0.5~1.0g の湿熱処理澱粉を加え、4.0℃ で1夜攪拌して吸着処理を行った。

上清の酵素活性を調べ、酵素の吸着が完了したことを確認し、上清をデカント除去、33%冷エタノール 250 ml で3回洗浄、その後ガラスフィルター上で冷水約 200 ml で洗浄を行い、酵素吸着澱粉を得た。⁶⁾

さらに、酵素吸着澱粉に40℃の蒸留水50mlを加え40℃、30分間攪拌し、ガラスフィルターで濾過、溶出酵素液を得た。この操作を数回繰り返して、活性の高い部分を集め、以下の実験に使用した。⁶⁾

Table 1 に精製過程における酵素の比活性を示した。溶出酵素の比活性は 57.22 unit/OD 280 nm で粗酵素液に比較して60倍高い活性を示した。収率は 11.66% であった。

Table 1. Purification of cyclodextrin glycosyltransferase.

	Vol. ml	Activity unit/ml	Total activity	OD 280 nm	Total OD 280 nm	Specific activity	Yield (%)
Crude enzyme	800	7.78	6228	8.4	6720	0.926	100
0.25 saturated ammonium sulfate	846	5.59	4729	7.2	6091	0.776	75
*Eluted enzyme	80.5	9.01	725.6	0.16	12.72	57.22	11.66

* Enzyme adsorbed on granule of starch was eluted with hot water (40℃).

2. CGT-aseの蔗糖を含む澱粉液への作用

前述の方法で調製した溶出酵素 5 ml を、10%可溶性澱粉溶液（酢酸緩衝液、pH 5.5）50ml に蔗糖 0, 2.5, 5.0 および10%になるように調製した溶液に添加、40℃ 100rpm で振盪反応を行った。Fig. 1 は各時間ごとに反応液を分取し、澱粉の分解速度を測定した結果である。蔗糖濃度が高い区分ほど澱粉の分解速度が促進されていることがわかる。

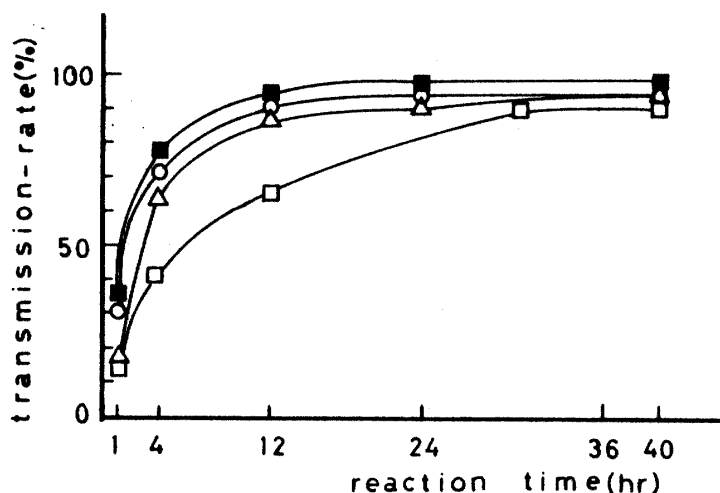


Fig. 1 The enzyme activity as a function of reaction time.

substrate: □, 10% soluble starch; △, 10% soluble starch + 2.5% sucrose;
○, 10% soluble starch + 5.0% sucrose; ■, 10% soluble starch + 10% sucrose.

Fig 2は、各反応時間ごとに反応液の流下速度を測定し、相対粘度で表わしたものである。なお、反応ゼロ時間の流下速度は23.3secであった。粘度は、反応初期に急速に低下し、その後ほぼ一定値を示した。

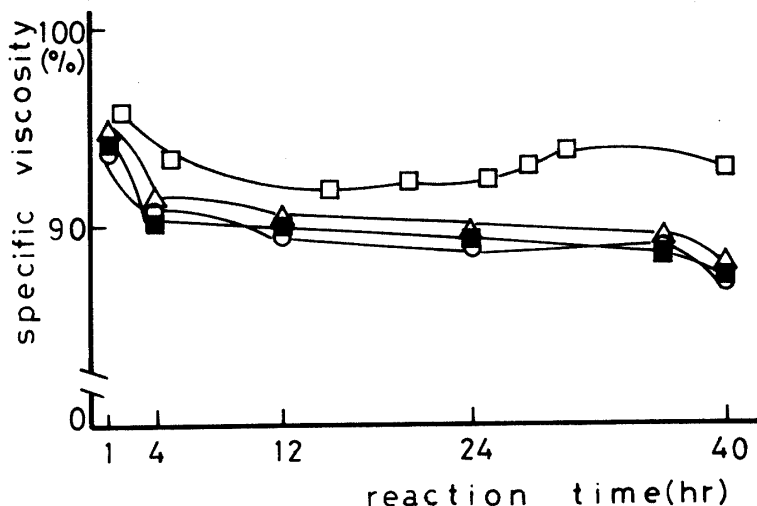


Fig. 2 Specific viscosity of sucrose-bound syrup as a function of reaction time. substrate: □, 10% soluble starch; △, 10% soluble starch+2.5% sucrose; ○, 10% soluble starch+5.0% sucrose; ■, 10% soluble starch+10% sucrose

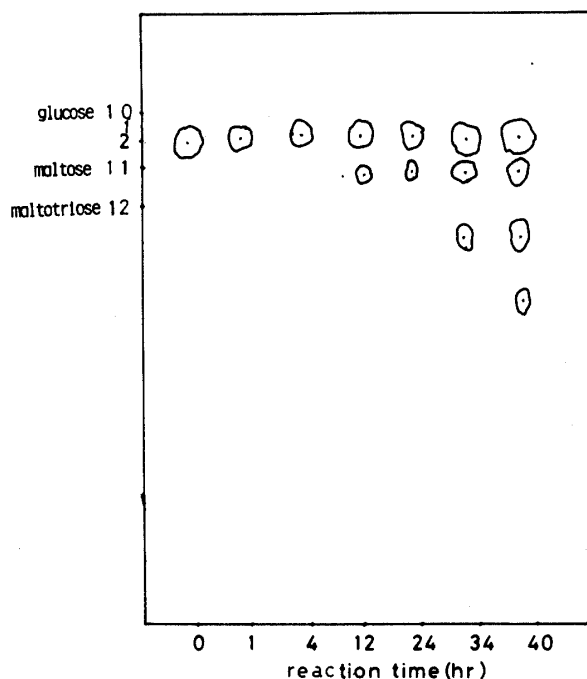


Fig. 3 Paperchromatogram of sucrose-bound syrup as a function of reaction time. substrate: 10% soluble starch+10% sucrose reagent: aniline hydrogen phthalate 1, fructose; 2, sucrose; 3, α -maltopyranosyl- β -D-fructofuranoside; 4, α -maltotripyranosyl- β -D-fructofuranoside; 5, α -maltotetrapyransyl- β -D-fructofuranoside.

Fig 3は前述の反応液のペーパークロマトグラムである。反応時間に比例してグルコース、マルトースおよびマルトトリオースとは異なるRf値のオリゴ糖が生成していることが認められた。なお発色剤はアニリンフタル酸を使用した。Fig. 4は発色剤尿素リン酸試薬で発色させたものである。前図同様反応時間の進行に伴って蔗糖よりRf値の低いオリゴ糖が生成されていることが認められた。Fig. 5は10%可溶性澱粉に対して蔗糖2.5, 5.0および10.0%を含む区分の反応終了液のペーパークロマトグラムで、発色剤は1%ヨウ素アルコール液を噴霧し、サイクロデキストリンの検出を行ったものである。いずれの区分にも紫色のスポットの α -CD (cyclohexa amylose)および黄色のスポットの β -CD(cyclohepta-amylose)が検出された。蔗糖濃度と逆比例してサイクロデキストリンが生成されることがわかる。

次に、可溶性澱粉の濃度を20%とし、それに蔗糖を10または20%となるように添加、溶出酵素液15ml (145 unit)を基質

仲村ほか：蔗糖を結合したシロップ

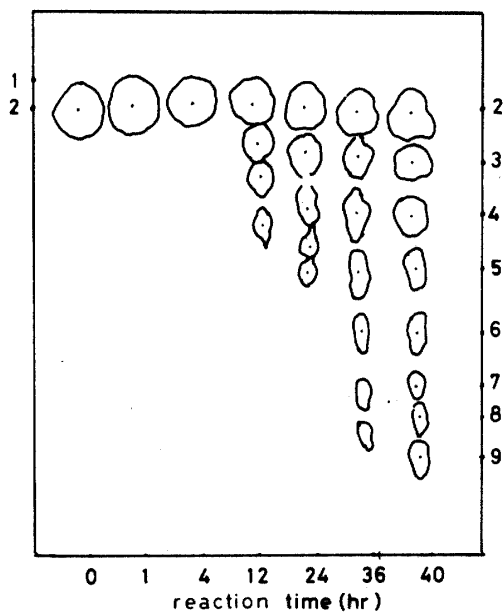


Fig. 4 Paperchromatogram of sucrose-bound syrup as a function of reaction time.
substrate: 10% soluble starch+10% sucrose
reagent: urea-phosphate
1, fructose; 2, sucrose; 3~9, sucrose derivatives.

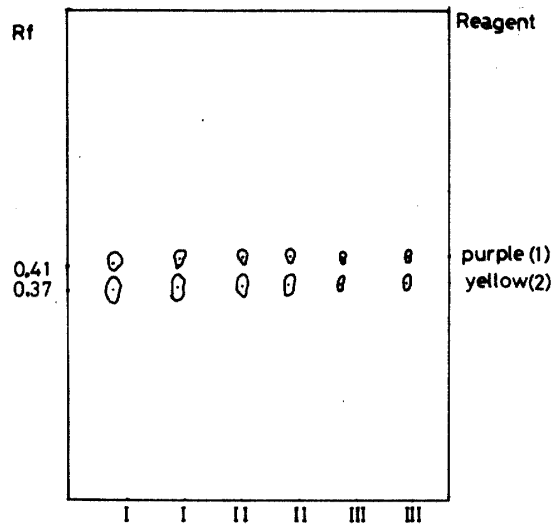


Fig. 5 Paperchromatogram of cyclodextrin.
substrate: soluble starch+sucrose;
I 10+2.5%, II 5+10%, III 10+10%.
(1), α -cyclodextrin;
(2), β -cyclodextrin.

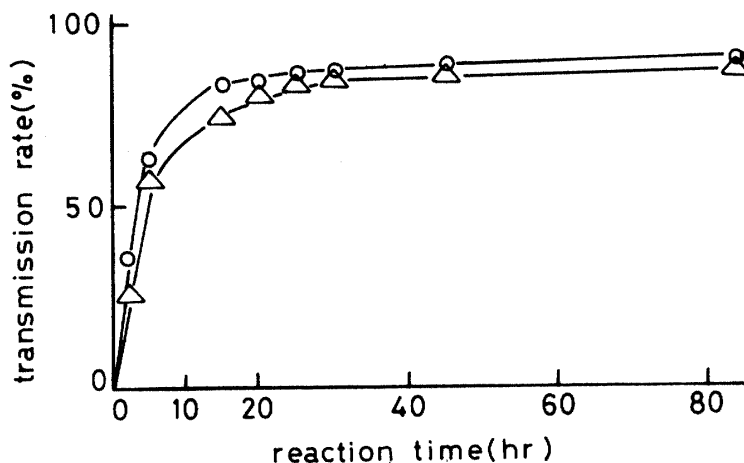


Fig. 6 The enzyme activity as a function of reaction time.
substrate: O, 20% soluble starch+20% sucrose;
Δ, 20% soluble starch+20% sucrose.

50mlに加え、40°C 100 rpmで反応させた。Fig. 6は反応時間と酵素活性との関係を示したものである。Fig. 1同様蔗糖添加量の多い反応液の方が、澱粉分解速度が促進されていることがわかる。Fig. 7は各反応時間における相対粘度を示したものである。ここでも反応初期に粘度が減少した。しかしながら、粘度はその後増大する傾向が見られた。流下速度はゼロ分で29.5 secで、水のそれは14.3 secであった。

Fig. 8に前述の反応液のペーパークロマトグラム(発色剤アニリンフタル酸)を示した。またFig. 9

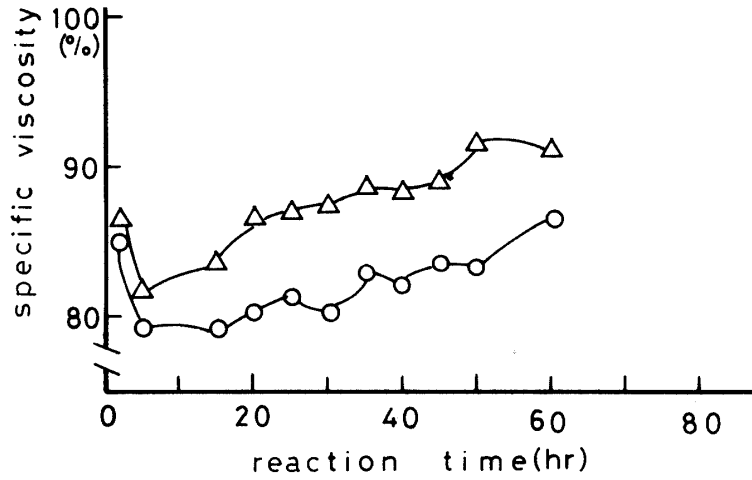


Fig.7. Specific viscosity of sucrose-bound syrup as a function of reaction time.

substrate: Δ , 20% soluble starch+10% sucrose;
 \circ , 20% soluble starch+20% sucrose.

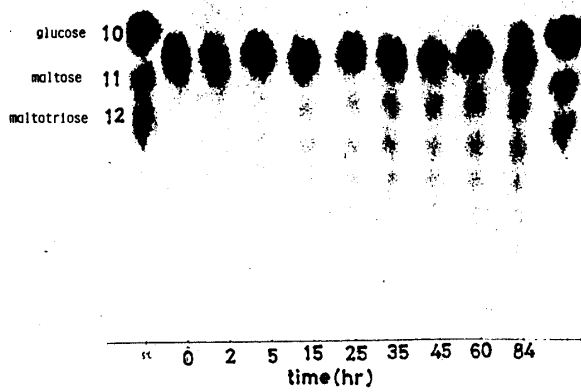


Fig.8. Paperchromatogram of sucrose-bound syrup as a function of reaction time.
 reagent: aniline hydrogen phthalate.
 substrate: 20% soluble starch+20% sucrose

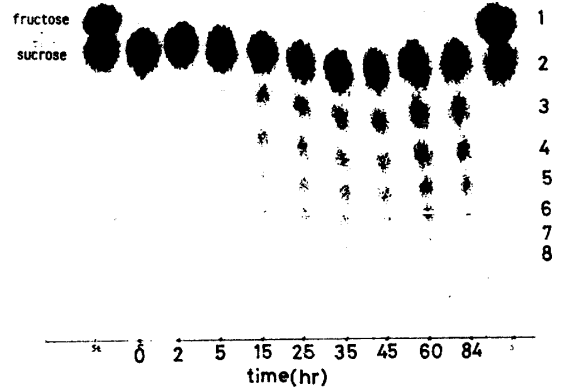


Fig.9 Paperchromatogram of sucrose-bound syrup as a function of reaction time.
 reagent: urea-phosphate
 substrate: 20% soluble starch+20% sucrose

には尿素-リン酸試薬で発色させたクロマトグラムを示した。いずれも、グルコース、マルトースおよびマルトトリオースとRf値の一致するスポットは検出されず、また蔗糖のRf値より高いスポットも検出されなかった。蔗糖よりRf値の低いスポットはケトースを含んでいることから、蔗糖を含むオリゴ糖であると考えられる。

考 察

CGT-ase は、澱粉単独に作用させると、cyclodextrin を生成し、グルコースや蔗糖等の適当な受容体が含まれると糖転移反応を行う。本報では *B. macerans* を用い、受容体として蔗糖を使用し、糖転移反応を調べた。CGT-ase は湿熱処理澱粉に吸着させることによりかなり純化(60倍)された。また、澱粉の分解反応は、蔗糖添加液の方が澱粉単独より速い結果を得た。このことは受容体の共存により、澱粉の分解が促進されることを示している。一方、反応液の相対粘度は、反応初期に急激に減少した。しかしながら、その後粘度は増大する傾向が見られ、これは反応が進むに伴ってオリゴ糖が合成されることによるものと思われる。

また、副成される cyclodextrin は、蔗糖添加量が増大するに従って減少する傾向が見られた。これは、一度形成された cyclodextrin も、受容体が多量存在すると、ドナーとなり分解されることによるものと思われる。

反応生成物を P P C により分析した結果、グルコース、マルトースおよびマルトトリオース等の澱粉由来の糖は検出されず、蔗糖より Rf 値の低いオリゴ糖区分に、ケトース反応に陽性のスポットが存在することから、蔗糖を含むオリゴ糖であることが確認された。文献⁶⁾の Rf 値より、これらのオリゴ糖は G₂F (maltopyranosyl-fructofuranoside), G₃F (maltotripyranosyl-fructofuranoside), G₄F (maltotetra pyranosyl-fructofuranoside) 等と推定した。⁶⁾

以上のように受容体として蔗糖を用い、CGT-ase の糖転移反応を調べたが、この転移反応は、グリコシダーゼ等によっても促進される。例えば一部の α -アミラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またデキストランスクラーゼ、ホスホリラーゼ等が糖転移反応を促進することが知られている。⁷⁾しかし、これらの酵素を用いて反応を行うと、複雑な転移生成物が出来、分離が困難となる。ところが、CGT-ase を用いると、転移作用が強力で、再分解が起こらず転移生成物が集積する。しかも、基質も澱粉と受容体のみで、目的の転移生成物が、多量に容易に得られる利点を有する。従って、工業的に蔗糖を受容体としてオリゴ糖が製造され、カップリングシュガーの名称で市販され、虫歯を防ぐ甘味剤として注目されている。⁸⁾また、温州みかんに含まれるヘスペリジンから得られるヘスペリチンジヒドロカルコンモノグルコシド(HDCG)は、砂糖の100倍の甘味を有するが、水に難溶なのでCGT-ase でグリコシル基を転移させ、溶解度を10~20倍高めるなどの研究も行われ、⁹⁾合成困難なグルコ2糖や3糖の合成、その他有用な配糖体の合成の研究も行われている。

今後CGT-ase の持つ多くの触媒作用を利用した、その新しい分野への応用が期待される。

要 約

B. macerans の分泌するCGT-ase を用い、蔗糖を受容体として、糖転移作用を調べた。

まず、澱粉培地で培養した遠心分離上清液を粗酵素とし、0.25飽和硫酸分画、澱粉吸着、溶出して精製し、60倍の比活性の酵素液を調製した。

次にこの酵素を用いて、澱粉、蔗糖混合液に作用させた。蔗糖添加量を増大するに従って、澱粉の分解速度が増大した。相対粘度は、澱粉10および20%とも反応初期に急激に減少し、20%反応液ではその後増大する傾向が見られた。

P P C によりグルコース、マルトースおよびマルトトリオースは検出されず、Rf 値の異なったオリゴ糖が検出され、これらはケトース反応に陽性であることから、蔗糖を含むオリゴ糖であることが認められた。また、文献値より、生成したオリゴ糖は G₂F (maltopyranosyl-fructofuranoside), G₃F (maltotripyranosyl-fructofuranoside), G₄F (maltotetra pyranosyl-fructofuranoside) 等であると推定した。

文 献

- 1) 久下喬, 竹尾健一 1974 サイクロデキストリン, 澱粉科学, 21:151~168
- 2) Kitahata, S. and Okaba, S. 1975 Transfer Action of Cyclodextrin Glycosyl-transferase on Starch, Agric. Biol. Chem., 39:2185~2191
- 3) _____ 1974 Action of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* Strain No.5 on starch _____
38:2413~2417
- 4) Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1976 Purification and Properties of Neutral-cyclodextrin Glycosyl-transferase of an Alkalophilic *Bacillus* sp., 40:1785~1791
- 5) 小林昭一, 貝沼圭二 1981 シクロデキストリンについて, 澱粉科学, 28:132~141
- 6) 岡田茂孝, 北畑寿美雄 1975 蔗糖を結合した水飴の製造とその性質, 日本食品工業学会誌
22:420~424
- 7) 山本武彦, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 辻阪好夫, 岩井美枝子, 奥村晋 1978 加水分解酵素を利用する合成, 化学と生物 16:393~402
- 8) Szejtli, J. 1982 Cyclodextrins in Food, Cosmetics and Toiletries, Starke, 34
379~385
- 9) 北畑寿美雄 1978 *Bacillus* 属細菌の生産する Cyclodextrin Glycosyltransferase に
関する研究 大阪市立工業研究所報告, 56:78~87