

グルコースイソメラーゼによる異性化糖の開発

高 崎 義 幸*

元工業技術院微生物工業技術研究所

要旨

この技術は、1960 年代、日本の地理的条件から大量に輸入していた砂糖の輸入を抑え、当時、日本に豊富にあったサツマイモ澱粉を活用して、日本で必要とする甘味料を確保し、ひいては、外貨の流出を抑えることを目的に研究を始め、開発されたものである。1965 年、世界に先駆け日本で、酵素(グルコースイソメラーゼ)法によるぶどう糖から果糖含有液糖(異性化糖)の製造法が工業化されてから 50 年が経過した、今や、この技術は世界的に普及し発展している。現在、この技術は、(1)澱粉からぶどう糖を製造する工程、(2)得られたぶどう糖の約 45～50%を果糖に変換(異性化)する工程と、(3)得られたぶどう糖と果糖の混合液糖から、クロマトグラフ法により、ぶどう糖と果糖を分離する工程、の 3 つの工程からなっている。これら各技術の開発の経緯と概要について解説し、また、その後の研究課題について概説した。

本文

1. はじめに

甘味料として使用されている砂糖(蔗糖ともいう)は、ぶどう糖(英語名、グルコース)と果糖(英語名、フルクトース)が結合したものである。

紀元前 8000 年頃、ニューギニアで発見されたと言われているサトウキビは、インドに伝わり、サトウキビの搾汁から製造された砂糖が、紀元 500～600 年、中国に渡り、奈良時代(710～794 年)後期に、日本に伝来した。しかし、当時の砂糖は高価で、庶民が容易に手にすることができるものではなく、砂糖を輸入するために莫大な金銀が海外に流出したと言われている。このため江戸時代になって、沖縄から取り寄せたサトウキビの苗を栽培して砂糖の生産が奨励された(1726 年)。また、明治以降、北海道でテンサイ(砂糖大根、ビート)を栽培して砂糖が生産されるようになったが、サトウキビは熱帯～亜熱帯地域で栽培される植物であり、テンサイは温帯から亜寒帯の寒冷地で栽培される植物であるため、温暖な気候の日本の風土に合わず、日本の需要を充たすことができなかった。この研究を始めた 1960 年代、砂糖の年間消費量 200～250 万トンのうち、約 8 割を輸入していて、当時、砂糖は高価であったこともあり、貴重とされていた外貨の流出が問題になっていた。

一方、砂糖よりもはるか昔から、蜂蜜が甘味料として使用されてきた。人類が最初に口にした甘味料は蜂蜜と言われている(紀元前 6000 年頃のスペインの洞窟遺跡から蜂蜜を採取する様子を描いた壁画が発見されている)。蜂蜜の成分^{注 1)}については現在も研究が続けられているが、蜂蜜はぶどう糖と果糖で約 75～80%を占め、水分が約 20%の濃厚な糖液である。表 1 に、蜂蜜の代表的な糖組成を示した。

砂糖を酸または酵素(インベルターゼ)で分解すると、ぶどう糖と果糖が等量含まれる糖液(転化糖と云われる)が得られる。転化糖は、砂糖に比べて甘味が少し大きいこと、保存性や、保湿性に

「* 現在 宮崎大学名誉教授」

優れた食品が得られるなどの理由から、異性化糖が開発される以前から製菓、製パンなどの分野で使用されていた。

当該開発技術により製造される異性化糖「果糖ぶどう糖液糖」は、ぶどう糖と果糖がほぼ等量含まれている糖液で、糖組成からは、転化糖や蜂蜜と同等の製品である。

表 1 代表的な蜂蜜の糖組成

成 分	含 有 量
水 分	18-20 %
糖 分	80-82 %
果 糖	37-41 %
ぶ 萄 糖	35-36 %
その他の糖(蔗糖、マルトース、オリゴ糖など)	6-7 %
その他の成分(ビタミン、ミネラル、有機酸など)	—

2. 当該科学技術の発展の推移

1950 年代、食糧確保のため、日本政府が採った農家に対する保護政策(表 2)により、甘藷(サツマイモ)澱粉が過剰に生産されるようになり、この澱粉利用法の一つとして、「酵素法によるぶどう糖の製造法」が開発された。しかし、ぶどう糖の甘味は砂糖の半分程度しかないため、甘味料としては限界があった。

表 2 甘藷澱粉に係る日本政府の動き (1956～1963) ¹⁾

(1) 昭和 31(1956)年 2 月	甘藷澱粉の無制限買い上げを発表(農林省)
(2) 昭和 32(1957)年 11 月	政府手持ち澱粉が急増したため、澱粉消費拡大のための調査会を設置(農林省)
(3) 昭和 33(1958)年 5 月	結晶ぶどう糖工業育成を答申(澱粉調査会)
(4) 昭和 33(1958)年 9 月	結晶ぶどう糖工業育成要領を決定(農林省)
(5) 昭和 34(1959)年 7 月	澱粉酵素糖化法の工業化
(6) 昭和 36(1961)年	(澱粉)酸糖化法から酵素糖化法に切り替え終了
(7) 昭和 38(1963)年	ぶどう糖の生産能力 40 万トン/年を突破

このため、ぶどう糖を、2～3 倍甘味が強い果糖に変える研究が行われるようになった。幾多の方法が考案、検討されたのち、1965 年 7 月、「酵素法によるぶどう糖から果糖の製造法」が、世界に先駆け日本で工業化された。この技術は海外にも輸出された(国有特許輸出第1号)。今や、この技術は世界的に普及し、この技術により製造される「異性化糖(HFCS)^{註 2)}」の生産量は、世界で、1730 万トン(2009 年度)に達している。日本では、現在、約 90 万トン(固形物換算)生産されていて、日本で消費する全甘味料の約 3 割を占めている。

本技術は、「澱粉をぶどう糖に分解する工程」、「得られたぶどう糖を果糖に変換する工程」と「得られたぶどう糖と果糖の混合液糖からそれぞれの糖を分離する工程」の 3 つの工程からなっている。本技術を説明するに先立ち、関係する糖質の化学構造等について説明したい。

2.1 糖質の構造と甘味

2.1.1 ぶどう糖、果糖と砂糖の構造

炭素、水素と酸素の 3 元素からなり、一般式 $C_n(H_2O)_m$ の組成からなる化合物〔炭素と、水素と酸素の割合が水 (H_2O) の組成からなる物質〕を炭水化物といい、糖質と総称されている。糖質は生体を構成する物質として、また、生体のエネルギー源として重要である。

糖質には、単糖、オリゴ糖(少糖)、多糖と呼ばれるものがある。自然界に多い炭素数 6 個からなる単糖に、ぶどう糖、果糖、ガラクトースとマンノースがあり、いずれも分子式、 $C_6H_{12}O_6$ で表わされる。炭素数 5 個からなる糖の代表的なものに、キシロース、リボース、アラビノースなどがあり、いずれも $C_5H_{10}O_5$ で表わされる。

ぶどう糖と果糖は同じ分子式 $C_6H_{12}O_6$ であるが、構造が少し違っている。図1に、ぶどう糖、果糖と砂糖(蔗糖)の構造を示している。ぶどう糖と果糖について、構造が理解しやすい、鎖状の「フィッシャー (Fischer) の構造式(投影式)」と環状の「ハース(Haworth)の構造式」の 2 つの構造式を示しているが、鎖状構造のものは殆ど存在しないと言われている。

分子式	Fisher の構造式	Haworth の構造式
ぶどう糖 $C_6H_{12}O_6$	$ \begin{array}{c} H-C=O \\ \\ H-C-OH \\ \\ HO-C-H \\ \\ H-C-OH \\ \\ H-C-OH \\ \\ H-C-OH \\ \\ H \end{array} $	
果糖 $C_6H_{12}O_6$	$ \begin{array}{c} H \\ \\ H-C-OH \\ \\ HO-C=O \\ \\ H-C-H \\ \\ H-C-OH \\ \\ H-C-OH \\ \\ H-C-OH \\ \\ H \end{array} $	
蔗糖 $C_{12}H_{22}O_{11}$	(グルコース) (フルクトース)	

図 1 ぶどう糖(グルコース)、果糖(フルクトース)と蔗糖(砂糖)の構造

単糖が 2 個結合した糖類は二糖類、3 個結した糖類は三糖類と総称される。甘味料として使用されている砂糖はぶどう糖と果糖が結合した二糖類であり、麦芽糖(マルトース)はぶどう糖が 2 個結合した二糖類である。あいまいなところがあるが、単糖が 2 個以上、10 個程度結合したものはオリゴ糖、そして更に多くの糖が結合したものは、デキストリン、次いで、多糖と呼ばれている。多糖の代

表的なものに、澱粉、セルロース、キシランなどがある。

ぶどう糖は、これが多数結合して存在しているトウモロコシやサツマイモなどの澱粉から製造される。澱粉は、ヒトの主食であるため、地球上のいたるところで、その地域特有の作物から得られるが、多くは、サツマイモ、ジャガイモなどのイモ類と、米、麦などの穀類や、トウモロコシである。日本では、戦後の食糧確保のため、サツマイモ(甘藷)の栽培が奨励され、サツマイモの消費拡大のため、大量のサツマイモ澱粉が製造されたが、現在の主要な澱粉原料は輸入トウモロコシである。

2.1.2 糖質の甘味

単糖、二糖などは甘味を示すが、分子の大きいオリゴ糖、デキストリンや多糖は甘味がない。また、甘味をもつ糖でも、炭素数、構造の違いにより、甘味の質や、甘味の強さは違っている。砂糖の甘味の強さを 100 としたときの、代表的な糖の甘味度を表 3 に示す。

表 3 いろいろな糖の甘味度

糖 の 種 類	分子式	甘 味 の 強 さ
砂糖(sucrose))	$C_{12}H_{22}O_{11}$	100
ぶどう糖(glucose)	$C_6H_{12}O_6$	60~75
果糖(fructose)	$C_6H_{12}O_6$	115~175
乳糖(lactose)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	15~30
麦芽糖(maltose)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	30~45
転化糖(invert sugar)		砂糖より甘い(温度の影響を受ける)
蜂蜜(honey)		砂糖より甘い(温度の影響を受ける)

一般に、糖の甘味は温度の影響を受ける。砂糖の甘味は、温度の影響を受けないため、甘味度を比較する際の基準にされている。その他の糖は大小の差はあるが、低温ほど甘く、温度が高くなるに従い、甘味は減少する。特に、果糖の甘味は温度の影響を大きく受けるが、果糖は、天然に存在する糖の中で最も甘味の強い糖である。約 5℃で砂糖の 1.5 倍~1.7 倍の甘味があり、約 40℃で砂糖と同程度の甘味となる。一方、ぶどう糖の甘味は同じ温度範囲で砂糖の約 6 割である。図 2 は、砂糖、ぶどう糖、果糖の甘味に対する温度の影響を示している。

2.2 澱粉からぶどう糖の製造

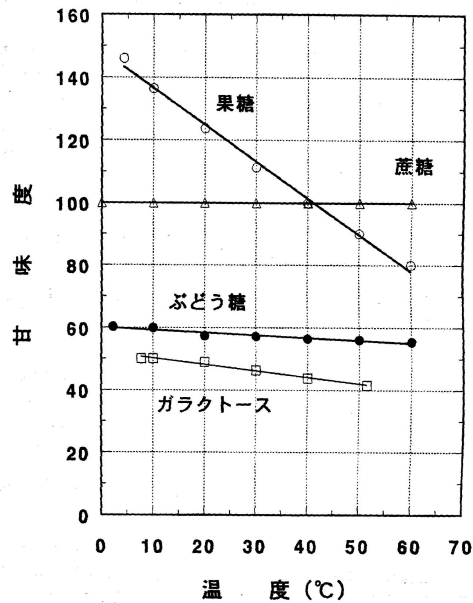
2.2.1 澱粉の構造

澱粉は、多数のぶどう糖が鎖状に連なった構造をしている。この連なり方に 2 種類あり、ぶどう糖が 1 種類の結合(α -1,4-グルコシド結合)のみで結合しているアミロース(amylose、ぶどう糖の重合度はトウモロコシ澱粉の場合で、約 300 個)とアミロース様物質が「 α -1,6-グルコシド結合」で枝のある樹状に結合しているアミロペクチン(amylopectin、ぶどう糖の重合度はトウモロコシ澱粉の場合で、約 280-50,000)からなっている。図 3 に、アミロースとアミロペクチンの構造の模式図を示した。また、表 4 に、各種の澱粉のアミロースとアミロペクチンの含有量を示した。

2.2.2 澱粉の分解(酵素法による澱粉の液化と液化澱粉の糖化)

澱粉は、古くから、硫酸、塩酸などの鉱酸、あるいは、シュウ酸を用いて分解され、水アメやぶどう糖などが製造されてきた(1910 年代)。しかし、この方法によるぶどう糖の製造は、ぶどう糖の収量

が低く、苦味物質(ぶどう糖が逆合成して生成する二糖類の一種、ゲンチオビオース)が副生する、などの問題があった。



資料:都築洋次郎著 糖類 岩波全書 1954

図 2 各種の糖の甘味に対する温度の影響

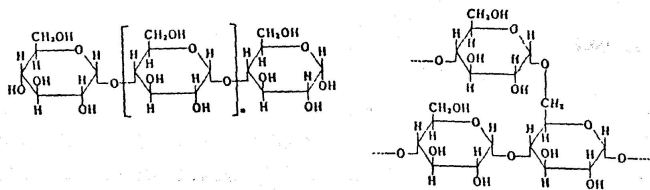
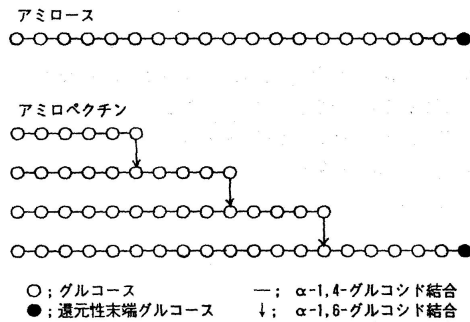


図 3 澱粉（アミロースとアミロペクチン）の構造

アミロース： ぶどう糖の連なり：トウモロコシの場合,約 300

アミロペクチン： ぶどう糖の連なり：トウモロコシの場合,約 280～50000

枝部分のぶどう糖の連なり： 20～27 (モチ種は短い)

枝間のぶどう糖の連なり： 6 ～8

表 4 澱粉中のアミロースとアミロペクチンの含量

澱粉の種類	アミロース (%)	アミロペクチン (%)
米	17	83
モチ米	0	100
トウモロコシ	21	79
モチトウモロコシ	1	99
バレイショ	22	78
小麦	24	76
タピオカ	17	83
バナナ	21	79

戦後、日本政府が食糧確保のため、サツマイモなどイモ類の生産を奨励したことにより、過剰に生産されたサツマイモ澱粉の有効利用を図るため、「結晶ぶどう糖育成策」を採った(1958 年、表 2)。その結果、1959 年、リゾプス・ニヴェウス(*Rhizopus niveus*)の生産する澱粉糖化酵素「グルコアミラーゼ」が開発され、また、エンドミコプシス(*Endomycopsis*) 属酵母の生産するグルコアミラーゼも開発された(1960 年)。その後、幾多の改良を経て、ぶどう糖の収量が多く、苦味物質の生成が少なく、かつ熱熱安定性にも優れたアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)の糖化酵素が開発された(Corn Product 社、A.E.Staley 社ほか、1955 年工業化)。これより前、日本では、*Aspergillus usami* の生産する澱粉糖化酵素 γ -アミラーゼ(後のグルコアミラーゼ)が、北原らにより報告されていた(1947年)が、1969 年頃から、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)の生産するグルコアミラーゼが日本で販売されるようになり、漸次、切り替えられた。

2.2.3 耐熱性 α -アミラーゼによるトウモロコシ澱粉の液化

グルコアミラーゼで澱粉を糖化するには、その前段階として、水に溶けない澱粉を大まかに分解して、水に溶ける状態にする必要がある。この操作を「澱粉の液化」という。澱粉の液化は、当初、酸を用いて行われていたが、副生物の抑制とぶどう糖の収量を高めるため、1940 年頃より、当時、糊抜き材として使用されていたバシルス属細菌(*Bacillus subtilis*)の α -アミラーゼが使用されるようになった。

澱粉液化において重要なことは、澱粉が完全に可溶化し、老化(糊化された澱粉が元の生澱粉に戻り、濁りを生ずる)することなく、高濃度で仕込めることである。サツマイモ澱粉やバレイショ澱粉は、 α -アミラーゼを混合し、約 90℃の温度で短時間処理する「高恒温液化法」(1953 年)だけで、完全に液化できるが、トウモロコシ澱粉には、難溶性の澱粉が含まれているため、この方法だけでは液化が難しいため、前述の「高恒温液化法」に続いて、残存している難溶性澱粉を、高温(120～135℃)で加熱して膨潤させ、これに α -アミラーゼを再添加して、可溶化する「二段液化法」⁵³⁾が考案された(1958)。

その後、1970 年代に入り、液化が難しかったトウモロコシ澱粉も液化できるバシルス・リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)や、バシルス・アミロリクエファシエンシス(*Bacillus amyloliquefaciens*)などの細菌の生産する耐熱性 α -アミラーゼが開発され(1973 年)、このための澱粉液化装置「ジェット・

クッカー (Jet cooker)」も開発された(1974 年)。この酵素と装置を用いて、トウモロコシ澱粉も1回の操作で液化できるようになった¹⁾。

現在、トウモロコシ澱粉の液化は、下記の操作により行われている。

「30～35%濃度のトウモロコシ澱粉乳(スターチ・スラリー starch slurry)に、耐熱性 α -アミラーゼとこの酵素の安定化剤として微量のカルシウム塩を添加し、pH6～6.5 に調整したものを、高压の水蒸気と共に ジェット・クッカーで噴射し、澱粉乳の温度を一気に 100～110℃に上げ、5 分間程度滞留させた後、反応槽の中で、95℃で、1.5 時間半～2 時間保持する。」

2.2.4 液化澱粉の酵素糖化とプルナーゼを併用する液化澱粉糖化法の開発

α -アミラーゼは澱粉の内部の結合(α -1,4-グルコシド結合)を分解する[エンド(endo)型分解という]。一方、グルコアミラーゼは澱粉の端(非還元性末端; 図 3 のアミロース、アミロペクチン模式図の左端)からぶどう糖を1つずつ切り離す[エキソ(exo)型分解]という。この酵素は、澱粉の α -1,4 グルコシド結合のほか、 α -1,6 グルコシド結合(枝の付け根部分)も分解する。1960 年以来、澱粉からぶどう糖の製造は、この 2 つの酵素(α -アミラーゼとグルコアミラーゼ)を用いて行われてきた。

グルコアミラーゼは、澱粉を構成する 2 種類の結合、 α -1,4-グルコシド結合と α -1,6-グルコシドのいずれも分解するので、澱粉は、ほぼ完全に、ぶどう糖に分解される。しかし、工業的規模の糖化反応は、高濃度の澱粉(30～35%)下で行われるため、グルコアミラーゼ自体が持つ逆合成作用や、グルコアミラーゼに微量存在している糖転移酵素(α -グルコシダーゼ)により、イソマルトース、マルトースやパノースなどのオリゴ糖が副生すること、また澱粉に、もともと存在している難分解性部位が未分解物として残るため、ぶどう糖の収量は、通常、93～95%で、ぶどう糖の収量を更に高めることがぶどう糖製造工業の課題であった。

1949年には、アミロペクチンの、比較的長い枝の根元の結合(α -1,6-グルコシド結合)を分解する酵素(枝切り酵素、イソアミラーゼ)が発見され、続いて、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属などの細菌の生産する、プルナーゼ[プルランの α -1,6-グルコシド結合を分解する酵素(α -1,6-グルコシダーゼとも云われる、図 4)]が発見された(1960～1970 年代)。

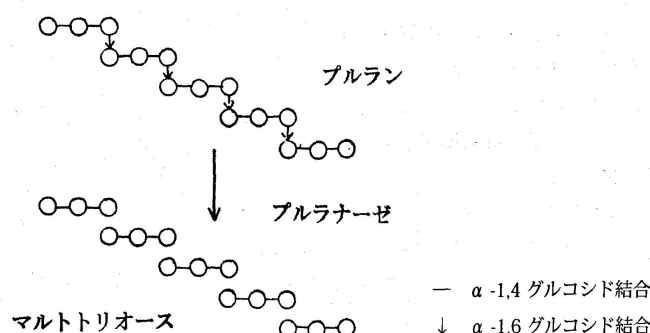


図 4 プルランの構造とプルナーゼの作用

これらの酵素を、グルコアミラーゼと併用して、澱粉からぶどう糖を製造する試みがなされた [Hurst、特公昭 54(1979)-29570] が、これまでの酵素は、グルコアミラーゼと併用するには、耐酸性

と耐熱性に劣っていた。ここで、プルラナーゼは、細菌が生産する粘質多糖プルラン〔マルトリオース(ぶどう糖が3分子が α -1,4-グルコシド結合で結合した三糖)が α -1,6-グルコシド結合で連なった多糖)の α -1,6-グルコシド結合を特異的に分解し、マルトリオースを生成する酵素である。図4に、プルランの構造とプルラナーゼによるプルラン分解の模式図を示した。

著者は、1970年代から1990年代にかけ、澱粉から、ぶどう糖が2～10個結合した各種のマルトオリゴ糖^{注5)}〔マルトース(G_2)、マルトリオース(G_3)、マルトテトラオース(G_4)、マルトペンタオース(G_5)、マルトヘキサオース(G_6)、デキストリン(G_{10})など〕を特異的に生成する細菌のアミラーゼについて研究してきた^{74-80, 注6)}。そして、これらマルトオリゴ糖を澱粉から収量よく生成するため、これら細菌により同時に生産されていた、澱粉の α -1,6-グルコシド結合を分解する枝切り酵素(α -1,6-グルコシダーゼ、プルラナーゼなど)の研究も行ってきた。この研究の過程で得られた耐酸性と熱安定性に優れたバシルス(*Bacillus*)属細菌のプルラナーゼをぶどう糖の製造に応用した結果、ぶどう糖の収量を1～3%増加できることを認めた(図5と図6)²⁻⁵⁾。

表5は、澱粉の液化法と糖化法の違いによるトウモロコシ澱粉からのぶどう糖の収量を示している。トウモロコシ澱粉を *Bacillus* 属細菌の耐熱性 α -アミラーゼで液化し、次いで、アスペルギルス(*Aspergillus*)属のグルコアミラーゼで糖化することにより、94～95%の収量でぶどう糖が得られ、更に、グルコアミラーゼによる糖化に際し、バシルス(*Bacillus*)属細菌のプルラナーゼを存在させることにより、96～97%の収量でぶどう糖が得られるようになった。

表5 澱粉の液化法と糖化法の違いによる澱粉からぶどう糖の収量²⁾
(澱粉酵素糖化におけるプルラナーゼの効果)

澱粉糖化法の種類	使用酵素	ぶどう糖収量 (%)
酸糖化	—	83 ～ 87
酸液化・酵素糖化	グルコアミラーゼ	90 ～ 93
酵素液化・酵素糖化	α -アミラーゼとグルコアミラーゼ	94 ～ 95
酵素液化・酵素糖化	α -アミラーゼ、グルコアミラーゼとプルラナーゼ	96 ～ 97

図5は、液化澱粉の糖化における、プルラナーゼの添加効果を示している。また、図6は、プルラナーゼの存在下または非存在下での液化澱粉糖化における液化澱粉濃度の影響を示している。グルコアミラーゼによる液化澱粉の糖化において、プルラナーゼを併用すると、糖化反応が促進されるため、グルコアミラーゼの使用量を大幅に節減することができる。また、生成したぶどう糖が逆合成してオリゴ糖が副生するのを防ぐ効果もある。

以上により、澱粉から、オリゴ糖含量が少なく、ぶどう糖含量の多い(96～97%)澱粉糖化液が製造できるようになった。現在では、この方法による澱粉糖化が主流になっている。そして、この方法は、後に述べる(3.5.1節)、「クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離法」を応用して製造されるようになった果糖含量55%の「果糖ぶどう糖液糖」(4.節、日本農林規格)の製造に欠かせない技術²⁾になっている。

現在、グルコアミラーゼと併用できる耐酸性と耐熱性に優れた *Bacillus* 属プルラナーゼがアミノ

エンザイム(株)とノボ・インダストリー(Novo Industry)社(デンマーク)⁵⁾から販売されている。また、この酵素をグルコアミラーゼ剤に添加した糖化酵素(ノボ・インダストリー社のデキストロザイム⁶⁾)も販売されている。なお、この分野での著者らの研究に対し、工業技術院は特許出願²⁻⁴⁾をし、天野製薬(株)(現在 アマノエンザイム)、ナガセ生化学工業(株)、ノボ・インダストリー社などと実施契約を締結した。

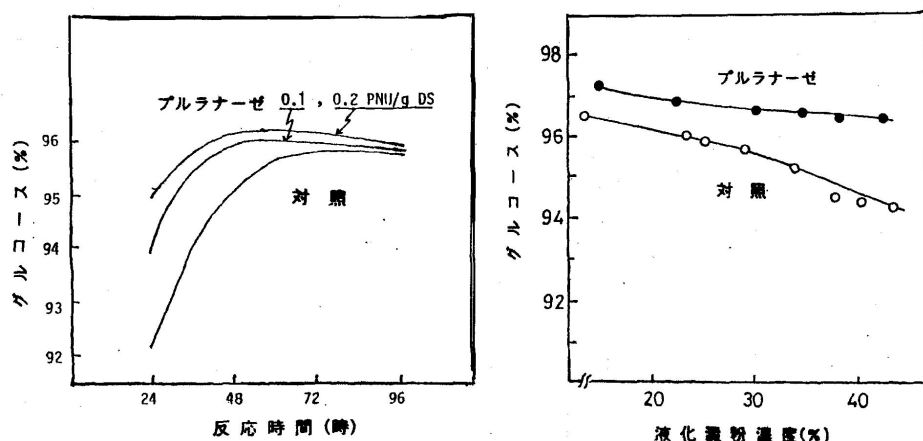


図 5(上図左) 液化澱粉糖化におけるプルラナーゼの添加効果

液化澱粉 (DE^{注7)} 11) 31 %, pH 4.5-4.7, 60℃で反応。

図 6(上図右) プルラナーゼの存在下、液化澱粉糖化における液化澱粉濃度の影響

液化澱粉 (DE 7.7), pH 5.0, 55℃で反応。

2.3 ぶどう糖を果糖に変換(異性化)する研究とその背景

上記により、澱粉から良質のぶどう糖が、収量よく、大量生産できるようになったが、ぶどう糖の甘味は砂糖の6割程度しかないため、甘味料としては限界があった。一方、同じ分子式の果糖は、わずかな構造の違いだけで、ぶどう糖の2~3倍の甘味がある。このため、ぶどう糖を果糖に変換(異性化)する研究が行われるようになった。

1895年、Lobry de Bruyn氏と Alberda van Ekenstein氏⁷⁾は、アルカリでぶどう糖を果糖に変換する研究を行なった。イオン交換樹脂が開発(1935年)され、普及した1953年頃からは、陰イオン交換樹脂のアルカリ性を利用して、ぶどう糖を果糖に変換する研究が行なわれた。

1957年、米国、コーン・プロダクト(Corn Product)社の R.O.Marshall氏と E.R.Kooi氏は、D-キシロース(以下、キシロースと略す)を添加した培地で培養して得た、シュードモナス・ヒドロフィラ(*Pseudomonas hydrophila*)の菌体(または菌体の破砕物)が、珪酸塩を使用した緩衝液の下で、ぶどう糖の一部が果糖に変換するのを認め、報告した⁸⁾。

以上のほか、これまでに発表された「ぶどう糖から果糖を製造する方法」について、著者は、以下のように分類している。

2.3.1 アルカリによる異性化法

1895年、Lobry de Bruyn氏と Alberda van Ekenstein氏が、アルカリを用いてぶどう糖を果糖に変換する研究「Lobry de Bruyn Alberda van Ekenstein 転位」を発表して以来、水酸化ナトリウム、

石灰などのアルカリを用いて、異性化条件が検討され、数多くの特許も出された〔USP-2,354,664 (1944)、USP-2,487,121(1949)、特公昭 36(1961)-6483、特公昭 38(1963)-23998 ほか〕。アルカリ法によるぶどう糖から果糖への異性化率は 35～45%に達すると云われている〔日本特許 424493 (1963)〕が、工業化されていない。その理由として、糖が分解して、果糖以外の糖、有機酸や色素などが生成し、風味がよくない、などが挙げられている。

2.3.2 イオン交換樹脂による異性化法

イオン交換樹脂が開発されると、1953 年頃より、強塩基性陰イオン交換樹脂、あるいは、アルカリ性の交換基をもつ陽イオン交換樹脂を用い、ぶどう糖を果糖に異性化する研究が行われ、特許も出願されている〔USP-2,746,889(1956)、特公昭 38(1963)-17397、特公昭 39(1964)-1997 など〕が、この方法も、上記「アルカリ法」と同じ問題がある。

2.3.3 ぶどう糖の酸化還元による方法

(1) ソルビトールを経由してぶどう糖を果糖に変換する

この研究は、1961 年頃より行われている。上田氏ら⁹⁾と足立氏らは¹⁰⁾は、ぶどう糖を化学的に還元(水素添加)して製造されているソルビトール(糖アルコールの一種で、ソルビットとも云われ、甘味料、化学原料として利用されている)を微生物を用いて果糖に酸化する方法である(図 7)。日本、米国などで特許が取得されているが、工業化されていない。

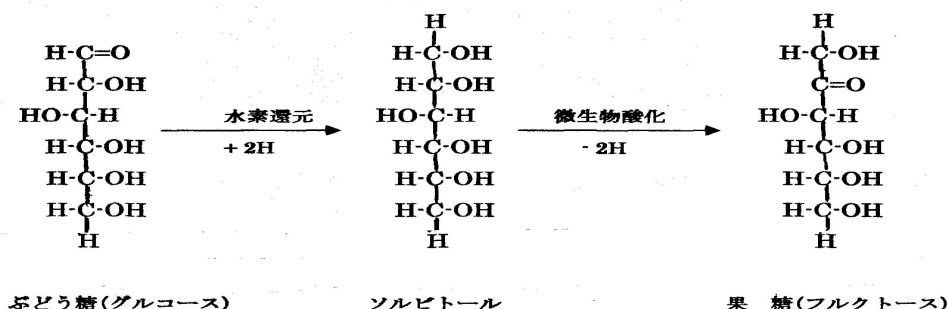


図 7 ぶどう糖を還元してソルビトールをつくり、次いで微生物で果糖に酸化する

(2) グルコソンを経由してぶどう糖を果糖に変換する

ぶどう糖を微生物で酸化してグルコソンとし、これを微生物により果糖に還元する方法である(図 8)。日本で酵素法によるぶどう糖から果糖の製造法が工業化された後であったが、海外から、日本に売り込みのための講演会〔〈米〉シータス社、1982 年〕が東京で開催され、著者も出席した。この

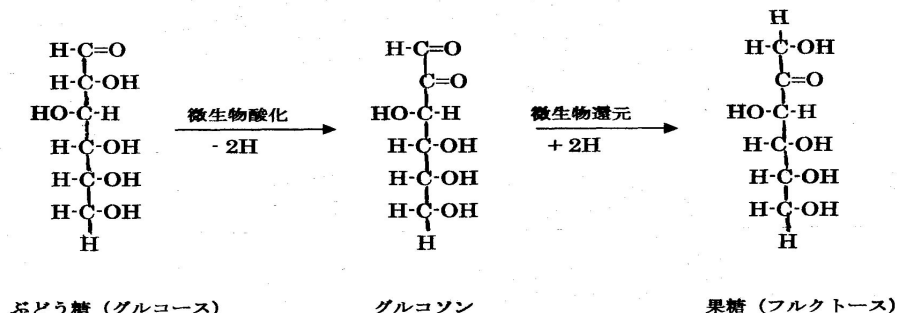


図 8 ぶどう糖を微生物で酸化してグルコソンとし、次いで微生物で果糖に還元する

機作によるぶどう糖から果糖の生成については、著者はバシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)の酵素を用い、報告していた²⁷⁾。この方法も工業化されなかった。

2.3.4 微生物酵素を用い、ぶどう糖を、直接、果糖に変換する

(1) 砒酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換する

1957 年、米国コーン・プロダクト社の R.O.Marshall 氏と E.R.Kooi 氏は、キシロースを含む培地で培養した細菌(*Pseudomonas hydrophila* N.R.C.491, 492)が、砒素化合物(砒酸塩)の存在下でぶどう糖が果糖に変換するのを認め、報告した。この報告は、1 頁足らずの短いものであったが、ぶどう糖を果糖に変換する方法については、下記のとおり、具体的に記述されていた。

「キシロースを含む培地で培養したシュードモナス・ヒドロフィラ(*Peudomonas hydrophila*) N.R.C.491, 492 の菌体 5.0g、ぶどう糖 90g、塩化マグネシウム 2.5 mM(ミリモル)、砒酸塩緩衝液(pH8.0) 0.03M(モル) の組成からなる全量 500ml の反応液を、40℃で、48 時間反応させた結果、29.2g の果糖が得られた。」というものであった。

この後、米国からの報告は途絶えた¹¹⁾が、この研究を引き継ぐ形で、日本の大学や、国立の研究機関、企業などで研究が行われた。学会で研究発表をした大学と研究機関は、香川大学、兵庫農大[(現)神戸大学]、九州大学、東京教育大学[(現)筑波大学]、農水省食品総合研究所(当時)、通産省工業技術院発酵研究所(当時)などで、年 1 度の日本農芸化学学会大会で、互いの研究成果を発表し合った。1960 年頃から 20 年間位続いたと思う。

先ず、日本でも、新たに分離した微生物を用い、キシロースを添加した培地で培養して得た菌体が砒酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換することが報告された。

1961 年、津村氏は、細菌エーロバクター・クロアカ(*Aerobacter cloacae*) KN-69 の酵素¹²⁾について報告し、1963 年、名武氏は、細菌エーロバクター・エーロゲネス(*Aerobacter aerogenes*) HN-56 の酵素¹³⁾について報告し、そして、1964 年に、名武氏は、細菌エッシェリシア・インターメディア(*Escherichia intermedia*) HN-500 の酵素¹⁴⁾について報告した。

1968 年、名武氏は、砒酸塩の存在で、ぶどう糖が果糖に変換する反応は、生物の重要なぶどう糖代謝経路[Embden Meyerhof Parnas(EMP)経路]の中の一酵素、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ[ホスホグルコースイソメラーゼ(Phosphoglucose isomerase)]によるものであることを明らかにした¹⁵⁾(図 9)。

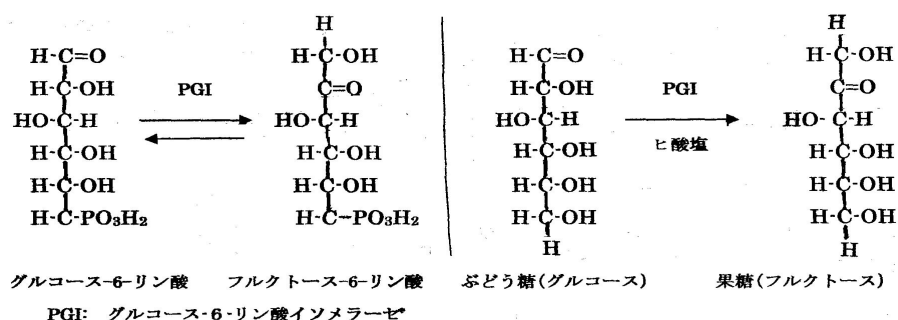


図 9 グルコース-6-リン酸イソメラーゼは砒酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換する

(2) D-キシロースイソメラーゼによりぶどう糖を果糖に変換する

D-キシロースイソメラーゼ(以下、キシロースイソメラーゼと略す)は D-キシロース(以下、キシロースと略す)と D-キシルロースの間を相互変換する酵素である(図 10)。山中氏は、キシロースを添加した培地で培養した乳酸菌、ラクトバシルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)のキシロースイソメラーゼがぶどう糖を果糖に変換することを認め、報告した^{16,17)}。

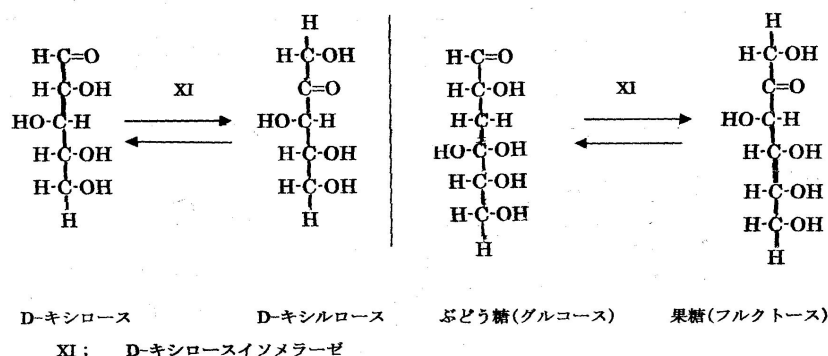


図 10 D-キシロースと D-キシルロース、ぶどう糖と果糖の構造と変換反応

当時、この研究結果はテレビ、新聞などで大きく取り上げられた(1962.1.13-14)¹¹⁾。この酵素について、頼富氏[参松工業(株)]は、著書¹⁾の中で、次のように記述している。

「・・・砒素が必須ではないことを知った業界は、いよいよ酵素法異性化法の到来を確信させられた。このイソメラーゼは力価の点で経済性を得るに至らず・・・」。

この酵素の生産にも、当時、高価で入手が困難であったキシロースを使用していた。

このほか、1964 年に、Hsu Tz-yuan 氏らはキシロースを含む培地で培養した放線菌、*Streptomyces griseus* の生産するキシロースイソメラーゼについて報告し¹⁸⁾、同じく、1964 年、津村氏らは、キシロースを含む培地で培養した放線菌、*Streptomyces phaeochromogenes* が生産する、最適 pH が 9.3~9.5 にあるグルコース異性化酵素を発表した¹⁹⁾。これらの報告以降も、酵素生産誘導物質(inducer)としてキシロースを用いたグルコース異性化酵素が数多く報告された。

市村氏らは *Brevibacterium* 属菌株のグルコース異性化酵素²⁰⁾について報告し(1965年)、団野氏は、*Bacillus coagulans* のグルコース異性化酵素²¹⁾について報告し(1970-1971)、C.K.Lee 氏らは *Arthrobacter* 属のキシロースイソメラーゼ²²⁾について報告し(1972)、B.L.Scallet 氏らは *Actinoplanes missouriensis* のキシロースイソメラーゼ²³⁾について報告し(1974)、そして、末兼氏らは *Streptomyces olivochromogenes* と *Bacillus stearothermophilus* のグルコースイソメラーゼ²⁵⁾について報告している(1978)。

キシロースイソメラーゼはキシロースによって誘導生産される酵素(誘導酵素)で、ぶどう糖に作用すると報告されている酵素も、通常、ぶどう糖よりもキシロースに対して親和性が高いことから、キシロースイソメラーゼと呼ばれるべき酵素であるが、キシロースイソメラーゼの中には、ぶどう糖には作用しないと報告されている酵素^{18,24)}もあり、また、キシロースとぶどう糖に対する親和性に殆ど差がない酵素もある(表 8)ことから、ぶどう糖から果糖の製造に利用されるキシロースイソメラーゼはグルコースイソメラーゼと呼ばれるようになった。

キシロースイソメラーゼには、生産する微生物により、熱に安定な酵素(最適温度、80～90℃)と不安定な酵素(最適温度、30～40℃)がある。酵素を工業的に使用するには、反応中、反応液が微生物により汚染されるのを防ぐため、低くても、55～60℃で使用できることが要望される。

グルコースイソメラーゼは、反応に際し、マグネシウムイオン³¹⁾、マンガンイオン¹⁶⁾あるいはコバルトイオン^{20,25)}の、いずれかの金属イオンを必要とし、同酵素を生産する微生物によって異なっている

(表 6)。酵素利用の観点からは、安全なマグネシウムイオンを要求する酵素が望ましい。

表 6 グルコース異性化反応における金属イオンの影響

酵 素 源	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	文 献
<i>Streptomyces</i> sp. YT-5	97	27	100	31
<i>Lactobacillus brevis</i>	5	100	32	16
<i>Bacillus coagulans</i>	11	11	100	25
<i>Brevibacterium</i> sp.	27	19	100	20

3. 当該科学技術実現のキーとなった主要なポイント

3.1 新規グルコースイソメラーゼ生産菌の探索と同酵素の生産

3.1.1 グルコースイソメラーゼ生産菌の探索と分離

著者は、この研究を 1961 年頃⁵⁶⁾より始めたが、当初から、

- (1) 酵素の生産に高価なキシロースを必要としない微生物を探索する、
- (2) 反応に有毒な硫酸塩を必要としない酵素を探索する、
- (3) 工業的な使用に耐える熱に安定な酵素を探索する、

ことを目標として、広く自然界から微生物の検索を行った。

まず、細菌バシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)の「ぶどう糖異性化酵素(1962-) ^{27,28)}」と、細菌パラコロバクテリウム・エーロゲノイデス(*Paracolobacterium aerogenoides*)の「ぶどう糖異性化酵素(1963-) ^{29,30)}」について報告した。これらの微生物は、いずれも、酵素の生産に際して、キシロースを必要とせず、また、砒素化合物を使用することなく、ぶどう糖を果糖に変換することができたが、熱安定性に劣っていた(最適作用温度 35° ～40℃)。

このほか、グルコースイソメラーゼ生産菌の探索過程で分離した、キサントモナス(*Xanthomonas*)属細菌³⁰⁾や、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属放線菌³²⁾の生産するマンノースイソメラーゼ(マンノース^{注 3)}と果糖の間を相互変換する酵素^{注 4)}や、上記のパラコロバクテリウム(*Paracolobacterium*)属細菌³¹⁾の生産するマンノース異性化酵素についても報告してきた。

マンノースイソメラーゼは、マンノースを高い収量(75%)で果糖に変換する。著者が、この酵素を研究したのは、先が見通せなかった、「ぶどう糖異性化酵素」が見出せなかったときの逃げ道と考えてのことであった。このマンノースイソメラーゼの研究で、研究者としての最低限の義務と考えていた、学会での研究発表と学会誌への投稿を行い、時を稼ぎながら、多くの時間をぶどう糖異性化酵素生産菌の検索に費やしてきた。しかし、このとき行ったマンノースイソメラーゼの研究が、最

近、注目されるようになったマンノースの製造法として、マンノースイソメラーゼの逆反応(果糖 → マンノース)を利用することになるとは、当時、思いもしなかったことである(7 節、8.4 考察)。

ぶどう糖異性化酵素生産菌の検索も 3 年目に入り、暗中模索の状態に陥っていたとき、ふと、「キシラン」のことが思い浮かんだ。キシランは、主としてキシロースからなる高分子物質で、植物界にはセルロースに次いで多く存在しているので、容易に手に入れることができる。そこで、キシランを唯一の炭素源として、微生物に与え、「微生物にキシランからキシロースを作らせ、これを用いてぶどう糖異性化酵素を作らせよう」と考えた。

ほどなく、目標としていた微生物[ストレプトマイセス(*Streptomyces*) 属 YT 株] を分離することができ、ぶどう糖異性化酵素を安価に大量生産する道を拓くことができた。なぜ、もっと早く、このことに気が付かなかったのか、当時は、後悔し、残念にも思ったが、その後の研究結果²⁶⁾は予想外のもので、浅はかな考えでもあったことを思い知らされた。

すなわち、この微生物がキシランを利用するために菌体外に生産するキシラン分解酵素(キシラーナーゼ)は、キシランをキシロビオース(xylobiose、キシロースが 2 分子結合した二糖)単位で分解する酵素^{注 5)}で、キシロースは殆ど生成しない酵素であった。

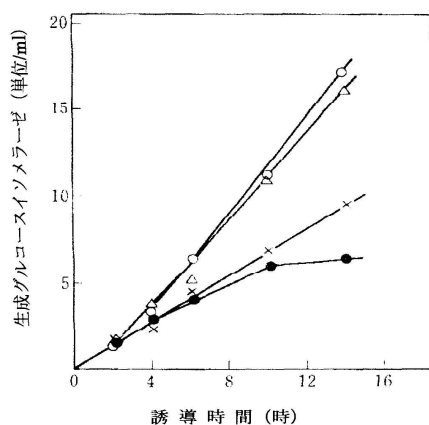


図 11 *Streptomyces* sp.YT-5 株のグルコースイソメラーゼ生産に対するキシロース(X₁)とキシロビオース(X₂)の効果²⁶⁾

グルコースイソメラーゼを含有しない*Streptomyces* sp.YT-5の洗滌菌体懸濁液(乾物として5-7.5 mg/ml), リン酸緩衝液(pH7.0) 0.025 M, ポリペプトン 1%, MgSO₄ 10 mMとCoCl₂ 1 mM濃度になるように加えた全量10 mlを50ml容フラスコに入れ, 30℃で振盪(200 rpm).

●; X₁ 0.5%, ×; X₂ 0.5%, △; X₂ 0.1% + X₁ 0.4%, ○; X₂ 0.2% + X₁ 0.3%.

菌体に取り込まれた後のキシロビオースの代謝については研究していないが、菌体内にもキシロビオースをキシロースに分解する酵素は認められなかった。この微生物にとって、キシロビオースは、キシロースよりも優れた(10~15%²⁶⁾)グルコースイソメラーゼの「誘導物質(インデューサー、inducer)」であり(図 11)、キシロースとキシロビオースが共存すると、付加的にグルコースイソメラーゼを生産した(図 11, -△-, -○-)。

3.1.2 ぶどう糖異性化酵素(グルコースイソメラーゼ)を生産するキシラン資化性

***Streptomyces* 属放線菌の性質**

新たに分離したストレプトマイセス(*Streptomyces*) 属菌(YT 株)と、同菌株が生産するぶどう糖異性化酵素(以下、グルコースイソメラーゼという)の性質^{33,34)}の概要を、以下に記す。

(1) この菌株(写真 1)は、ペレット(菌糸のかたまり(写真 2))を形成して生育し、培養が容易で、培養後の菌体の濾過回収も容易である(この特徴は、菌体を固定化酵素にする場合に有利となる)。

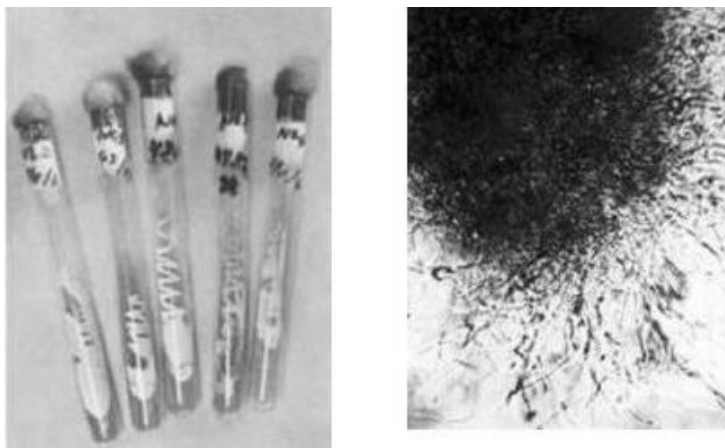


写真 1(左): 試験管に保存された *Streptomyces* sp.YT-4 株と同 YT-5 株

写真 2(右): 液体培地で培養した *Streptomyces* sp.YT-5 株の顕微鏡写真

菌糸のかたまり(ペレット)を形成して生育、菌糸の直径は約 1 ミクロン(1/1000 ミリ)。

(2) 表 7 は、本菌株によるグルコースイソメラーゼ生産のための培養原料について調べたものである。この菌株は、高価で、大量入手が困難なキシロースの代わりに、キシランを用いてもグルコースイソメラーゼを同程度に生産すること、また、キシランの代わりに、農産廃棄物であるキシラン含有物〔小麦ふすま(wheat bran)、トウモロコシの実の外皮(corn hull)、トウモロコシの穂軸(corn cob)〕など(これらには、キシランが 20~30%の含まれている)を使用した培地でも、キシロースやキシランを使用した場合と同程度にグルコースイソメラーを生産することがわかった³³⁾。また、コーン・スティープ・リカー(corn steep liquor、略して CSL、トウモロコシ澱粉の製造時に出る排液を濃縮したもの)もキシラン源として、また、窒素源として、グルコースイソメラーゼ生産の有用な培養原料であることがわかった。

(3) この菌株は、食品加工用の酵素として安全であることが確認され(微生物化学研究所)⁵⁴⁾、米国食品医薬品安全局(FDA)の認可(1983)を得ている³⁵⁾。

(4) この菌株は、より詳細な菌学的性質の検討により、当初のストレプトマイセス(*Streptomyces*) sp.YT-4 と YT-5 株は、ストレプトマイセス・アルブス(*Streptomyces albus*)に分類した。その後、米国での実施許諾企業である SBI 社(後述)との協議により、ストレプトマイセス・ウエドモレンシス(*Streptomyces wedomorensis*)に変更し、更に、現在、ストレプトマイセス・ルビジノサス(*Streptomyces rubisinosus*)に変更している〔なお、*Streptomyces* sp.YT-4 株と同 YT-5 株は、同時に分離した菌株で、形態的性質(胞子の形状)に違いが認められる以外、その他の菌学的性質、

生産されるグルコースイソメラーゼの性質については、顕著な違いは認められていない]。

表 7 キシラン資化性 *Streptomyces* sp.YT-5 株のグルコースイソメラーゼ
生産に対するキシロース、キシランとキシラン含有物の影響³³⁾

培 養 炭 素 源	酵 素 活 性 (単位/ml 培 地)	菌 体 タ ン パ ク 量 (mg/ml 培 地)	比 活 性 (単位/蛋白 mg)	相 対 値 (菌 体 当 た り の 酵 素 生 産 量)
無 添 加 (基本培地 1)	0.38	4.26	0.09	2.0
+ キシラン 1 %	21.9	4.54	4.83	105.5
+ D-キシロース 1 %	25.5	5.12	4.58	100
+ D-グルコース 1 %	1.75	5.44	0.32	7.0
+ D-フルクトース 1 %	0.50	5.44	0.09	2.0
無 添 加 (基本培地 2)	3.16	3.64	0.99	19.2
D-キシロース 0.025%	14.6	3.40	4.28	83.4
+ " 0.05 %	20.3	3.98	5.10	99.4
+ " 1.0 %	20.3	3.96	5.13	100
+ " 1.5 %	17.4	4.26	4.08	79.5
+ 小麦ふすま 1 %	9.83	5.40	1.73	33.7
+ " 2 %	19.9	5.84	3.41	66.5
+ " 3 %	30.0	6.04	4.97	96.9
+ " 4 %	22.2	5.88	3.78	73.7
+ トウモロコシ実外皮 1 %	13.0	5.68	2.39	46.6
+ " 2 %	21.5	5.50	3.91	76.2
+ " 3 %	22.8	5.04	4.52	88.1
+ " 4 %	5.50	3.98	2.31	45.0
+ トウモロコシ穂芯 1 %	15.5	5.46	2.75	53.6
+ " 2 %	20.8	5.70	3.66	71.3
+ " 3 %	20.5	5.16	3.97	77.4
+ " 4 %	7.76	3.98	1.49	29.0

培養; 1段目; 基本培地 1 (カゼイン酵素分解物 2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024 %, K_2HPO_4 0.3 %), 30°C, 24 hrs 振盪培養, 2-4 段; 基本培地 2 [corn steep liquor 2 %(乾物として), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 %, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024%], 30°C, 24 hrs 振盪培養.

(5) この酵素は、ぶどう糖から果糖への変換に際し、硫酸塩の添加を必要としない。

(6) この酵素の最適作用 pH は 7 付近にある(図 12)。最適作用温度は 80~85°C にあり、熱安定性に優れている(図 13)³⁵⁾。

(7) この酵素は安全なマグネシウムイオンで活性化される酵素である(表 6)。

(8) この酵素(*Streptomyces* YT 株)と *Lactobacillus* 属及び *Bacillus* 属のグルコースイソメラーゼ

の基質とこれら基質に対する Km (ミカエリ定数) 値を表 8 に示している。

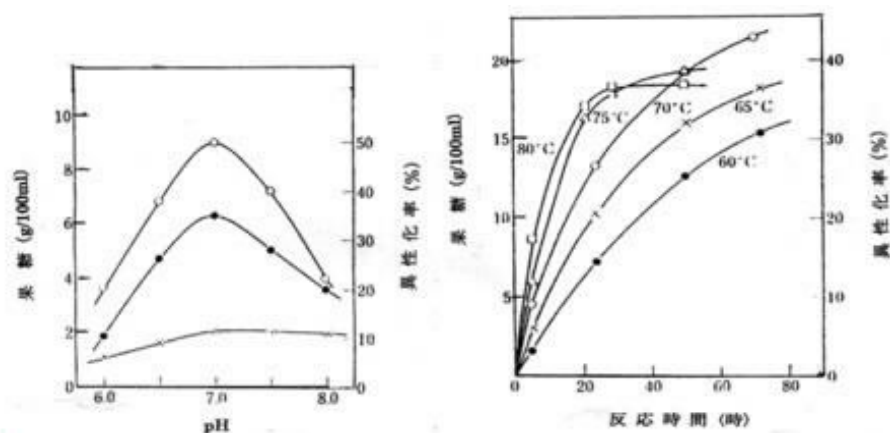


図 12(上図左) グルコースイソメラーゼ反応に対する pH の影響

ぶどう糖 18 %, リン酸緩衝液 50 mM, MgSO_4 5 mM, 酵素 260 単位, 全量 100 ml, 反応温度, 65°C, 反応時間; ×; 5 hr, ●; 20 hr, ○; 50 hr.

図 13(上図右) グルコースイソメラーゼ反応に対する温度の影響

ぶどう糖 50 %, リン酸緩衝液(pH 6.8-7.2) 50 mM, MgSO_4 5 mM, 酵素 438 単位, 全量 100 ml.

表 8 グルコースイソメラーゼの基質特異性

酵 素 源	Km	Km	Km
	(対キシロース)	(対グルコース)	(対リボース)
1) <i>Streptomyces</i> sp.YT-4	0.20	0.20	(未測定)
2) <i>Streptomyces</i> sp.YT-5	0.032	0.16	(未測定)
3) <i>Streptomyces</i> sp.YT-6	0.30	0.20	0.14
4) <i>Lactobacillus brevis</i>	0.005	0.92	0.67
5) <i>Bacillus coagulans</i>	0.077	0.09	0.077

Km; ミカエリス定数 (Km の逆数はその基質に対する親和性を表す)

3.1.3 グルコースイソメラーゼの生産

試験管に保存されている *Streptomyces* 属菌株(写真 1)を、先ず、適当な液体培地を入れたガラス製のフラスコに接種し、好氣的に(振盪しながら)培養する(30°Cで 1~2 日)。次いで、無菌空気の通気と攪拌装置を備えた小型の培養装置(Jar fermenter)を用い、30°Cで 1~2 日間培養する。このように段階的に培養の規模を大きくし、工場規模の培養は、容量 20~100m³ 程度の培養タンクで、無菌空気を通気しながら、30°Cで 1~2 日培養する。

工業的にグルコースイソメラーゼを生産する場合の培地は、コーン・スティープ・リカー(CSL)約 2%(乾物として)と、小麦ふすま 3%に、少量のマグネシウム塩を添加した培地が使用された³⁶⁾。その後、限られた量ながら、キシロース廃蜜(キシロースを製造するため、綿実粕を酸分解し、濃縮し、キシロースを析出させ採取した後に残る廃蜜で、キシロースの他、キシロビオースや、さらに分子の大きいキシロオリゴ糖、キシランが含まれる)が入手できるようになり、炭素源として使用された¹⁾。現

在、この微生物は、突然変異により、誘導物質を必要としない微生物に育種改良されている。

3.1.4 グルコースイソメラーゼの回収、精製と結晶化

グルコースイソメラーゼは菌体内に存在する酵素であるので、培養後、酵素を熱固定³⁸⁾(3.2.2節)した後、濾過して菌体を回収する。この熱固定は、培養終了後の培養液の温度を 60~85℃で短時間(数分)加熱するもので、この熱処理により、酵素が菌体に強く保持されるようになるだけでなく、培養液の濾過性がよくなり、菌体を容易に濾過回収できるようになる利点がある。あるいは、培養液を加熱処理することなく、濾過して、菌体を回収し、カチオン性の表面活性剤(例えば、Cetyl Pyridinium Chloride 0.1%)の存在下、微生物のもつ自己消化能を利用して、菌体からグルコースイソメラーゼを抽出し(pH6.5~7.0、40℃で数時間)⁴⁰⁻⁴²⁾、アセトン分画、DEAE-セルロース(Cellulose)カラムクロマトグラフィーとDEAE-セファデックス(Sephadex)カラムクロマトグラフィーにより精製し、濃縮後、アセトン中でグルコースイソメラーゼの結晶を得ることができる³⁴⁾。超遠心法で求めたグルコースイソメラーゼの分子量は157,000で、1モルあたり、コバルト4原子とマグネシウム33原子を含んでいた³⁴⁾。写真3は、*Streptomyces* sp.YT-5(*St.rubiginosus*)株グルコースイソメラーゼの結晶の顕微鏡写真である。

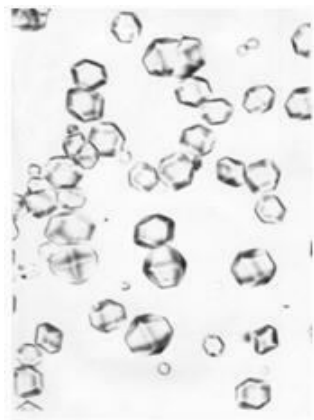


写真 3(左) グルコースイソメラーゼの結晶 写真 4(右) 異性化糖製品

3.2 グルコースイソメラーゼの固定化

3.2.1 酵素の固定化法

酵素は、一般に、水に溶けるが、これを水に溶けないようにしたものを「固定化酵素」という。酵素固定化の研究は、1960年代から精力的に行われた。酵素を固定化することにより、反応後、酵素を回収して再利用したり、酵素をカラム(塔)に詰めて、連続的に反応が行えるようになるなどの利点がある。グルコースイソメラーゼの固定化法として、以下の方法がある。

(1) 担体結合法

多孔性アルミナ、シリカなどの無機担体、強塩基性アニオン交換樹脂、DEAE-セルロースのような陰イオン交換体など、水に溶けない担体に、吸着、イオン結合、あるいは、更に強い化学結合(共有結合)で酵素を保持させる方法。

結晶まで精製したグルコースイソメラーゼを、再生利用できる DEAE-セルロースに結合させた活性の高い固定化グルコースイソメラーゼが製造され、販売されている。同固定化酵素はフィンランド

のフィン・シュガー(Finnish Sugar)社が SBI 社(6.2 節)からサブライセンスを得て製造し、日本でも販売している(精製酵素液が販売され、酵素固定化用担体 DEAE-セルロースはリースされ、同酵素固定化担体の再生と酵素の固定化は異性化糖メーカーで行われている)。

(2) 架橋法

例えば、グルタルアルデヒドのような分子の両端に反応性に富む官能基をもつ試薬(二官能性試薬)で、酵素同志を架橋して、大きくすることにより、水に溶けない形にする。グルコースイソメラーゼのような菌体内に存在する酵素の場合は、菌体同志を結びつけ適当な大きさに調製する場合にも二官能性試薬が使用されている。この場合、タンパク質、ポリアミン、ポリイミンなどの高分子物質に、活性白土、ベントナイト、モンモリロナイトなどの活性珪酸塩を加えて、固定化酵素に適当な形状と強度を持たせる工夫もされている。

(3) 包括法

酵素をゲルまたは半透性の膜でカプセル状に包むか、格子状物質の中に閉じ込める方法である。アクリルアミドのような水溶性モノマーと酵素を混合し、凝集剤、重合剤、放射線などで固め成形する方法、中空繊維の中に包み込み固定化する方法など、さまざまな方法が考案されているが、原料(ぶどう糖)と生産物(果糖)が、共に安価であるグルコースイソメラーゼの固定化法は安価でなければならない制約がある。

3.2.2 グルコースイソメラーゼの熱固定化法

著者は、培養後のグルコースイソメラーゼを含有している菌体を 60° ～85℃で短時間加熱処理することにより、グルコースイソメラーゼを菌体内に強く固定できることを認め、特許出願した〔特願昭 43(1968)-3434、特公昭 47(1972)-19030〕。著者はこの方法による酵素の固定化法を「熱固定化法」³⁶⁻³⁹⁾と名付けた。この方法により、ぶどう糖の異性化に使用した菌体を、反応後、回収して、再利用したり、あるいは、これを塔に詰めて、ぶどう糖液を流すことにより、ぶどう糖を連続的に果糖に変えることが可能になった。この技術は、直ちに、日本とアメリカで工業的に実施された。クリントン社(6.2 節)では、糖の通液をよくするため、層の浅い(2.5-7.5cm)反応槽「Vertical Leaf Filter」を多重にした反応装置を開発し、工業生産が行われた(この熱固定化法による異性化糖の製造法は、固定化酵素が工業的な大量生産に応用された最初の例である)^{35,43)}。しかし、菌体そのままでは、糖液の通液性がよくないため、培養後のグルコースイソメラーゼ含有菌体を熱固定した後、前記(3.2.1(2)節)により調製した固定化酵素や、自己消化法⁴⁰⁻⁴²⁾により酵素を抽出し、DEAE-セルロースに固定化した酵素が使用されるようになった。

3.3 固定化グルコースイソメラーゼによるぶどう糖から果糖への連続異性化

3.3.1 原料ぶどう糖液

澱粉を α -アミラーゼとグルコアミラーゼで糖化した糖液のぶどう糖の含量は 93～95%であり、残り 5～7%は未分解のオリゴ糖と、ぶどう糖が逆合成してできたオリゴ糖である。1987 年頃から、グルコアミラーゼとプルラナーゼを併用して液化澱粉を糖化するようになり、ぶどう糖の収量は 96～97%まで向上した(2.2.4 節)。

糖化液中には、グルコースイソメラーゼ反応を阻害したり、安定性を損なう微量のカルシウム塩などの無機物や、アミノ酸、ペプチドなどが含まれているため、澱粉糖化液は活性炭とイオン交換樹脂で精製した後、45～50%まで減圧濃縮される。これに、グルコースイソメラーゼの活性化と安定化のためマグネシウム塩($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)が 0.01～0.12%添加される。更に、酵素の安定性を増加し、また異性化糖液の着色を防止して、異性化後の糖液の精製を容易にするため、亜硫酸塩(例えば、 NaHSO_3 , Na_2SO_3)が、 SO_3 として 100ppm 程度添加されることがある。

3.3.2 連続反応装置と反応法

固定化グルコースイソメラーゼを充填した、保温可能な直径 0.5～1.5m、高さ 1～2m 程度の反応器(バイオリアクター)が複数基、直列に連結したものが使用されている(図 14)。通常、連結が可変できる 3 基の反応器が使用されていて、新しく固定化酵素を充填した活性の高い反応器は最後になるよう連結されている。原料のぶどう糖液は、反応器の入り口で、炭酸ナトリウムで、pH7.5～8.0 に調整されるが、固定化酵素の活性をできるだけ長期間維持するため、反応器の出口で pH7 を切ることがないように調整されている。反応は 57° ～60℃で行われている。

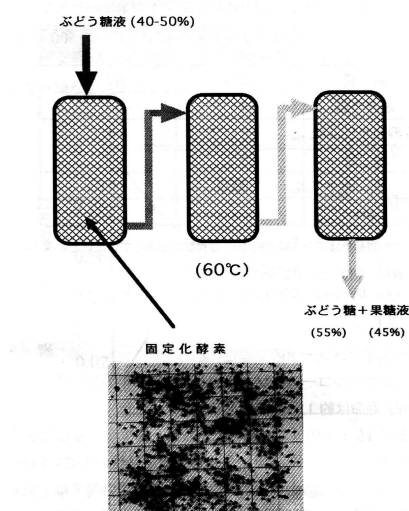


図 14 固定化グルコースイソメラーゼによるぶどう糖から果糖への連続異性化

3.3.3 反応液の糖組成

通常、反応温度 60℃で、ぶどう糖の約半分を果糖に変換することができる(図 15)が、生成した果糖が熱分解して褐色化するのを防ぎ、また、固定化酵素の活性をできるだけ長期間維持するため、ぶどう糖の約 45%が果糖に変換したところで反応を止めている。ぶどう糖含量約 95%の澱粉糖化液を原料にした場合、生成物の果糖含量は約 42%、ぶどう糖含量は約 50%、その他のオリゴ糖が約 8%含まれているもの(表 9、表 17)で、日本農林規格(4.1 節)の「ぶどう糖果糖液糖」の糖組成である(表 17)。甘味度は砂糖の 90～95%程度である(表 12)。

表 9 当初の異性化糖の糖組成

	サンフラクト 〔参松工業(株)〕*	イソメロース 100 〔(米)クリントン社〕**
水分	25%	29%
果糖	42 % (固形分換算)	42 % (固形分換算)
ぶどう糖	50 % (")	50 % (")
その他オリゴ糖	8 % (")	8 % (")
灰分		0.03% (")
pH		4.3

これらの製品ではぶどう糖の約 46%が果糖に変換していることになる。 *資料:参松工業(株)

参技 53-1, 58-3, **文献: B.Schnyder, *Die Stärke*, Vol.26, No.12, p.409(1976).

3.3.4 固定化グルコースイソメラーゼの生産性

市販されている固定化グルコースイソメラーゼの活性の半減期(活性が半分になる時間)は約 1000 時間、寿命は約 1～2 年である。この間、固定化酵素剤 1 kg 当たり、8～15 トンの「ぶどう糖果糖液糖」(4.1 節、日本農林規格、果糖 42%異性化糖)を製造することができる^{6,36)}。

果糖は溶解度が大きく、結晶化しにくい。また果糖は粘性の小さい物質であるので、混在するぶどう糖の結晶析出を防止するが、この程度の果糖含量では、気温が低下する冬場や、長期にわたる保存中にぶどう糖が次第に析出する問題があった(蜂蜜が冬場、あるいは長期保存中に、濁りを生じたり、固化するのと同じ現象)。また、果糖分 42%の「ぶどう糖果糖液糖」は、砂糖に比べ、甘味が 5～10%低い欠点があった。このため、果糖含量を高める方法が研究されるようになった(3.4 節と 3.5 節)。

3.4 グルコースイソメラーゼ反応の平衡と平衡移動

グルコースイソメラーゼ反応は可逆反応であり、ぶどう糖から果糖が生成し、果糖からはぶどう糖が生成する⁴⁷⁾(図 15)。

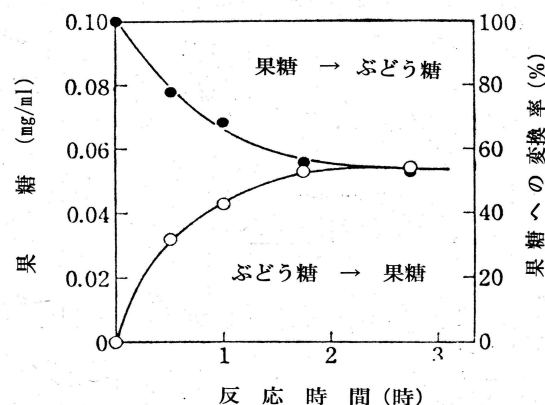


図 15 グルコースイソメラーゼ反応の平衡

反応; ぶどう糖 0.01 %, リン酸緩衝液 (pH 7.0) 45 mM, MgSO_4 9.1 mM, 60℃.

3.4.1 反応温度と平衡定数

著者は、この反応の平衡は、反応温度が高くなるほど果糖側に移行することを見出した(1967, 表 10 と図 16)⁴⁵⁾。約 50℃で、ぶどう糖と果糖は、ほぼ等量ずつになり、これより高い温度では果糖の方が多くなる。しかし、この反応の場合、反応温度を高くするのは難しい。すなわち、

- ① 酵素は一般に熱に弱く、温度が高くなると活性を失う(熱失活)。
- ② 糖は高温、特にアルカリ性下で分解し、低分子化と褐変反応(メイラード反応)がおこる。
特に、果糖は分解しやすい。

などの問題がある。糖が分解し、褐色化すると、製品の風味が損なわれるばかりでなく、反応後の糖液の精製(イオン交換樹脂と活性炭による)コストを高くする。

表 10 グルコースイソメラーゼ反応の温度と平衡時の糖組成

反 応 温 度	平 衡 時 の 糖 組 成	
	ぶ ど う 糖	果 糖
25 (°C)	57.5 (%)	42.5 (%)
40	52.1	47.9
60	46.5	53.5
70	43.5	56.5
80	41.2	58.8

反応: ぶどう糖 0.01 %, リン酸緩衝液 (pH7.0) 45 mM, MgSO₄ 9 mM.

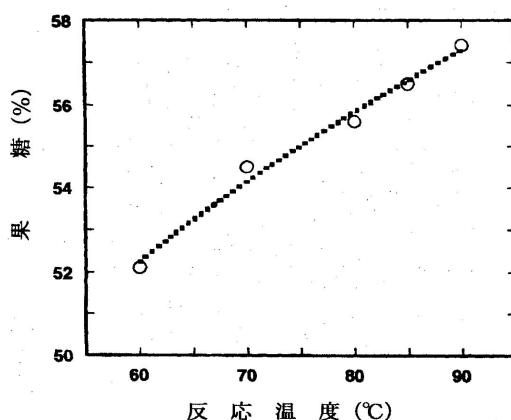


図 16 グルコースイソメラーゼ反応に対する温度の影響

反応; 基質濃度 40%(ぶどう糖 240 mg と果糖 160 mg), リン酸緩衝液(pH7.0)

50 mM, MgSO₄ 10 mM, グルコースイソメラーゼ 4 単位, 全量 1.0 ml.

N.E. Loyd 氏(SBI 社)は、酵素反応を pH3～約 8、100～110℃、2～3 分反応させるという、過酷な条件で反応を行い、果糖含量 53～60%の糖液を得る特許を出願している〔特開昭 60 (1985)-214896〕。最近、最適温度が 105～110℃にある熱に安定な *Thermotoga maritima* のグルコースイソメラーゼも報告されている⁴⁶⁾。反応温度を高くすることによる果糖側への平衡移動については、8 節考察の中で説明したい。

3.4.2 ホウ酸塩の存在下で反応する

著者は、ホウ酸塩の存在下でぶどう糖を異性化すると、ぶどう糖の最大 90%を果糖に変換でき

ることを認めた(1971 年)⁴⁷⁾が、反応後、如何にしてホウ酸塩を除去するか、たとえ除去できたとしても、食品の製造にホウ酸を使用することに問題がないかなど、検討しなければならない問題がある。

3.4.3 ゲルマニウム塩の存在下で反応する

S.A.Barker 氏⁴⁸⁾らは、ゲルマニウム塩の存在下で反応することにより、ぶどう糖の最大 94%を果糖に変換できることを認めた(1983 年)。この方法も、上記と同じ問題がある。

3.5 クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離

3.5.1 カルシウム型陽イオン交換樹脂塔によるぶどう糖と果糖の分離

クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離は、ぶどう糖または果糖と結合しやすい充填剤をカラムに詰め、塔内でぶどう糖と果糖を分離する方法である。現在、工業的には、果糖に対して親和性(結合力)が大きいカルシウム型陽イオン交換樹脂が充填剤として使用されている。すなわち、同樹脂を充填した塔に、ぶどう糖と果糖の混合液糖を注入し、次いで水を注入すると、塔内でぶどう糖と果糖が分離し、塔の下部からぶどう糖が先に流出し、果糖は遅れて流出するので、塔下部の流出口から、ぶどう糖と果糖の組成が異なる糖液を分割、採取することができる〔図 17(A)〕(クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離法は、フィンランド、ドイツ、フランスなどで、転化糖から結晶果糖の製造に利用されてきた)。

クロマトグラフ法による分離を、能率的に、また、連続的に行うため、石油化学製品(ノルマルパラフィンとイソパラフィン)の分離に、UOP 社(米国)が開発した連続式分離法を応用し、日本では、三菱化成工業(株)が複数基のカラムからなる疑似移動床法式の果糖連続分離装置を開発し、1979 年から国内外で販売⁵¹⁾している。また、参松工業(株)は「四塔式回分分離法」を開発し、工業化した(1978 年)^{49,50)}。

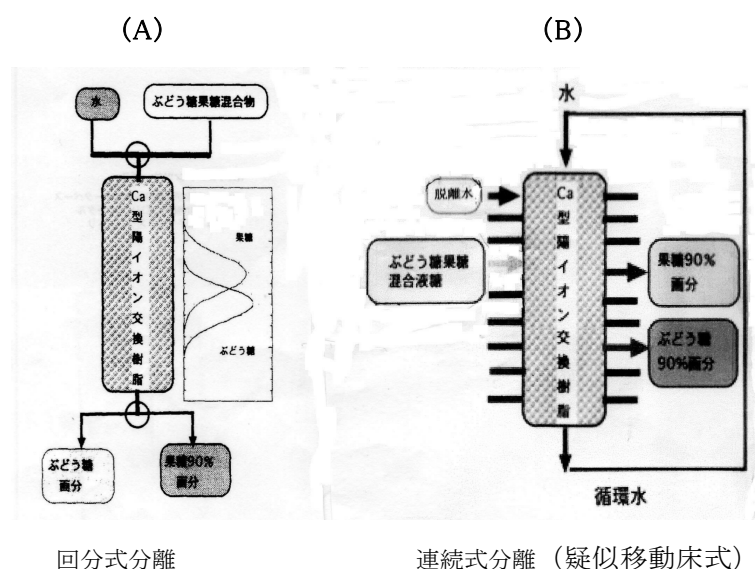


図 17 カルシウム型陽イオン交換樹脂を充填した塔によるぶどう糖と果糖の分離

図 17(A) に、カルシウム型陽イオン交換樹脂を充填した塔を使用した場合の塔内でのぶどう糖と果糖の分離パターン(回分式)を示している。また、図 17(B)は、同イオン交換樹脂を用いたぶ

どう糖と果糖の連続式糖分分離(疑似移動床式)の分離様式を示している。

連続式分離法には、分離塔の底部から連続的に抜き出した樹脂を塔頂から投入し、重力で下降させながら、分離する「移動層式連続分離法」と、この方式では、均一に樹脂を供給し、移動させることが難しいため、樹脂は固定したまま、塔上部から供給される展開液(水)の移動に合わせて、試料の注入口と分離物の抜き出し口を、順次切り換え、移動しながら行うことにより、樹脂が移動するのと同じ効果で分離する「疑似移動床式連続分離法」がある。

この疑似移動床式連続分離法も、工業的な装置では、原料の注入口や流出口の移動は、複数基(通常、4基)に分割し、直結した樹脂塔に合わせて、順次切り換え、繰り返すことにより行われている[図 17 (B)]。クロマトグラフ法による糖分分離では、原料液と同量以上の展開液、水が使用されるので、できるだけ水の使用量を少なくし、高濃度の糖が分離できるよう操作されている。

クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離により、果糖含量約 90%の「高果糖異性化糖」が分離され、これを果糖含量 42%の「ぶどう糖果糖液糖」と混合して、果糖含量 55%の「果糖ぶどう糖液糖」が製造されている(1977 年工業化)。同時に分離される「ぶどう糖含量の多い糖液」は、濃縮後、グルコースイソメラーゼにより、果糖に異性化され、再利用されている。

この分離法では、原料中のオリゴ糖はぶどう糖画分に移行するため、この分離操作を繰り返すと、オリゴ糖が次第に濃縮され、製品化できない(規格外の)ぶどう糖画分が残ることになる。「プルラナーゼを併用するグルコアミラーゼによる液化澱粉の糖化法」(2.2.4 節)はこの問題を解決した(プルラナーゼを併用する澱粉糖化法の開発により、液化澱粉の全てを異性化糖製品に変換できるようになった)。

以上述べてきた、澱粉からぶどう糖の製造、ぶどう糖から果糖の製造、そして、果糖の分離を含めた一連の工程を図 18

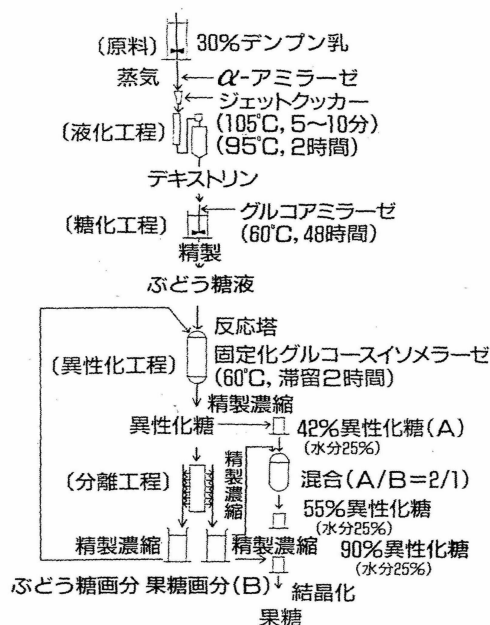


図 18 澱粉から「ぶどう糖果糖液糖」、「果糖ぶどう糖液糖」と

「高果糖液糖」の製造工程

3.5.2 亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂塔によるぶどう糖と果糖の分離

著者は、1971 年、果糖よりもぶどう糖に対して親和性の大きい亜硫酸水素型または亜硫酸型の陰イオン交換樹脂塔を使用するぶどう糖と果糖の分離法^{52,83)}を発明し、特許出願した。この発明について、吉富製糖(株)と共同研究を行い、1979 年、工業所有権法第 17 条第 1 項に基づき、特許第 531,000 号(昭和 54 年 10 月 10 日)を取得した。

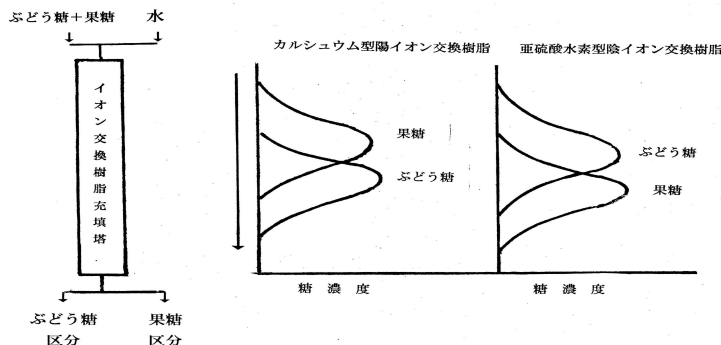


図 19 カルシウム型陽イオン交換樹脂または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂を充填した塔によるぶどう糖と果糖の分離

図 19 は、この分離法によるぶどう糖と果糖の分離パターンを、カルシウム型陽イオン交換樹脂を使用した場合のそれと比較して示している。陰イオン交換樹脂の亜硫酸水素基は、果糖よりも、ぶどう糖に対して親和性が大きいいため、果糖が先に流出し、遅れて、オリゴ糖とぶどう糖が流出する。この方法は、カルシウム型陽イオン交換樹脂を用いる方法よりも、ぶどう糖と果糖の分離は良好で、かつ、オリゴ糖も分離することができるが、当時、市販されていた陰イオン交換樹脂は、陽イオン交換樹脂に比べ、高価で、また物理的強度もよくないという問題があった。今後、再検討されるのを期待している。

3.5.3 異性化糖製品の糖組成と甘味度

表 11 果糖ぶどう糖液糖と高果糖液糖の糖組成

規 格	果糖ぶどう糖液糖	果糖 90% 異性化糖
水 分	25%	20%
糖 成 分	75%	80%
果 糖	55% (固形分換算)	90% (固形分換算)
ぶどう糖	40% (")	9.5% (")
その他の糖*	5% (")	0.5% 以下 (")
灰 分	0.05% 以下 (")	0.05% 以下 (")
pH	4.5	4.5

*その他の糖：酵素(α-アミラーゼとグルコアミラーゼ)では分解できないで残る成分とぶどう糖が

逆合成して生成したオリゴ糖（資料： 参松工業(株) 参技 53-1 と 52-1).

表 11 に、市販された「果糖ぶどう糖液糖」と「高果糖液糖」の糖組成を示した。また、表 12 に、これら異性化糖製品の甘味度を示している。果糖含量 55 の「果糖ぶどう糖液糖」は砂糖と同程度の甘味があり、しかも砂糖より安価に製造できるため、糖分離法が導入された 1977 年以降、生産量は急速に伸び、1983 年以降、果糖分 55%の「果糖ぶどう糖液糖」の生産量は果糖分 42%の「ぶどう糖果糖液糖」の生産量を越えている。

表 12 酵素法により製造される果糖含有液糖(異性化糖)の甘味度

製 品 の 種 類	甘 味 の 強 さ
ぶどう糖果糖液糖(果糖分 42%)	95(10%の濃度), 100(15%の濃度)
果糖ぶどう糖液糖(果糖分 55%)	100(10%の濃度), 110(15%の濃度)
高果糖異性化糖(果糖 90%以上)	110(10%の濃度)
砂 糖	100

資料： 参松工業(株) 参技 59-5.

3.6 耐酸・耐酸性グルコースイソメラーゼと耐酸・耐酸性 α -アミラーゼの開発

著者は、澱粉の液化、糖化と異性化工程の簡素化とぶどう糖から果糖への変換率を高める目的で耐酸性と耐熱性をもつグルコースイソメラーゼと耐酸性と耐熱性をもつ α -アミラーゼの検索を、1979 年から行ってきた⁶¹⁻⁶³⁾。

トウモロコシ澱粉から異性化糖の製造には、3 つの酵素(α -アミラーゼ、グルコアミラーゼとグルコースイソメラーゼ)が使用されている。これら酵素の作用 pH と作用温度は異なるため、pH4.0~4.7 にあるトウモロコシ澱粉乳は、*Bacillus* 属の α -アミラーゼで液化するときには、アルカリで pH6~6.5 に調整され、*Aspergillus niger* のグルコアミラーゼで糖化するときには、pH4.3~4.5 に調整され、そして、グルコースイソメラーゼでぶどう糖を果糖に異性化するときには、pH7~8 に調整されている。

このような pH 調整は、異性化糖の製造工程を繁雑にしているばかりでなく、糖液中に塩が生成するため、イオン交換樹脂による糖液の精製において、イオン交換樹脂の負担になっている。また、糖、特に、果糖は、中性付近でも、分解して、有機酸、色素、プシコースなどの糖を副生するため、これらもイオン交換樹脂と活性炭による精製の負担になっている。

「澱粉の液化」、「液化澱粉の糖化」と「ぶどう糖の異性化」の 3 つの工程を、pH 調整をすることなく実施できれば、工程は簡素化され、糖液の精製コストも低減できる。

以上の理由から、酸性下、できれば澱粉乳の pH で澱粉を液化できる、耐酸性と耐熱性をもつ α -アミラーゼと、この酸性条件でも作用するグルコースイソメラーゼの検索を行ってきた。

3.6.1 耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼの検索

放線菌グルコースイソメラーゼは、通常、pH4~11 の広い pH 範囲で安定な酵素である³⁴⁾が、作用域は、pH 約 6~約 11³⁴⁾で、特に酸性域での活性が低い(図 12)。この原因について、著者らは、酸性域でおこるグルコースイソメラーゼの「可逆的な酸化失活」にあることを明らかにした^{62,63,73)}。

図 20 は、*Streptomyces* sp.T-17(G-27)株のグルコースイソメラーゼを pH5.0 または pH7.0 で、静置または振盪したときの活性の時間変化を示している。静置では、大きな活性の低下は認めら

れなかったが、振盪した場合、活性は急速に低下し、特に、pH5.0 の酸性域での活性の低下は顕著であった。しかし、この酸性域で失活した活性は、酵素を中性に戻すと元の活性に回復した(図 21)。また、亜硫酸塩(NaHSO_3 , Na_2SO_3 など)または、システインのような還元剤を添加すると、短時間で活性が回復した(図 21)^{62,63,73)}。

表 13 は、pH4.5、pH5.0 と pH7.0 でのぶどう糖の連続異性化反応におけるぶどう糖濃度、40%または 50%と亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO_3)を添加(1 mM)、または無添加の影響を示している。亜硫酸水素ナトリウムの存在は、酸性域(pH4.5 と pH5.0)での同酵素の活性の保持に有益であった。また、基質であり、還元性物質でもある、ぶどう糖も同酵素の酸性域での安定化に寄与している⁷³⁾、ぶどう糖濃度 40%より 50%の方が、同酵素は安定されることがわかった。

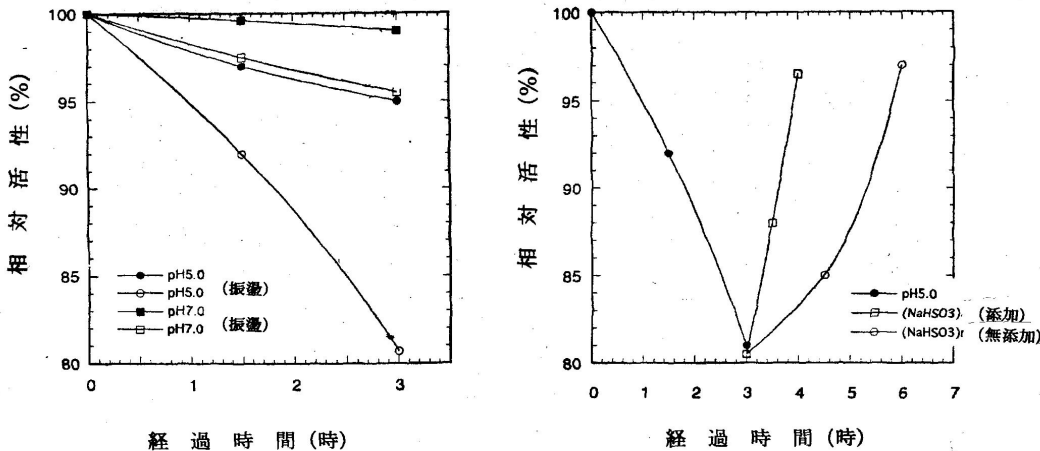


図 20(上図左) 上図右) グルコースイソメラーゼの酸性下での失活

酵素を 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)またはリン酸緩衝液(pH7.0)の下、全量 0.4ml を室温で静置または振盪(200 rpm)して、活性の低下を観察。

●; pH 5.0(静置), ○; pH 5.0(振盪), ■; pH 7.0(静置), □; pH 7.0(振盪)

図 21(上図右)グルコースイソメラーゼの酸性下での失活と活性の回復

酵素を pH5.0 の酢酸緩衝液の下、3 時間振盪(200rpm)後、リン緩衝液で pH7.0 に調整し、還元剤として NaHSO_3 を添加した場合と添加しない場合について活性の回復を観察。

●; pH 5.0(静置), □; NaHSO_3 (添加), ○; NaHSO_3 (無添加)

表 13 ぶどう糖連続異性化反応における反応 pH、ぶどう糖濃度と還元剤の影響

反応の pH	ぶどう糖濃度			
	40%		50%	
	対 照	NaHSO_3	対 照	NaHSO_3
7.0	100%	100%	100%	100%
5.0	51	59	60	72
4.5	45	56	53	64

図 22 は、遊離酵素と固定化酵素(グルコースイソメラーゼ含有菌体をゼラチンとグルタルアルデヒドで包括固定)を用い、回分式反応と連続式反応により、活性に対する pH の影響について調

べたものである。回分式反応では、遊離酵素(○-)も、固定化酵素(-●-)も、pH に対してよく似た活性曲線を示し、pH7.0での活性を100%とした場合の、pH4.5とpH5.0での相対活性は、いずれの場合も、5~10%と15~20%程度であったが、固定化酵素を用いた連続式異性化反応では、pH7.0での活性を100とした場合、pH6.0、pH5.5、pH5.0とpH4.5での相対活性は、それぞれ、93%、87%、75%と67%で(図22の-■-)、同じ固定化酵素を用いても、回分式反応と連続式反応では、酸性域の活性に大きな差があることがわかった(なお、この場合の相対活性は、ぶどう糖の異性化率が約10%になるよう、流速を調節し、流出液量とその異性化率から算出した)⁶³⁾。

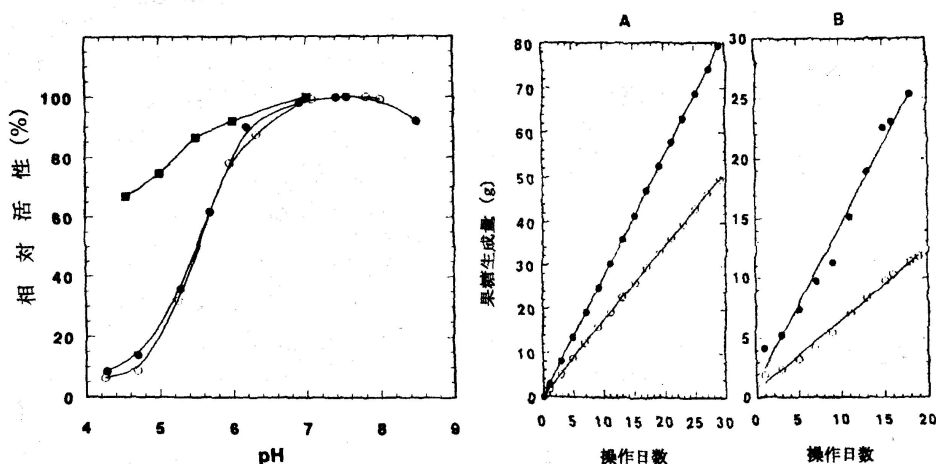


図 22(上図左) *Streptomyces* sp.T-17 グルコースイソメラーゼの活性に対する pH の影響

ぶどう糖 0.1 M, MgSO_4 5 mM, 酢酸またはリン酸緩衝液 50 mM, 全量 0.4 ml, 60°C, 30 min 反応.

○; 遊離酵素, ●; 固定化酵素(回分式反応), ■; 固定化酵素(連続式反応)

図 23(上図右) 酸性下でのぶどう糖の連続異性化

A; ゼラチンとグルタルアルデヒドで包括固定した酵素を使用, ぶどう糖 40%, MgSO_4 5 mM, NaHSO_3 1 mM, グルコースイソメラーゼ 20 単位(カラム:13mm x 80mm), 流量;0.24 ml/hr (pH 5.0), 0.32 ml/hr (pH 7.0), 60°C. ●; pH 7.0, ○; pH 5.0

B; 陰イオン交換樹脂で包括固定した酵素を使用, ぶどう糖 40%, MgSO_4 5 mM, NaHSO_3 1 mM, グルコースイソメラーゼ 5 単位(カラム:9mm x 20mm), 流量;0.23 ml/hr(pH 4.5), 0.44 ml/hr (pH7.0), 60°C. ●; pH 7.0, ○; pH 4.5

図 23A は、グルコースイソメラーゼ含有菌体を、ゼラチンとグルタルアルデヒドで包括固定した酵素を用い、酵素の酸化失活を防止する条件(NaHSO_3 1 mM 添加)の下で、pH7.0とpH5.0で連続異性化反応を行った結果を示している(流速は、ぶどう糖の異性化率が約40%になるように調整した)。図から明らかなように、この酵素は、pH5.0の酸性下でも、実験した1ヶ月間、活性の低下は認められず、安定して異性化反応が行われた。流量と異性化率から求めたpH5.0での酵素活性は、最大活性値(pH7.0)の約65%であった。

図 23B は、グルコースイソメラーゼの工業的な固定化法の一つである、陰イオン交換樹脂(polystyrene divinylbenzene N-methyl 2-pyridinium bromide)で包括固定した菌体酵素を用い、

pH7.0 と pH4.5 で連続異性化反応を行った結果を示している。pH4.5 においても、実験した 20 日間、活性の低下は認められず⁶³⁾、最大活性値(pH7.0)の約 40%の活性を示した。

果糖は、高温では、中性付近でも不安定で、分解し、着色し、副産物を生成するので、酸性域で作用するグルコースイソメラーゼの開発は必要であると思っているが、これまでのところ、酸性側に最適 pH をもつグルコースイソメラーゼを検索することはできなかった。しかし、酸性域でおこることが明らかになった「酵素の可逆的酸化失活」を考慮し、酵素の固定化法、嫌気的条件下で行える反応装置の開発や、反応方法(基質濃度、還元剤などの添加、通液方法など)を改善すれば、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼの最適 pH である、pH4.5～5.0 でも、ぶどう糖を異性化することは可能である^{63,73)}。

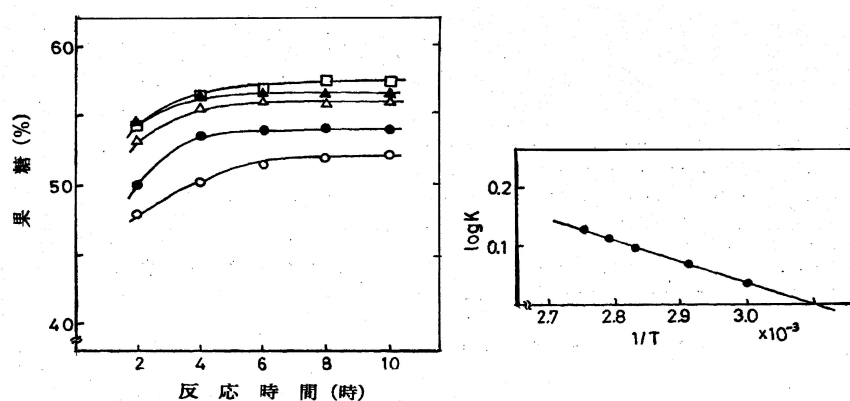


図 24(上図左) グルコースイソメラーゼ反応に対する温度の影響

反応; ぶどう糖 240 mg, 果糖 160 mg, リン酸緩衝液(pH7.0) 50 mM, MgSO_4 10 mM,
グルコースイソメラーゼ 4 単位, 全量 1.0 ml.

○; 60°C, ●; 70°C, △; 80°C, ▲; 85°C, □; 90°C

図 25(上図右) 平衡定数 K の対数を絶対温度の逆数でプロットした図

K; 平衡定数 [果糖濃度] / [ぶどう糖濃度], T; 絶対温度

この酵素は、熱安定性にも優れているため、果糖含量約 40%とぶどう糖含量約 60%からなる果糖とぶどう糖の混合液糖(濃度約 40%)を基質とし、60°C、70°C、80°C、85°Cと 90°Cの各温度で 10 時間異性化反応を行った。得られた結果を図 24 に示している。

表 14 グルコースイソメラーゼ反応の温度と平衡時の糖組成

反応温度(°C)	平衡定数(F/G)*	果糖(%)	ぶどう糖(%)
60	1.09	52.1	47.9
70	1.20	54.0	46.0
80	1.25	55.6	44.4
85	1.30	56.5	43.5
90	1.35	57.4	42.6

* F; 果糖濃度, G; ぶどう糖濃度

図 25 は、図 24 から求めた各温度での平衡定数 K([果糖] / [ぶどう糖])の対数(log K)を絶対

温度の逆数(1/T)に対してプロットしたものである。両者の間に良好な直線関係が認められた。

表 14 に、60～90℃の各温度で得られたグルコースイソメラーゼ反応の平衡定数と、平衡時のぶどう糖濃度と果糖濃度を示した。この結果は、(純)ぶどう糖を原料にすれば、80～90℃の温度で異性化反応を行うことにより、「クロマトグラフ法による糖分離工程」を省略して、果糖 55%異性化糖の製造は可能であることを示している

3.6.2 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの検索

図 26 は、新たに分離した *Bacillus licheniformis* α 2 株(α)の生産する α -アミラーゼの活性に対する pH の影響(60℃で 1 時間反応)を示している。この酵素の最適 pH は 4.5～5.0 にあり、市販されている澱粉液化酵素の最適 pH6.0～6.5 よりも酸性側に認められた。また、市販酵素に比べ、広い pH 範囲(pH 4～10)で作用する酵素である^{61,63,73)}。

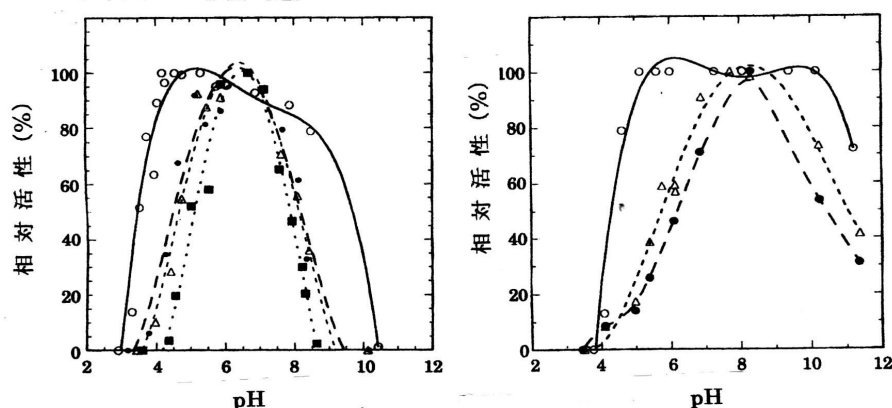


図 26 (上図左) 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの活性に対する pH の影響

可溶性澱粉 1 %, 酢酸またはリン酸緩衝液 0.1 M, CaCl_2 5 mM, 全量 0.4ml, 60℃, 1 時間反応。

○; 本酵素 ●; 市販酵素 1 (Termamyl), △; 市販酵素 2 (Taka-therm),
■; 市販酵素 3 (Amylase AH)

図 27 (上図右) 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの pH 安定性

酢酸緩衝液またはリン酸緩衝液 0.1 M, 酵素, 全量 0.4ml を 30℃で 3 時間放置後,

残存活性測定. ○; 本酵素 (pH4.6), ●; 市販酵素 1 (pH4.7), △; 市販酵素 2 (pH4.6)

図 27 は、本酵素、市販酵素 1 と市販酵素 2 の pH 安定性(30℃で 3 時間放置)を示している。本酵素は、pH 安定性においても、市販酵素とは明らかに異なっており、pH5～10 の広い範囲で安定である^{62,73)}。

図 28 は、本酵素の活性に対する温度の影響(各温度で 10 分間反応)を示している。本酵素と市販酵素 1 と市販酵素 3 の酵素は、いずれも最適温度は約 95℃付近に認められたが、市販酵素 2 の最適温度は約 80℃に認められた⁷³⁾。

図 29 は、本酵素と市販酵素の熱安定性(90℃で 3 時間放置)を示している。本酵素は市販酵素 3 と同程度の熱安定性であったが、市販酵素 1 と市販酵素 2 よりは熱に対し安定であった⁷³⁾。

本酵素の、トウモロコシ澱粉液化酵素としての安定性を知るため、工業的条件に準じて、トウモロコシ澱粉の液化を行った。すなわち、pH4.6～4.7 に調整した 30%濃度のトウモロコシ澱粉懸濁液

を 105℃で 7 分間加熱し(一次液化)、次いで 90℃で 90 分間反応を行った(二次液化)。得られた結果を図 30 に示している。市販酵素 1、市販酵素 2 と市販酵素 3 は熱失活のため、いずれも、二次液化の途中で反応が停止したのに対し、本酵素は一次液化以降、二次液化でも反応が順調に進行し、トウモロコシ澱粉を液化することができた^{62,73)}。

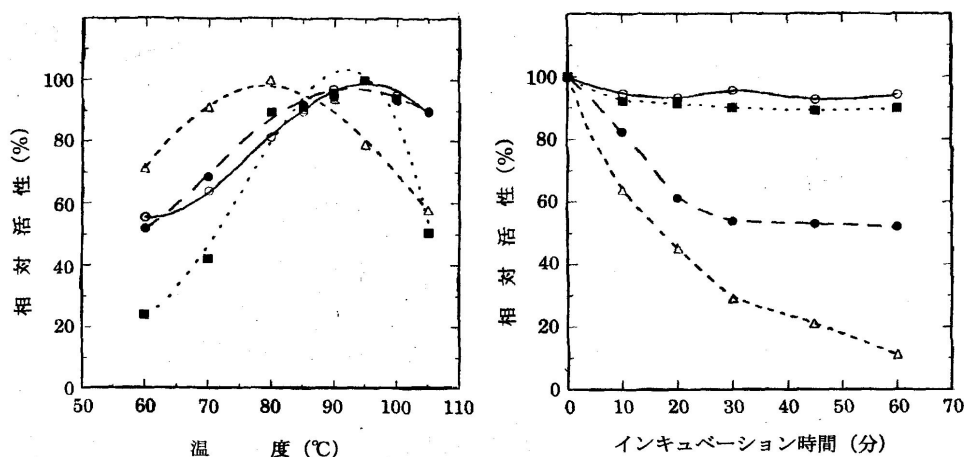


図 28(上図左) 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの活性に対する温度の影響

可溶性澱粉 1 %, 酢酸緩衝液(pH 5.5) 5 mM, 反応時間 10 分.

○; 本酵素 ●; 市販酵素 1, △; 市販酵素 2, ■; 市販酵素 3

図 29(上図右) 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの熱安定性

酢酸緩衝液(pH6.0) 5 mM, CaCl_2 5 mM と酵素, 全量 2.0 ml を 90℃で 3 時間放置し残存活性を測定.

○; 本酵素, ●; 市販酵素 1, △; 市販酵素 2, ■; 市販酵素 3

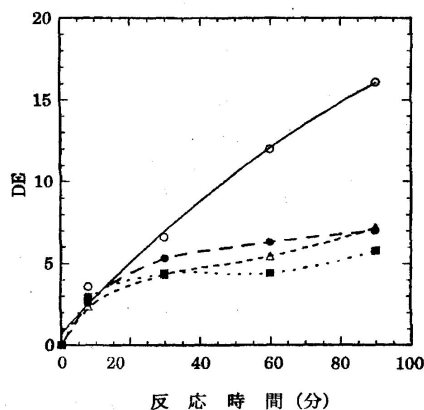


図 30 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼによるトウモロコシ澱粉液化に対する pH の影響

トウモロコシ澱粉 30 %, CaCl_2 3 mM, 酢酸緩衝液 5 mM, 酵素 1.8 単位, 全量 1.0 ml.

一次液化: 105℃, 7 分, 二次液化: 90℃.

○; 本酵素 (pH4.6), ●; 市販酵素 1 (pH4.7), △; 市販酵素 2 (pH4.6), ■; 市販酵素 3 (pH4.7)

この反応においては、酵素の安定化剤として一般に使用されている塩化カルシウム(CaCl_2 , 3 mM)のみを使用したが、塩化カルシウムのほか、塩化ナトリウム(NaCl , 1~5 mM)、マルトースや、デキストリンのような糖質(0.1~0.2%)、あるいはアルブミン(egg white)のようなタンパク質が微量存

在させることによって、この酵素の酸性域での安定性が増加する(表 15)。

Bacillus licheniformis α 2 の α-アミラーゼは、この酵素の pH に対する活性と安定性から見て、現在、工業的に使用されている澱粉液化用 α-アミラーゼ 3 種とは明らかに違った新規な酵素である。この酵素は耐熱性もあるので、pH4.5～5 程度の酸性域なら、現在の工業的なトウモロコシ澱粉の液化法(二段液化法)に準じて、トウモロコシ澱粉を液化することは可能である。

表15 *Bacillus licheniformis* α 2耐酸・耐熱性 α-アミラーゼのによるトウモロコシ澱粉液化における金属塩、糖質の影響

(1) CaCl₂、NaClの添加効果

CaCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	初発pH	終末pH	DE
0	0	4.61	4.47	2.62
1.5	0	4.61	4.42	5.45
1.5	1.0	4.61	4.37	6.00
1.5	1.5	4.61	4.36	7.05
3.0	0	4.61	4.41	8.18
3.0	1.0	4.61	4.37	8.31
3.0	1.5	4.61	4.38	9.54

反応；トウモロコシ澱粉 30 %，緩衝液 無添加，酵素 7.12 RU/g 澱粉，全量 1.0 ml.

一次液化；105℃ 7分，二次液化；95℃ 90分

(2) 糖質(マルトース、デキストリン)の添加効果

糖 質	濃度 (%)	初発pH	終末pH	DE
無添加		4.58	4.37	4.9
マルトース	0.1	4.52	4.48	14.3
〃	0.4	4.55	4.53	18.8
マルトデキストリン	0.1	4.55	4.45	16.2
〃	0.2	4.56	4.56	21.7

反応；トウモロコシ澱粉 30 %，緩衝液；無添加，CaCl₂ 2.5 mM，酵素 7.12 RU/g 澱粉，

全量 1.0ml. 一次液化；105℃ 7分，二次液化；95℃ 90分.

3.7 異性化糖開発時の問題と解決

ぶどう糖から果糖の製造は、日本では、1965 年に工業化されたが、工業化後も、問題が生ずる度に、共同研究を含む研究協力をして解決してきた。表 15 に、その概要を記載した。

表 16 異性化糖の開発過程で生じた問題とその解決

西暦年	工業化前後の問題	解 決
1961～ (工業化 前)	①グルコースイソメラーゼの生産に 高価なキシロースが必要 ②反応に際し有毒な砒酸塩が必要	キシランを資化しグルコースイソメラーゼを生産する放 線菌によるグルコースイソメラーゼの製造法を開発、工 業化(1965)(高崎ら)：

	③酵素が熱に不安定	①キシラン資化性 <i>Streptomyces</i> 属菌,小麦フスマ,CSL などのキシランを含有する農産廃棄物を用いグルコースイソメラーゼが安価に製造できるようになった ②この酵素は反応に砒酸塩を必要としない ③この酵素の最適温度は 80～85℃
1965 ～ (工業化 後)	①異性化糖製品が貯蔵中に固化する(ぶどう糖が晶出する) ②異性化糖製品の甘味が砂糖に比べ劣る(砂糖の 90-95%)	製品の果糖含量を高め、砂糖と同等の甘味をもつ異性化糖を製造した: ①反応温度によるグルコースイソメラーゼ反応の平衡移動法の発見(1967) ⁴⁵⁾ (高崎ら) ②亜硫酸型または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂塔によるぶどう糖と果糖の分離法を開発(1971) ^{52,83)} (高崎ら) ③移動層式連続分離法によるぶどう糖と果糖の分離法を開発(米, 1977) ④四塔式回分分離法によるぶどう糖と果糖分離法の開発,「果糖 90%異性化糖」と果糖 55%含有「果糖ぶどう糖液糖」を製造・販売(1978) (参松工業) ⑤疑似移動床式連続分離法によるぶどう糖と果糖分離装置の開発と販売(三菱化成,1979)
1965～	酵素の有効利用と異性化糖製造工程の能率化	グルコースイソメラーゼの固定化・基盤技術の開発: ①菌体酵素の熱固定化法を開発(1968) ^{38,)} (高崎ら) ②自己消化法により菌体から酵素の抽出法を開発(1967) ⁴⁰⁾ (高崎ら) ③グルコースイソメラーゼを結晶化(1969) ³⁴⁾ (高崎ら) ④結晶グルコースイソメラーゼの固定化(Finish Sugar 社)
1978～ 1985	糖分離法の採用で製品化できないオリゴ糖含有ぶどう糖液が副生する	グルコアミラーゼと <i>Bacillus</i> 属プルラナーゼを併用する液化澱粉糖化法を開発・工業化 ²⁻⁴⁾
1979～ 2000	澱粉の液化、糖化とぶどう糖の異性化の 3 工程の効率化と能率化のため, ①耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼの開発研究(1979～) ②耐酸・耐酸性 α -アミラーゼの開発研究(1980～)	①酸性(pH4.5～5)下でトウモロコシ澱粉を液化できる <i>Bacillus licheniformis</i> の耐酸・耐熱性 α -アミラーゼを開発(1991) ⁶¹⁻⁶³⁾ (高崎ら) ②耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼを用い嫌気的条件下,還元剤の存在下で行うぶどう糖の酸性(pH4.5～5)異性化法を開発(1994) ^{62,63)} (高崎ら)

4. 日本農林規格と製品の一般名称

4.1 日本農林規格 (JAS)

参松工業(株)は、1965 年 7 月、商品名「サンフラクト(San Fruct)」の製造販売を開始した³⁶⁾。1970 年代に入り、日本で、酵素(グルコースイソメラーゼ)製剤が販売されるようになると、多くの企業が参入し、1976 年頃には、15,6 社が製造していた⁵³⁾といわれている(現在、16 社)。このため、製品の規格を統一する機運が高まり、1976 年 6 月 25 日、日本農林規格(JAS)が公布された(農林水産省告示第 609 号)。ここで、ぶどう糖を果糖に変換して得られる果糖含有液糖は、「異性化糖」という一般名称に統一され、以下の 4 種に分類されている。

(1) ぶどう糖果糖液糖

製品に含まれる糖の果糖の割合が 50%未満のもの

(2) 果糖ぶどう糖液糖

製品に含まれる糖の果糖の割合が 50%以上 90%未満のもの

(3) 高果糖液糖

製品に含まれる糖の果糖の割合が 90%以上のもの

(4) 砂糖混合異性化液糖

上記の液糖に砂糖を混合した製品は、「砂糖混合異性化液糖」と総称され、「ぶどう糖果糖液糖」に砂糖を混合したものは、「砂糖混合ぶどう糖果糖液糖」、そして、「果糖ぶどう糖液糖」に砂糖を混合したものは「砂糖混合果糖ぶどう糖液糖」と表示されることになった(注;ブドウ糖は、ひらがなで「ぶどう糖」と表示される)。

表 17 日本農林規格(JAS)

異性化糖の種類	名 称		糖組成(%)		
			果糖	ぶどう糖	オリゴ糖
異性化液糖	ぶどう糖果糖液糖 (果糖 50%以下)	果糖 42%異性化糖	42	50-55	6-8
	果糖ぶどう糖液糖	果糖 55%異性化糖	55	39-40	5-6
	(果糖 50%以上)	果糖 90%異性化糖	90	1-9	0-1
砂糖混合 異性化液糖	砂糖混合ぶどう糖果糖液糖		ぶどう糖果糖液の量を超えない 砂糖を混合したもの		
	砂糖混合果糖ぶどう糖液糖		果糖ぶどう糖液の量を超えない 砂糖を混合したもの		

日本農林規格: 昭和 51(1976)年 6 月 21 日制定 (農林省告示 609 号)。

この日本農林規格は、昭和 52(1977)年 2 月 25 日に全面改正され(農林水産省告示 208 号)、昭和 55(1980)年 2 月 25 日にも改正されている。

以上の糖組成についての規格の他に、

- (1) 糖液の水分は 25%以下であること、
- (2) 糖分は 70%以上であること、

(3) 灰分(ミネラル)は 0.1%以下であること、

(4) pH は 4.0 以上、5.5 以下であること、

などの規定や、着色度と濁度などについて、測定法とそれによる数値が規定されている。

なお、異性化糖(HFCS)の製造において特に記しておきたいことは、1960 年代後半、これら製品の販売に際し、参松工業(株)とSBI社のクリントン工場(Clinton Corn Processing Company)の技術陣は、(1)異性化糖製品は水のように無色透明(water white)でなければならない、(2)同製品には、ぶどう糖から生成する果糖以外の不純物、特に、果糖から副生する可能性があるプシコース(psicose)など不純物が混在してはならない、など、消費者から信頼される製品の開発を目指し、協力して研究されていたことが印象に残っている。このときの両社の先見性と努力が、現在、世界的に多くの企業で製造されるようになった異性化糖(HFCS)製品の規格となり、また、異性化糖製品の信頼を高めることになったと思っている。

4.2 果糖含有液糖の一般名称、「異性化糖」について

グルコースイソメラーゼにより製造されるぶどう糖と果糖からなる液糖は、日本では、一般に、「異性化糖」と呼ばれている。

「異性化糖」という名称が採用されるようになったいきさつについて、参松工業(株)の頼富氏は著書⁵⁴⁾の中で次のように記述している「・・・農林省当局の尽力により本年(1976) 6 月 25 日農林省告示 609 号で農林規格として制定された。その名称が「ぶどう糖果糖液糖」および「砂糖混合ぶどう糖果糖液糖」と誠に長ったらしいものになった。「異性化糖」の名称でははじめての人になじめないで、別の名称を業界としては希望し、「異性化糖」の名称を最初に命名した食品総合研究所の鈴木繁男博士も「異性化糖」は学術的には適切な名称であるが、食品に使用された場合に初めての人々には奇異な印象を与えると心配されて、何か親しみやすい新規な名称が募集されたが、業界として希望する果糖を主体とした名称は消費者側からの考慮で承認し難く、遂に成分の順に表示された上述の名称となった次第である。・・・」。

異性化糖は、アメリカでは「ハイ・フルクトース・コーン・シラップ(High Fructose Corn Syrup、略称、HFCS)と呼ばれている。この名称は、SBI 社のクリントン工場で工業化(1967)された当初から使用されていた名称で、この名称は、略称「HFCS」と共に、アメリカでは広く普及した。

欧州では、日本で使用されている一般名称「異性化糖」は「イソグルコース, Isoglucose」と呼ばれ、日本の「ぶどう糖果糖液糖」と「果糖ぶどう糖液糖」に対しては、それぞれ「Glucose-Fructose Syrup(GFS)」と「Fructose-Glucose Syrup(FGS)」という名称が付けられている。

5. 異性化糖の性質、用途と生産量

5.1 異性化糖の性質

(1)果糖は、天然に存在する糖の中で最も甘味が強い。「果糖ぶどう糖液糖」の甘味は、砂糖や転化糖と同等であるが、低温では、果糖の甘味が増加するので、砂糖よりも甘くなる。このため、果糖は清涼飲料や冷菓の甘味料に向いている。冷温食品では、果糖が、低温で甘くなる分、カロリーを低減できる。

(2) 果糖および異性化糖の甘味の質は砂糖に比べてきついですが、両者を混合すると、それぞれよりも良質な甘味になると言われている。異性化糖は、人工甘味料、サッカリンの甘味資質を改善する効果があると言われている。

(3) 異性化糖は、砂糖よりも口の中で甘味が残り難い。

(4) 果糖は吸湿性が大きく、結晶化しにくい、また他の糖の結晶化を防止するので、異性化糖を食品に使用した場合、食品の乾燥を防止し、しっとり感や、柔らかい感触を与える。

(5) 果糖や異性化糖は、砂糖やぶどう糖に比べて制菌性に優れ、食品の防腐効果を高める効果がある。

(6) 異性化糖は粘度が小さいため、扱いやすく、運搬もしやすい。パイプ輸送も可能である。また、貯蔵、保存も容易で、使用時に溶解する手間が省ける。

以上の性質は、本技術が開発される以前に、砂糖を酸で分解して製造されていた転化糖で実証されていた。

(7) 異性化糖は、澱粉の液化、糖化、異性化、果糖の分離など、高度な技術と品質管理によつて無菌的に製造され、輸送される製品であるので、ユーザーは殺菌工程を省略して利用できるという無視できないメリットもあると言われている。

欠点としては、

(1) 熱に弱く、褐変反応(メイラード反応)をおこしやすい。

(2) 粉末化、固形化が難しく、液状であるため、家庭用の甘味料としては使用し難い。

(3) 異性化糖単独では、甘味の質は砂糖より劣ると云われている。

などが挙げられている。

5.2 異性化糖の用途

異性化糖は、製菓、製パン、清涼飲料、発酵乳飲料、アイスクリーム、シャーベット、その他の乳製品、缶詰食品、ジャム、佃煮、調味料など、さまざまな分野で使用されているが、家庭用の甘味料としては、テーブルシロップ(ガムシロップ)が見受けられる程度で、殆ど使われていない。容器を工夫することにより、異性化糖が、甘味料として、家庭でも広く使われるようになることが望まれる。異性化糖の価格は、砂糖と同等の甘味度をもつ「果糖ぶどう糖液糖」で砂糖の約 7～8 割程度と言われている。

5.3 異性化糖(HFCS)の生産量

1965 年、異性化糖の製造技術が工業化されてからの約 10 年間は、日本と米国のみでの生産であったが、1980 年、コカコーラ社が異性化糖を同社の清涼飲料に使用し、次いで、1984 年には、ペプシコーラ社も追随したことから、異性化糖の生産量は飛躍的に増大したと言われている。

農林水産省(消費安全局表示・企画課)が公表している資料によると、2009 年度、世界の異性化糖の生産量は 1,729.6 万トンで、このうち、このうち北アメリカでの生産量は、1237.6 万トンを占め、アジアは 336.7 万トン(内、中国は約 200 万トン)生産している。日本の異性化糖の生産量(2010 年度)は約 90 万トンで、このうち、「ぶどう糖果糖液糖」は 19.2 万トン、「果糖ぶどう糖液糖」は 67.2 万トン、「高果糖液糖」は 3.6 万トンである。このほか、異性化糖に砂糖を数%混合した「砂糖混合異

性化糖」が、16.8 万トン生産されている。

欧州連合(EU)では、砂糖(甜菜糖)産業保護のため、異性化糖に対し割り当て制が導入されているため、現在のところ、生産量は伸びておらず、全甘味料の 5%程度と言われている。

一方、2014 年度の、世界の異性化糖の消費見通しは、北アメリカ 1496.8 万トン、アジア 487.5 万トン、ヨーロッパ 103.6 万トン、南アメリカ 71.8 万トン、アフリカ 21.9 万トン、オセアニア 2.3 万トン、中央アメリカ・カリブ 1.8 万トンで、合計 2185.7 万トンである。この内、HFCS42 は 1078.2 万トン、HFCS55 は 1107.5 万トンである(LMC Int.社資料より)。

著者は、当初、この技術は、地理的条件から砂糖を輸入しなければならない国で、かつ澱粉資源が豊富な国で有用な技術と考えていたが、現実には、予想もしなかった状況になっている。例えば、メキシコではサトウキビが栽培でき、カナダではビート(甜菜)が栽培できる地理的条件にあるが、近年、人件費の高騰などから、異性化糖の生産が行われている。メキシコでは、砂糖をアメリカに輸出し、アメリカから異性化糖(HFCS55)を輸入していて、国内に異性化糖(HFCS42)を製造する工場もある。ビートが栽培できるカナダにも、異性化糖製造工場があり、米国から異性化糖を輸入している。また、ブラジルでは、自国で生産される砂糖は燃料アルコールの製造に回し、必要な甘味料は HFCS で賄うことを考えているとのことである。異性化糖の出現は、世界の甘味料市場を変貌したばかりでなく、砂糖の投機的な高騰を防ぎ、砂糖価格の安定に貢献してきたと言われている。

かつて、日本には、澱粉資源(サツマイモ)が豊富にあり、この資源を活用するため、多くの研究者が澱粉関連分野の研究に従事し、多くの澱粉関連技術が開発されたが、現在では、価格の点から、トウモロコシを輸入しなければならない状況になっている。しかも、日本では、農家を保護するため、異性化糖の製造に対して、「割当制」と「課徴金制度」が導入(1982 年)されているため、異性化糖メーカーにとって環境はよくないが、それでも、日本の異性化糖の生産量(90 万トン)は、日本で消費している全甘味料の 3 割を占めている[2014 年度の日本の砂糖の消費量は約 200 万トンで、この内の、国内産砂糖(サトウキビとテンサイ)は 3~4 割である]。

この技術を最も有利に活用しているのは、豊富なトウモロコシ資源をもつ米国である。2014 年度、米国は、約 1050 万トンの異性化糖(HFCS42 約 350 万トン、HFCS55 約 700 万トン)を製造し、このうち約 125 万トンをメキシコ、カナダ、フィリピンなどに輸出している。それでも米国で栽培されているトウモロコシの 4%程度を消費しているに過ぎないと言われている。日本を含め、その他の多くの国々は米国のトウモロコシに支えられ成り立っていると言っても過言ではない。この状況を打開する技術上の改良はすでに限界にきているのではないかと思う。

(以上、文章中の数値は、「農林水産省消費安全局表示・企画課」、「独立行政法人農畜産業振興機構 調査情報部」、英国、LMC International 社が公表している資料等を参考にした。)

6. グルコースイソメラーゼの技術移転

6.1 外国出願

著者は、キシランを資化する能力をもつ放線菌(ストレプトマイセス属菌)をキシラン含有物に培養することにより、グルコースイソメラーゼを安価に製造する方法を発明し、下記の特許出願をした。

発明(1)「グルコースイソメラーゼの製造法」特願昭 40-27524(1965)、(特許昭 41(1966)年 484472 号)

この発明について、当時、著者が勤めていた通商産業省工業技術院発酵研究所の近くにあった参松工業株式会社(千葉工場)の協力を得て工業化試験を行い、工業化に成功した(1965 年 7 月)。この成功は、当時、同社の常務兼技術部長をされていた頼富憲三郎氏と吉田司部長の決断と実行力にもよるものであったが、私どもの研究所の近く(数キロ程度)にこのような会社があったことも幸いであった[同工場には、エンドミコプシス(*Endomycopsis*)属のグルコアミラーゼを自社生産(1960 年工業化)するために新設された大型の微生物培養装置と関連設備が備わっていた]。

参松工業(株)での工業化試験を基に、

発明(2)「酵素法によるぶどう糖から異性化糖の製造法」特願昭 40-51562(1965)(特許昭 45(1970)年 566452 号)

を出願した。

参松工業(株)での工業化成功のニュースは、私どもが、正式発表を予定していた「工業技術院発酵研究所 25 周年記念講演会(1965 年 10 月)」以前に漏れ、1965 年 8 月 2 日発行の日本経済新聞に、「・・・すでにぶどう糖製造業者(4 社)のほか、米国(3 社)、英国(1 社)から技術を使いたいとの申し出がある」と記載されており、発表以前に、海外にまで情報が伝わっていた。この記事が掲載された後も、国内外から多くの来訪者があった。このため、工業技術院は、上記 2 つの発明を、

発明(3)「グルコースイソメラーゼによるぶどう糖から異性化糖の製造法」

に統合し、世界 12 カ国(アメリカ、イギリス、フランス、ドイツ、ベルギー、オランダ、イタリア、スペイン、ポルトガル、スウェーデン、カナダ)に出願した。

6.2 アメリカへの技術移転

6.2.1 SBI, クリントン社への技術移転⁵⁶⁾

1965 年 7 月、参松工業(株)の頼富氏は、同社がクリントン社に派遣していた研究員に、異性化糖の工業化を知らせるとともに、クリントン社が関心があるなら参松千葉工場に招待したい旨の手紙を出した。これを受け、クリントン社は 1965 年 9 月、技術者を日本に派遣した。この時のいきさつについて、同社の E.K.Wardarip 氏が「IFT 年次総会(IFT Annual Meeting(1996))」で詳しく報告している⁴³⁾。

1965 年 10 月、工業技術院は、クリントン社の親会社である SBI 社とオプション契約を締結し、実施に向けた技術指導のため、技官 1 人(著者)を米国アイオワ州クリントンにあった同社研究所に派遣した(1965 年 11 月 30 日～1966 年 4 月 8 日)。

6.2.2 クリントン社での実情視察と実施契約の事前協議

1966 年 3 月、工業技術院は、クリントン社からの要請を受け、クリントン社での実情視察と本契約の事前協議のため、工業技術院研究業務課課長と工業技術院発酵研究所所長をクリントン社に派遣した。

6.2.3 実施契約の締結

同年 1966 年 10 月、工業技術院と SBI 社は、「再実施権付き独占的实施権契約」を締結した。ま

た、工業技術院は、SBI 社に対し、下記の関連発明とノウハウを提供した。

(1)「グルコースイソメラーゼの菌体固定とその利用法」³⁸⁾

特願昭 43(1968)-3434、特公昭 47(1972)-19030、微工研報告, No.37, p.31-37(1970)

(2)「グルコースイソメラーゼの抽出法」⁴⁰⁾

特願昭 42(1967)-43813、特公昭 45(1970)-9823、特許昭 45(1970)- 585185、微工研報告, No.7, p.23-30(1970)

(1)の「グルコースイソメラーゼの菌体固定化法」は、培養後の菌体を 60～85℃で短時間加熱することにより、酵素を菌体から漏れないようにするもので、当初の酵素の有効利用に欠かせない技術であった。現在も、培養後の培養液から菌体を濾過回収する場合や、菌体を酵素源とする固定化酵素を製造する場合などに実施されている。

(2)の「グルコースイソメラーゼの抽出法」は、微生物の自己消化能を利用して、微生物菌体からグルコースイソメラーゼを安価に、収量よく抽出する方法で、これにより、酵素が精製、結晶化され、DEAE-セルロースなどの担体に固定化した活性の高い「固定化酵素」が製造されている(担体は再利用される)。精製、結晶化したグルコースイソメラーゼを使用すると、単位重量(体積)当たり活性の大きい固定化酵素が製造できるため、反応装置が小型化できる。また、品質の高い糖液が製造できるため、反応後の糖液の精製コストを低減できるメリットがある。

6.2.4 米国での工業化

クリントン社は、1967 年に、バッチ(batch、回分)法で生産を始め⁴³⁾、1968 年 1 月、果糖含量 14%の「イソメロース 30 (Isomeroose 30)」⁴³⁾を約 4,500 トン販売している。その後、果糖分 42%の「イソメロース 100 (Isomeroose 100)」^{35,43)}が製造、販売された(約 5 万トン/1970 年)。1970 年、工場を増設し、1972 年から固定化酵素を用い、本格的な工業生産(30-40 万トン/年)を始めた⁵⁶⁾。その後、更に設備を増設している。

6.2.5 再実施契約

SBI 社は、1968 年、コーン・スターチのメーカーの、A.E.ステーレー社(A.E.Staley Co.)にサブライセンスを付与した(1972 年工業化)。その後、アメリカ国内数社にサブライセンスを付与したと言われている。

以上が、本技術がアメリカに輸出された経緯である。

6.3 欧州への技術移転

(1)工業技術院は 1969 年 8 月、当時、ヨーロッパで液状糖の過半数を抑えていた CPC インターナショナル社とオプション契約している⁵⁶⁾。また、1972 年には、ドイツの有力な医薬品会社(マイルス)カリ・ケミ社と契約した。この契約に基づき、著者はドイツ、ハノーバー近郊の(マイルス)カリ・ケミ社研究所に約 1 カ月滞在し、技術指導した。同社は 1972 年より、「OPTISWEET-P(MKC-Glucose Isomerase)」⁵⁷⁾名で酵素剤を販売し、ドイツ、ベルギー、フランスなどで異性化糖が製造販売された。

(2)工業技術院は、1985 年、フィンランドのフィン・シュガー社(Finish Sugar Co.)と、「澱粉からぶどう糖の収量を高めるプルラナーゼ技術」について実施契約している。なお、フィン・シュガー社は、

SBI 社から再実施契約により、グルコースイソメラーゼ技術を導入し、(再生可能な)DEAE-セルロースに結合させた固定化グルコースイソメラーゼ剤(結晶グルコースイソメラーゼを使用)を製造販売している。

6.4 その他外国における技術指導、講演等

著者は、上記の渡航も含め、グルコースイソメラーゼ、澱粉糖関連酵素の技術指導、講演と同研究についての動向調査のため、下記の日程で渡航した。

(1) 1965.11.30～1966.4.5 アメリカ合衆国

「グルコースイソメラーゼ製造法のオプション契約に伴う技術指導」のため、米国アイオワ州クリントンにあった、SBI 社の子会社、クリントン・コーン・プロセッシング・カンパニー(Clinton Corn Processing Company)を訪問し、技術指導した。

(2) 1968.8.21～1968.9.12 アメリカ合衆国ラトガー大学

「第3回国際発酵シンポジウム」に招待され、「*Streptomyces* 属グルコースイソメラーゼの工業化」について講演した。

〔(講演原稿)“*Streptomyces* Glucose Isomerase”, D. Perlman 編集, *Fermentation Advances*, Academic Press, New York, London, p.561-589(1969) 〕

(3) 1972.10.1～1972.10.29 ドイツ (マイルス)カリ・ケミ社

実施契約締結に伴うグルコースイソメラーゼの技術指導のため、同社研究所(ドイツ、ハノーバー)を訪問し技術指導した。この後、「グルコースイソメラーゼ研究の動向調査」のため、ベルギーのぶどう糖メーカー、グルコセリーズ・レニュー社と米国 SBI 本社ニューヨーク研究所を訪問した。

(4) 1975.11.19～1975.11.25 中国

「1975 年日本工業・技術展覧会」の技術交流講師として訪問し、「グルコースイソメラーゼによるぶどう糖から果糖の製造」について講演した。この後、中国科学院微生物研究所に招待され、訪問した。

(5) 1980.3.12～1980.3.25 ドイツ、ベルギー、英国

「マルトースの生産、利用研究の動向調査」のため、ドイツの(マイルス)カリ・ケミ社、ベルギーのグルコセリーズ・レニュー社などを訪問した。

(6) 1986.8.24～1986.8.30 フィンランド

「プルラナーゼの技術指導と調査」のためフィンランドのフィン・シュガー社を訪問した。

(7) 1987.6.1～1987.6.25 ドイツ

日独二国間協力に基づく日独生物酵素工学に関するワークショップ」の講師として、招待され、「新規澱粉関連酵素の開発」について講演した。

(8) 1988.1.4～1988.1.14 台湾

「日中発酵食品シンポジウム」に招待され、「澱粉関連酵素の開発」について講演した。

(9) 1988.3.1～1988.3.21 中国

中国科学院微生物研究所(北京)で「澱粉液化用耐熱性 α -アミラーゼを生産する微生物の分離」を実地指導した。その後、中国軽工業部食品発酵研究所(北京)と天津工業微生物研究所(天

津)に招待され、訪問した。

6.5 日本国内での技術移転

参松工業(株)が、世界で初めて工業化した1965年から数年間は、日本では参松工業(株)1社のみの生産であった。これは、工業技術院が、参松工業(株)の功績を認め、期限付きの優先実施権を与えたことにもあったかもしれないが、国内澱粉糖メーカーの中には、企業化のための設備投資のリスクを懸念した企業もあったと言われている⁵⁹⁾。しかし、アメリカでの工業化(1968年より販売、1972年から本格生産)のニュースが伝わると、以下の酵素メーカーが日本でグルコースイソメラーゼ剤の販売を始めた。

- (1) 長瀬産業(株)(農林省、通産省工業技術院と実施契約)、1971年より販売
- (2) ノボ社、1974年より販売
- (3) 合同酒精(株)(農林省、通産省工業技術院と実施契約)、1977年より販売

この酵素剤を購入した澱粉糖メーカーが、次々と異性化糖の生産をはじめ、1976年には、15,6社に達したと云われている⁶¹⁾。本技術は日本で開発された技術であるが、アメリカでの成功に触発され、アメリカに追従する形になったことを残念に思っている。

7. 果糖の利用研究 —マンノースイソメラーゼによる果糖からマンノースの製造—

マンノースイソメラーゼはマンノースと果糖の間を相互変換する酵素で、遊離の六炭糖(リン酸化していない六炭糖)間を異性化する最初の酵素として、細菌(*Pseudomonas saccharophila* F-1)に見出された⁶⁵⁾。

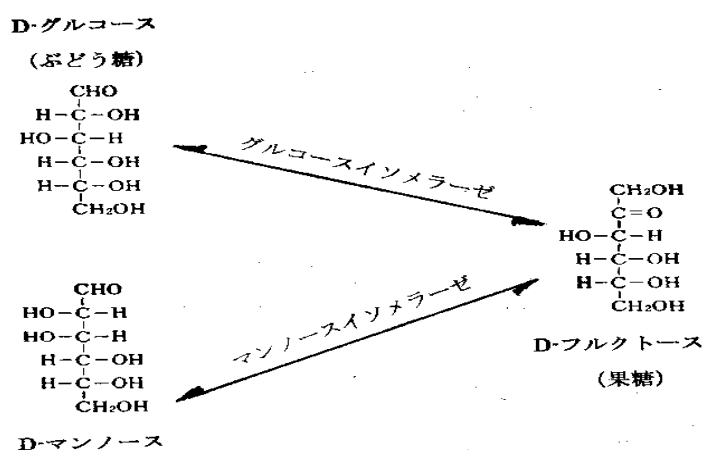


図 31 グルコース(ぶどう糖)、フルクトース(果糖)とマンノースの構造と相互変換

著者は、グルコースイソメラーゼを生産する微生物の検索過程で、マンノースイソメラーゼを生産する微生物、キサントモナス(*Xanthomonas*)属細菌^{30,66)}、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属放線菌^{67,70)}を分離し報告してきた。また、パラコロバクテリウム(*Palacolobacterium*)属細菌の生産するグルコース異性化酵素活性とマンノース異性化酵素活性を併せ持つ新規な異性化酵素^{29,30,68)}についても報告してきた。

マンノースは、生体の糖タンパク質の糖鎖を構成する糖として、生物機能の発現と伝達に重要な

役割をしているが、用途は限られ、試薬、医薬品の合成や、動物細胞の培養炭素源として、少量が使用されてきた。

著者は、1972 年に報告した亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフ法による各種糖類の分離研究(3.5.2 節)で、マンノースが他の糖に比べ、同樹脂に強固に結合する性質があることに興味を持ち、マンノースの利用について考え、検討してきた。また、グルコースイソメラーゼの開発により、ぶどう糖から安価に製造できるようになった果糖を原料として、マンノースイソメラーゼによりマンノースを製造する方法についても研究してきた(図 31)。

マンノースは、これまで、ゾウゲヤシ、アブラヤシなどに含まれるマンナンを加水分解して製造するか、モリブデン酸塩を触媒とし、ぶどう糖を高温下(70~130℃)で加熱して製造されてきた(収量約 30%、特公昭 57-38238)が、製造法が複雑で、収量も低く、高価な糖であることと、マンノースには苦味(図 38)があるという評価があったためか、製造法や用途開発の研究は殆どされてこなかった。最近になり、マンノースには、特有の有用な生理的機能があることが明らかになった(7.4 節で記載)。また、マンノースには、腐食防止剤、衣類軟化剤、洗剤ビルダー(洗浄力を高める)などの機能があると云われている。

一方、マンノースが還元(水素添加)されたマンニトール(マンニットともいう)は爽やかな甘味(甘味度は砂糖の 60~70%)があり、低カロリーであること、吸湿性がないことなどから、チューインガムやあめ類の粘着防止剤として、古くから使用されてきた。このほか、マンニトールには、医薬(利尿剤、賦形剤、増量剤、急性腎不全の予防と治療、脳圧降下剤、腸内菌叢の改善など)、食品素材(減塩甘味料、香味品、菓子類など)、化粧品(香粧品、湿潤剤、保水剤、洗剤ビルダーなど)、化成品(樹脂、可塑剤、乾式電解コンデンサー)など、多くの用途がある。マンニトールは海藻、キノコ、タマネギ、ニンジンなどに遊離の形で含まれているが、工業的には、砂糖の電解還元(米国特許 4029878、同 4713514、同 4083881)や、ぶどう糖をアルカリ性下で電解還元することにより製造されている。収量は、原料中の果糖含有量の最大 50%である(残りはソルビトールに還元される)。しかし、マンノースを原料にすれば、100%マンニトールに還元することができる。マンノースは、マンニトールの製造原料として、最も望ましい原料である。

7.1 酵素法による果糖からマンノースの製造

N.J.Palleroni 氏らが報告した *Pseudomonas saccharophila* F-1 のマンノースイソメラーゼ⁶⁵⁾、著者が報告してきた、*Xanthomonas* sp.S-48 (後に、*Xanthomona rubrilineans* S-48 と同定)のマンノースイソメラーゼ^{30,66)}と *Streptomyces aerocolorigenes* のマンノースイソメラーゼ^{67,71)}の最適温度は、いずれも、35~40℃にあり、熱安定性に劣っていた。このため、工業的使用に耐える熱安定性のマンノースイソメラーゼ生産菌の検索を行い、*Pseudomonas* sp.N-25 株^{62,69)}と *Agrobacterium* sp.M-1 株^{62,68,73)}と 同定した細菌を分離した。

図 32 は、*Xanthomonas* 属細菌、*Pseudomonas* sp. N-25 株と *Agrobacterium* sp.M-1 株の生産するマンノースイソメラーゼの最適 pH を示している。これらマンノースイソメラーゼの最適 pH は、いずれも pH8 付近にあるが、*Agrobacterium* sp.M-1 株生産するのマンノースイソメラーゼは、*Xanthomonas* sp.M-48 や、*Pseudomonas* sp.N-25 のマンノースイソメラーゼに比べ、広い pH 域で

作用する。この酵素は、*Agrobacterium* 属細菌に広く存在している酵素であることがわかった。

図 33 は *Pseudomonas* sp.N-25 株の生産するマンノースイソメラーゼの最適温度と熱安定性を示している。この酵素の最適温度は約 65℃に認められた。図 34 は *Agrobacterium* sp.M-1 株の生産するマンノースイソメラーゼの最適温度と熱安定性を示している。この酵素の最適温度は約 60℃に認められた。

マンノースイソメラーゼ反応の平衡は、マンノース/果糖＝約 25/75 にあり、温度の影響を受けない^{71,注 4 ②)}。このため、マンノースと果糖を含む糖液からマンノースを分離精製する方法とマンノースイソメラーゼ反応の平衡をマンノース側に移動させる方法について検討した。

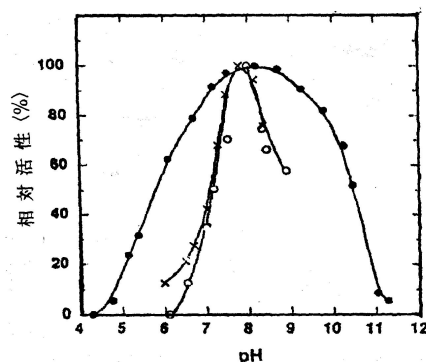


図 32 各種細菌の生産するマンノースイソメラーゼの最適 pH

反応液；酢酸緩衝液またはリン酸緩衝液 50 mM, マンノース 0.1 M, 30℃, 30 分反応。

×; *Xanthomonas* sp.M-48, ○; *Pseudomonas* sp.N-25, ●; *Agrobacterium* sp.M-1.

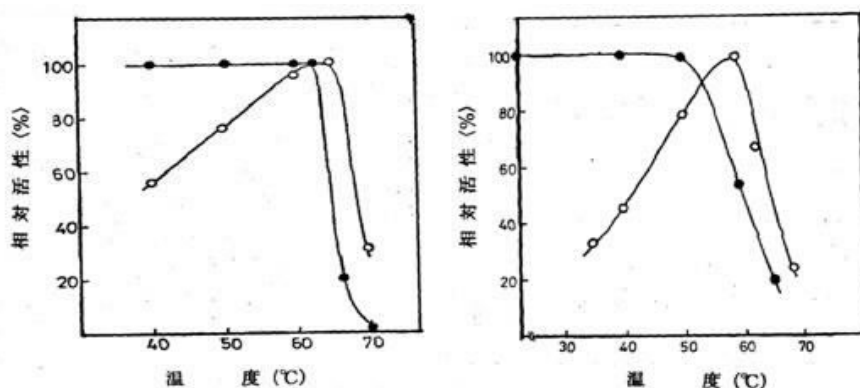


図 33 (上図右) *Pseudomonas* sp.N-25 株マンノースイソメラーゼの最適温度と熱安定性

反応液(最適温度); リン酸緩衝液(pH7.0) 50 mM, マンノース 0.1 M, 全量 0.4 ml, 30 分反応。

反応液(熱安定性); リン酸緩衝液(pH7.0) 50 mM, 全量 0.2 ml, 各温度で 10 分加熱後残存活性測定。

○; 最適温度, ●; 熱安定性

図 34 (上図左) *Agrobacterium* sp.M-1 株マンノースイソメラーゼの最適温度と熱安定性

反応液(最適温度); トリス緩衝液(pH7.0) 50 mM, マンノース 0.1 M, 全量 0.2 ml, 10 分反応。

反応液(熱安定性); トリス緩衝液(pH7.0) 50 mM, 全量 0.2 ml, 各温度 10 分加熱後残存活性測定。

○; 最適温度, ●; 熱安定性

7.2 マンノースの分離精製

マンノース約 20～25%と果糖約 75～80%を含む反応液からマンノースの分離、精製法について検討し、カルシウム型陽イオン交換樹脂または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂カラムを用いる液体クロマトグラフ法により分離することができた。特に亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂カラムは分離性が良好で、マンノースを高純度で分離できることができた。

7.3 マンノースイソメラーゼ反応の平衡移動

(1) 硫黄酸素酸化合物による平衡移動

マンノースイソメラーゼ反応の平衡は、還元性のイオウ酸素酸化合物(例えば、メタ重亜硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩など)の存在下、あるいはこれらの交換基をもつ陰イオン交換樹脂の存在下で反応することにより、平衡をマンノース側に移動できることを認めた⁷³⁾。なかでも、メタ重亜硫酸ナトリウムがよく、最適条件で果糖の約 80～85%をマンノースに異性化することができた^{62,73)}。反応後の反応液中のマンノースと塩は、前記の亜硫酸型または亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂カラムを使用する液体クロマトグラフ法により分離することができる。

(2) アンモニウム化合物による平衡移動

亜硫酸塩の代わりに、アンモニウム塩やアミン化合物を存在させても、果糖側からマンノース側に平衡を移動させることができる。果糖からマンノースへの変換率は、使用するアンモニウム塩の種類にもよるが、炭酸アンモニウムを使用した場合、果糖の約 85%をマンノースに異性化すること

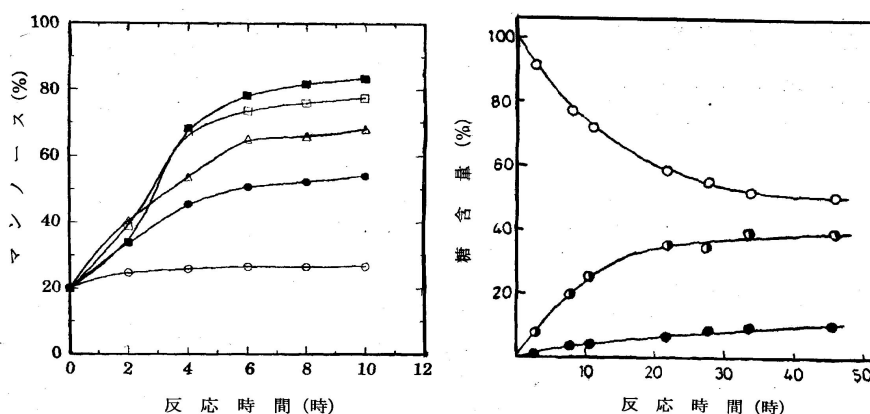


図 35 (上図左) 炭酸アンモニウム存在下でのマンノースイソメラーゼ反応

反応： 基質(果糖 80%, マンノース 20%からなる混合糖液) 160mg, 炭酸アンモニウム 0-400mg/ml, マンノースイソメラーゼ 2.8 単位, 全量 1.0 ml, 45℃で反応.

○; 対照 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 0 mg/ml, ●; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 100 mg/ml, △; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 200 mg/ml, □; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 300 mg/ml, ■; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 400 mg/ml

図 36 (上図右) マンノースイソメラーゼとグルコースイソメラーゼを用いたぶどう糖からマンノースの生産

反応： トリス緩衝液(pH7.0) 50 mM, MgSO_4 10 mM, マンノースイソメラーゼ 0.3 単位, ぶどう糖 300 mg, グルコースイソメラーゼ 0.15 単位, 全量 1 ml, 50℃で反応.

○; ぶどう糖, ①; 果糖, ●; マンノース

ができた^{62,73)}(図 35)。反応後、反応液中のアンモニウム塩は、反応液を減圧下で加熱濃縮することにより、糖と分離することができる⁷³⁾。

7.4 固定化マンノースイソメラーゼによるマンノースの連続生産

マンノースイソメラーゼを含む菌体をキトサンで包括固定し、果糖を基質として連続異性化反応を行ったところ、固定化マンノースイソメラーゼは長期間にわたり使用できることを認めた。現在、同固定化酵素の半減期は、55℃で反応した場合、約 12 カ月、60℃で反応した場合、約 3 カ月の結果を得ており⁶²⁾、更なる改良も可能であるので、マンノースイソメラーゼは固定化して、有効利用することができる。

7.5 マンノースイソメラーゼとグルコースイソメラーゼによるぶどう糖からマンノースの生産

図 36 は、30%のぶどう糖を基質とし、グルコースイソメラーゼとマンノースイソメラーゼを併用して異性化反応を行った結果を示している。平衡時の糖組成は、ぶどう糖約 50%、果糖約 38%とマンノース約 12%であった^{62,69)}。これら数値はグルコースイソメラーゼ反応の平衡値とマンノースイソメラーゼ反応の平衡値から推測できる数値と一致している。また、マンノースイソメラーゼ反応は高濃度のぶどう糖により阻害されないこと、グルコースイソメラーゼ反応は高濃度のマンノースによって阻害されないことを確認している。

上記の実験では、反応後の糖液中のマンノース含量は少ないが、マンノースは少量で特有の機能を示すことと、ぶどう糖と果糖が存在することにより呈味は改善されるので、飼料への添加、食品の呈味改善、医薬など、分野により好都合な場合もあると思っている。

固定化マンノースイソメラーゼと固定化グルコースイソメラーゼを充填したカラムを使用し、生成したマンノースをマンノースの捕捉剤を充填したカラムで反応系外に除去しながら連続反応をすることも可能であり、マンノースは、ぶどう糖から果糖を製造するのと同様に、容易に、また、安価に製造できると思っている。

8. 考察

8.1 ぶどう糖を果糖に変換する酵素について

ぶどう糖から甘味の強い果糖をつくる研究の歴史は古く、様々な方法が検討されてきた(2.3 節)。糖は、一般に不安定な物質で、特に、熱やアルカリに弱いため、アルカリ法によるぶどう糖から果糖への変換法は、すでに百年を越える歴史があるが、ぶどう糖から果糖への変換率が低いこと、糖の損失があること、呈味を損なう物質が生成するなどの理由から、未だ工業化されていない。酵素法は、アルカリ法に比べれば、おだやかな条件で反応できるため、糖の変換(異性化)法としては好ましいが、遊離のぶどう糖(リン酸が付いていないぶどう糖)を異性化する酵素は知られていなかった。

1957 年、Marshall と Kooi 氏は、キシロースを入れた培地で培養したシュードモナス・ヒドロフィラ(*Pseudomonas hydrophila*)の菌体(または、菌体破砕物)が、砒素化合物を用いた緩衝液(pH8.0)の下で、ぶどう糖が果糖に変換するのを認め報告した。この報告は、1 頁足らずの短いものであったが、当時、この種の研究を考えていた日本人研究者の注目するところとなり、この報告の後、数

年間に発表された報告は、全て日本からのものであった。

1961 年、津村氏らは、キシロースを添加した培地で培養したエーロバクター・クロアカ (*Aerobacter cloacae*) KN-69 の菌体が、砒酸塩の存在でぶどう糖を果糖に変換することを報告した¹²⁾。1963 年、名武氏らは、キシロースを添加した培地で培養したエーロバクター・エーロゲネス (*Aerobacter aerogenes*) HN-56 の菌体が、砒酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換することを報告し¹³⁾、そして、1964 年、名武氏らは、キシロースを含む培地で培養したエッシャーリア・インターメディア (*Escherichia intermedia*) HN-500 の菌体が、砒酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換することを報告した¹⁴⁾。これらの報告で使用された微生物は、Marshall 氏らが使用した微生物とは違っていたが、これらの報告により、Marshall 氏らの研究は実証されたものと思われた。

1968 年に、名武氏らは、*Escherichia intermedia* HN-500 のぶどう糖異性化酵素は、グルコース-6-リン酸とフラクトース-6-リン酸の間を相互変換するホスホグルコースイソメラーゼ (Phosphoglucose isomerase) であることを明らかにした¹⁵⁾。これと同じ機作によると思われる研究が、酵母、プルラリア (*Pullularia*) などの微生物を用いて報告されている⁶⁰⁾。

ホスホグルコースイソメラーゼは、ぶどう糖の代謝経路、EMP (Embden-Mayerhoff Parnas) 経路に係る重要な酵素の一つであり、生物には普遍的に備わっている酵素 (構成酵素という) であるので、キシロースのみによって生産されることはない。津村氏らは、*Aerobacter cloacae* KN-69 のぶどう糖異性化酵素はキシロースを添加した培地だけでなく、ぶどう糖あるいは果糖を添加した培地でも生産されると報告している。また、名武氏らは *Aerobacter aerogenes* HN-56 のぶどう糖異性化酵素は、キシロース以外に、マンノース、マンニトールや、乳酸によっても生産されると報告している。しかし、Marshall 氏らは、*Pseudomonas hydrophila* のぶどう糖異性化酵素はキシロース以外の炭素源、ぶどう糖、果糖やマルトースでは生産されないと報告している。更に、Marshall 氏らのぶどう糖異性化酵素は、ホスホグルコースイソメラーゼには必要ないマグネシウムイオンあるいはマンガンイオンを必要とし、最適 pH は 8.5、最適温度は 42~43℃にあると報告している。これらの記述からは、*Pseudomonas hydrophila* の酵素は、Marshall 氏らが述べているように、キシロースイソメラーゼであるかも知れないが、ぶどう糖から果糖への変換に、菌体 (または菌体の破砕物) を使用し、反応に際し、砒酸塩を存在させ、反応の pH が約 8、反応温度が 40℃という条件から考えると、ホスホグルコースイソメラーゼによるぶどう糖から果糖の生成経路が働いていてもおかしくない。いずれにしても、酵素を精製してみなければはっきりしないことであるが、我々は、Marshall 氏らの研究報告を読み、食品加工上、問題のある砒酸塩が使用されていたことに戸惑いながらも、砒酸塩がぶどう糖から果糖への変換に必要なものと勘違いし、研究してきたのかも知れない。しかし、これにより、思いがけず、学術的な成果が得られたことになる。

8.2 耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼと耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの開発

グルコースイソメラーゼ反応は可逆反応で、反応の平衡は温度の影響を受け、反応温度が高くなるに従い、果糖側に移行する⁴⁵⁾。通常の工業的な反応温度 60℃では、ぶどう糖の約半分が果糖に変換するので、ぶどう糖から転化糖と同じ組成のものが製造できるが、糖、特に果糖は、アルカリや、熱に弱く、分解して有機酸や褐色物質を生成するので、糖液の精製にコストがかかり、製品の

風味も悪くなる。このため、現在、ぶどう糖の約 45%が果糖に変換したところで反応を止め、カルシウム型陽イオン交換樹脂塔を用いるクロマトグラフ法により、果糖(90%)画分とぶどう糖画分に分割し、果糖画分を、前述の果糖約 45%の異性化糖(ぶどう糖果糖液糖)と混合することにより、製品の果糖含量を約 55%まで高めている。しかし、このぶどう糖と果糖の分離工程は、これまでの澱粉糖の製造工程からは異質で面倒な操作を必要とし、装置も高価である。このため、「ぶどう糖果糖液糖 (HFCS42)」は製造している、「果糖ぶどう糖液糖 (HFCS55)」は製造していないところもある。異性化糖製造の技術が世界的に発展し、普及するためには、クロマトグラフ式果糖分離法に代わる、新しい技術が必要であると思っている。その方法として挙げられるのは、「より耐酸性と耐熱性を持つグルコースイソメラーゼの開発」であり、もう一つは、「ぶどう糖と果糖を分離できる膜の開発」である。後者については、著者の専門外で、可能性について何とも言えないが、より耐酸性と耐熱性をもつグルコースイソメラーゼについては、著者は、長年、微生物の検索を行ってきた。また、トウモロコシ澱粉の液化工程と液化澱粉の糖化工程の簡素化と能率化のため、耐酸性と耐熱性をもつ α -アミラーゼについても、微生物の検索を行ってきた。

(1) 耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼの開発

(i) これまでのところ、酸性側に最適 pH を持つグルコースイソメラーゼは検索できていない(おそらく存在しないと思っている)が、グルコースイソメラーゼは酸性域で「可逆的な酸化失活」をおこすことがわかった^{62,63,73)}。グルコースイソメラーゼの基質であり、還元性物質でもあるぶどう糖と、反応中の着色を防止するため、通常、添加されている亜硫酸塩は、酸性下でおこる同酵素の「可逆的な酸化失活」を防止する(表 13)が、更に、同酵素の酸性下での安定性を高めるため、空気との接触が少ない固定化酵素を用い、連続異性化反応により検証した。

培養後のグルコースイソメラーゼを含む菌体を熱固定化して後、ゼラチンとグルタルアルデヒドで包括固定した酵素(図 23A)を用い、基質として、亜硫酸水素ナトリウムを 0.1%量添加した 40%濃度のぶどう糖液を、pH を 4.5、5.0、6.0 と 7.0 に変化させて、60℃で反応を行った。その結果、pH5.0 でも、最大活性(pH7.0)の約 75%の活性が認められ、実験した 30 日間、活性の低下は認められなかった。また、pH4.5 では、最大活性(pH7.0)の約 67%の活性が認められ(図 22、曲線-■-)、実験した 20 日間、活性の低下は認められなかった(図 23B)。Streptomyces sp.T-17 のグルコースイソメラーゼは pH4.0~11 の広い範囲で安定であることから、図 22 の(-■-)から推測した同酵素の pH4.0 での活性値は、最大活性の約 60%であった。

Streptomyces rubisinosus(YT-5)とStreptomyces sp.T-17のグルコースイソメラーゼは、いずれも分子量約43,000のサブユニット(酸化還元に係るアミノ酸として、システイン1残基とメチオニン8残基を含む)4つからなる四次構造のタンパク質である。この酵素が酸性下で「可逆的な酸化失活」をおこす原因として、まず、サブユニットの解離が考えられる。このことを考慮し、①酵素の固定化法(架橋による酵素の修飾、還元性物質を含む酵素の固定化法など)の開発、②空気との接触を断つ嫌気的な反応装置の開発、③反応方法の改善(基質濃度、還元剤、金属イオン、通液方法など)により、酸性下でのぶどう糖の異性化は、より実現性のあるものになるだろうと思っている。例えば、上記の①について、陰イオン交換樹脂で包括固定した固定化酵素(図23B)よりも、ゼラチン(ある

いはアルブミン)とグルタルアルデヒドで包括固定化した酵素(図23A)の方が酸性域でより大きい活性を示したこと、②の反応装置については、回分式反応より、空気との接触が断てる連続式反応の方が酸性域で酵素はより大きい活性を示したこと、③の反応方法の改善については、ぶどう糖濃度は40%より50%の方が酵素の活性はより安定化されること、そして、脱気による基質(ぶどう糖)液中の溶存酸素の除去や、液相と気相の接触がある場合には、トルエンを重層することによる効果も認めている。また、反応液に、鉄イオン(Fe^{2+})などの無機塩を存在させることによっても、酸性域での酵素の活性が安定化されることを認めている。

以上の検討により、*Streptomyces* sp.T-17のグルコースイソメラーゼは、pH5.0で、最大活性値(pH7.0)の80%の活性値を示すことを認めている。しかし、この酵素が、pH5.0で、最大どれほどの活性があるのか、今のところ明らかでない。

現在、グルコースイソメラーゼは、*Streptomyces*属菌以外に、*Lactobacillus*属、*Bacillus*属、*Brevibacterium*属、*Arthrobacter*属など多くの属種のもが報告されている。これら酵素の最適pHは、いずれも7～8にあり、pH5.0での活性値は、*Lactobacillus brevis*のグルコースイソメラーゼが最大活性値(pH7.0)の約52%の活性がある¹⁶⁾以外は、すべて、2～10%程度の活性しかない³²⁾。酸性域でおこるグルコースイソメラーゼの「可逆的な酸化失活」は、微生物の属種にかかわらず、グルコースイソメラーゼが持つ共通の性質であると思っている。

(ii) *Streptomyces* sp.T-17 株のグルコースイソメラーゼは熱安定性にも優れているため、この酵素を用い、果糖とぶどう糖の混合糖液(果糖/ぶどう糖=40%/60%、濃度約 40%)を基質として、温度 60～90℃の温度で反応を行い、平衡時の糖組成と平衡定数を求めた(表 18)。この値を用い、DE^{注7)} 96～99 の澱粉酵素糖化液を使用したときに得られると予想される異性化糖の果糖含量を算出し、表 18 に示した。

表 18 60～90℃の各温度での平衡定数から算出した、澱粉酵素糖化液
(DE96～99)を原料とする異性化糖中の果糖含量(推定)

反 応 温 度(℃)	平衡定数 (F/G)	果糖含量 (%)	各 DE 澱粉糖化液を用いた異性化糖の果糖含有量 (推定)			
			DE 99	DE 98	DE 97	DE 96
60	1.09	52.1	51.6	51.1	50.5	50.0
70	1.20	54.0	53.5	52.9	52.4	51.8
80	1.25	55.6	55.0	54.5	53.9	53.4
85	1.30	56.5	55.9	55.4	54.8	54.2
90	1.35	57.4	56.9	56.3	55.7	55.1

この結果は、(純)ぶどう糖あるいは DE99 の澱粉糖化液が原料ならば、80℃の温度で反応することにより、「クロマトグラフ法による糖分離工程」を省略して、「果糖 55%異性化糖(HFCS55)」の製造は可能であることを示している。しかし、DE98 の澱粉糖化液が原料の場合は、最低 85℃の温度で反応する必要がある、また、DE96～97 の澱粉糖化液が原料の場合は、90℃以上の温度で反応する必要があることを示している。この酵素は 90℃以上の温度でも反応するが、この実験条件

(pH7.0)では、約 85℃を越える温度付近から、生成した果糖の熱分解による減少が大きくなるため、実用的でないと考え、実験していない。90℃を越える高温での異性化反応は酸性域でなければならないと思っている。澱粉酵素糖化液を、果糖 55%異性化糖(HFCS55)製造の原料にする場合には、高い DE(98~99)の澱粉糖化液が得られるような澱粉原料の選択や、澱粉糖化法の検討も必要になるかもしれない。また、澱粉糖化液は、ぶどう糖の一部を果糖に異性化した後、グルコアミラーゼを作用させることにより、残存するオリゴ糖がぶどう糖に分解されることを認めているので、前記の固定化耐酸・耐熱性のグルコースイソメラーゼと併用できる耐熱性グルコアミラーゼ(あるいは、 α -グルコシダーゼ)の開発についても検討する必要もあるかも知れない。

(2) 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの開発

耐酸性と耐熱性をもつ α -アミラーゼとして、新たに分離し、*Bacillus licheniformis* α 2と同定した細菌の α -アミラーゼは、国内で工業的に使用されている 3 種の澱粉液化酵素に比べ、pH4~11の広い pH 域で作用し、最適 pH は 4.5~5.0 の酸性側にある(図 26)。この酵素を用い、工業的な澱粉液化条件に準じて、トウモロコシ澱粉の液化を行ったところ、工業的に使用されている *Aspergillus niger* グルコアミラーゼの最適 pH である、pH4.5~5.0⁸⁴⁾でもトウモロコシ澱粉を液化することができた(図 30)^{61-63,73)}。

図 37 は、*Bacillus licheniformis* α 2 の耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* のグルコアミラーゼと *Streptomyces* sp.T-17 株の耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼの、pH4~7 の酸性域での活性を示している。同図で背景の色を変えて示している、pH4.5~5.5 の範囲、なかでも、pH4.5~5.0 は、トウモロコシ澱粉乳の pH4.0~4.7 (pH4.5~5.0 とも云われている)の範囲にあり、*Bacillus licheniformis* α 2 の α -アミラーゼと *Aspergillus niger* グルコアミラーゼの両酵素の最適 pH 値でもある。そして、*Streptomyces* sp.T-17 のグルコースイソメラーゼについては、最大活性の 80%以上の活性が見込める pH である。

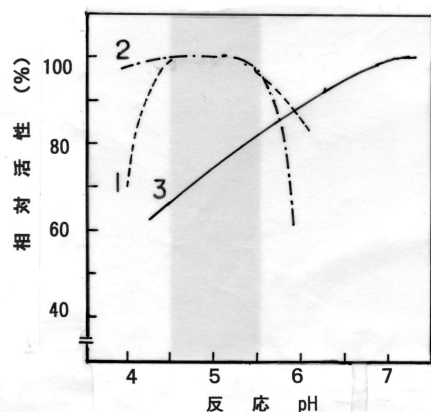


図 37 *Bacillus licheniformis* α 2 株の α -アミラーゼ、*Aspergillus.niger* のグルコアミラーゼと *Streptomyces* sp.T-17 株のグルコースイソメラーゼの作用 pH

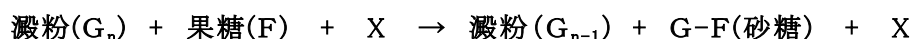
- 1; *Bacillus licheniformis* α 2 の耐酸性 α -アミラーゼ(図26より),
- 2; *Aspergillus niger* のグルコアミラーゼ⁸⁴⁾ (市販品),
- 3; *Streptomyces* sp.T-17の耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼ(固定化酵素,図22より).

以上から、新たに開発した耐酸性と耐熱性 *Bacillus licheniformis* α 2 の α-アミラーゼと *Streptomyces* sp.T-17 のグルコースイソメラーゼの 2 つの酵素と既存の *Aspergillus niger* のグルコアミラーゼの 3 つの酵素を、pH4.5~5 前後で用いることにより、これまで、トウモロコシ澱粉から異性化糖の製造に際し、「トウモロコシ澱粉の液化」、「液化澱粉の糖化」と「澱粉糖化液の異性化」の 3 つの工程で、工程毎に行われている大きな pH 変動を伴う pH 調整を省略して、澱粉から異性化糖の製造が、より能率的に、また経済的に行えるようになると思っている。

8.3 砂糖の合成につて

著者が、この研究を行った最終目標は、需要の多くを輸入に依存してきた砂糖を、日本で豊富に生産されていたサツマイモ澱粉から製造することであった。そして、その前段階として、澱粉から、砂糖と同等の甘味をもつ異性化糖「果糖ぶどう糖液糖(HFCS55)」が、砂糖よりも安価に製造できるようになり、また、砂糖よりも甘い(結晶)果糖も澱粉から安価に大量生産できるようになった。この技術が工業化されてから、すでに 50 年が経過した。この間、日本の社会情勢は大きく変化し、かつては資源として日本に豊富にあったサツマイモは輸入トウモロコシに取って代わった。その上、この技術により、生産される異性化糖は、砂糖より安価で、輸送や、貯蔵、消費面での利便性が認められるようになったため、コストをかけてまで砂糖を合成する意義は無くなったようにも思っている。しかし、砂糖は「甘味の王様」と言われているように、甘味の質は、果糖や異性化糖よりも優れ、まろやかである。このため、砂糖を混合した異性化糖「砂糖混合ぶどう糖果糖液糖」(日本農林規格)や、「砂糖混合果糖ぶどう糖液糖」(日本農林規格)が製造され、販売されている。異性化糖に混合している程度の砂糖(5%程度)を、異性化糖メーカーで製造できるならば、砂糖合成研究の意義はあるかもしれない。

砂糖の合成法として、著者は、



を想定し、時間があるときに微生物の検索を行ってきたが、見込みを立てることはできなかった。

8.4 マンノースイソメラーゼによる果糖からマンノースの製造について

著者のマンノースイソメラーゼ研究は、当初、グルコースイソメラーゼ生産菌の探索に行き詰っていた時の逃げ道として行ったものであったが、その後、グルコースイソメラーゼが開発(1965.7 工業化)でき、この酵素の工業化を更に進展させる過程で、製品の果糖含量を高める方法を考えなければならなくなった(表 15)。このための方法として、グルコースイソメラーゼ反応の平衡を果糖側に移動させる研究(3.4.2 節)⁴⁷⁾や、クロマトグラフ法による果糖とぶどう糖の分離の研究を行ってきた。この研究の過程で開発した亜硫酸水素型または亜硫酸型陰イオン交換樹脂を充填剤として使用するぶどう糖と果糖の分離の研究(3.5.2 節)(1970-1973 年)^{52,83)}で、マンノースがこの樹脂に強固に結合する性質があることに興味を持ち、他の化合物にも範囲を広げて調べたところ、亜硫酸水素塩のほか、亜硫酸塩、メタ重亜硫酸塩、アンモニウム塩やアミン化合物などに対しても親和性があることを認め、マンノースは、食品(呈味改善)、洗浄、殺菌、除菌、研磨、環境など広い分野で利用できるのではないかと考えた。このうち、食品の呈味改善のためのマンノースの利用については、コーヒー、紅茶、トマトジュース、ヨーグルト、醤油、パルスweetなど 9 種類の食品と調味料につい

て、マンノースを 0.2～5%を添加して行った官能試験(パネラー8～12 人)で、全ての食品で差が出る事が認められ、苦味が減った、甘味が増した、刺激味が消えた、こく味が増した、などの評価が得られた。また、マンノースには、生薬、合成医薬の苦味を減少し、味をまろやかにする効果があることも認められている⁸²⁾。

1989 年、A.B.Oyofa 氏らは、マンノースには、ニワトリが感染した腸内サルモネラ菌の生育を阻止する作用があることを報告した⁸¹⁾。この後、マンノースのほか、マンノースの重合体(マンナン)を部分分解して得られるマンノースからなるオリゴ糖(マンノオリゴ糖)にも同様の機能があることが報告され、動物の飼料や飲料水への添加が検討されるようになった。

最近、マンノースは、ヒトの腎臓、膀胱、尿路で感染した大腸菌などの有害細菌の定着を防ぎ、これらと結合して、尿として体外に排出することにより、腎臓、膀胱、尿路の機能を改善する効果があることが報告され、注目されている。日本でも、クランベリー(米国産)や、ハックスベリー、コケモモ(欧州産)などから採取されたとされるマンノースを封入したカプセル剤が輸入され、サプリメントとして市販されている。

マンノースについて、上記の腸内菌叢の改善のほか、マクロファージを活性化し、侵入した細菌を捕食する、リンパ球のT細胞や、B細胞を活性化する、乳がん細胞の増殖を抑制する、白内障や糖尿病の進行を抑制する、などの機能もあると云われている。また、悪玉細胞の表面に吸着する性質を利用し、動脈硬化の早期発見と治療のペット検査薬として利用する報告もある。マンノースは、ヒトが過剰に摂取しても、一部が糖鎖の合成に利用される以外は、吸収されることなく、尿として体外に排出されるため、害はなく、インシュリンの分泌を刺激したり、インシュリンを消費することもないと云われている。マンノースがもつ、これらの機能は、A.B.Oyofa 氏らが報告した機能と関連したものであり、また、著者が関心を持ってきた、マンノースがもつ様々な物質と結合する機能とも関連していると思っている。

マンノースがもつ、様々な物質や微生物と強固に結合する機構は明らかでないが、図 38 に示しているマンノースの構造から、マンノース分子の C₁ 位での付加反応以外に、不斉炭素、C₂ 位と C₃ 位の水酸基(OH 基)が、シス(cis)位(同じ向きにある)に配位していることによる強固な水素結合の形成にあるのではないかと考えている。マンノースは小さな分子で構造も簡単な物質であるが、今後も新しい有用な機能の発見が期待される注目すべき糖である。

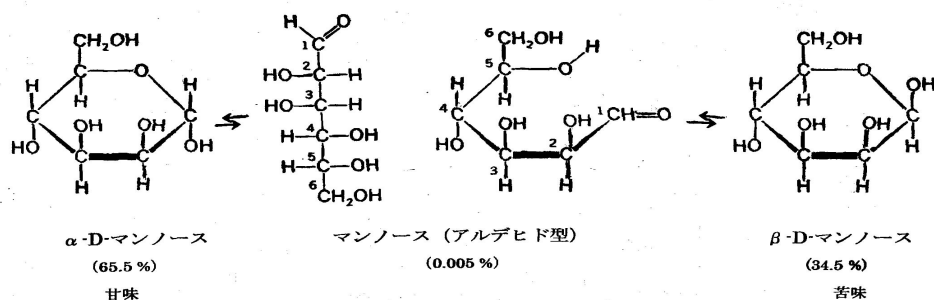


図 38 マンノースの構造(α -D-マンノースと β -D-マンノース)

図 38 に示しているように、 α -D-マンノースは甘味があるが、 β -D-マンノースには苦味があると

云われている。市販の試薬マンノース(α 型と β 型の混合物)もわずかに苦味があるが、それほど強い苦味ではなく、他の呈味物質と共存できる苦味、共存することにより、よりよい効果⁸²⁾を期待させる苦味かも知れないと思っている。これまで、マンノースについて、用途研究は殆どされてこなかったために、これを安価に大量生産する研究はされてこなかった。

著者は、微生物の生産する酵素マンノースイソメラーゼを用いて、果糖から、あるいは、マンノースイソメラーゼとグルコースイソメラーゼを用いて、ぶどう糖からマンノースを製造することを考え、工業的使用に耐える熱に安定なマンノースイソメラーゼ生産菌の検索を行い、*Pseudomonas* sp.M-1^{62,69)}と *Agrobacterium radiobacter*^{30,62,66,73,84)}を分離し、これらの酵素を用いる果糖からマンノースの製造法について報告し、提案した。

9. まとめ

長年、望まれながら、実現できなかった、ぶどう糖から果糖の製造が、キシラン資化能を持つ *Streptomyces* 属放線菌を、安価なキシラン含有培地で培養することにより、グルコースイソメラーゼが、はじめて、安価に大量生産できるようになり、これを用いて、澱粉から転化糖や砂糖と同等の組成と甘味をもつ、ぶどう糖と果糖からなる「異性化糖」が誕生した。現在、澱粉から異性化糖の製造は、下記の3つの工程により行われている。

(1)バチルス(*Bacillus*)属細菌の生産する耐熱性の α -アミラーゼ、アスペルギルス(*Aspergillus*)属カビの生産するグルコアミラーゼとバチルス属細菌の生産するプルラナーゼの3つの酵素を用い、澱粉から96~97%の収量でぶどう糖を製造する。

(2)固定化したグルコースイソメラーゼを用い、連続的に、ぶどう糖の約45%を果糖に変換(異性化)する。得られる、果糖含量約42%の液糖(原料である澱粉糖化液には、分解できないオリゴ糖が含まれているため、異性化率45%は、果糖分約42%ということになる)は、日本では、「ぶどう糖果糖液糖」(米国では、HFCS42)と呼ばれている。

(3)ぶどう糖果糖液糖を、カルシューム型陽イオン交換樹脂を充填した連続式のクロマトグラフ分離装置で、「果糖分90%の糖液」(日本農林規格の「果糖90%異性化糖」)と「オリゴ糖を含むぶどう糖液」に分割され、「果糖分90%の糖液」と、上記(2)で得られる「ぶどう糖果糖液糖」を混合して、果糖含量55%の「果糖ぶどう糖液糖」(米国では、HFCS55)が製造されている。「果糖ぶどう糖液糖」は、砂糖や転化糖と同等の成分であり、同等の甘味がある。同時に分離される「オリゴ糖を含むぶどう糖液」は、濃縮後、再異性化される。

異性化糖の製造技術は、1965年7月、日本の参松工業(株)千葉工場で、世界で初めて、工業化された。当初は、果糖分42%程度の、今でいう、「ぶどう糖果糖液糖」製品のみであったため、砂糖に比べると甘味度が少し劣っていた(約90~95%)こと、冬場あるいは貯蔵中にぶどう糖が析出して、濁りを生じたり、製品が固化するトラブルがあり、日本での生産量はしばらく伸びなかったが、クロマトグラフ法によるぶどう糖と果糖の分離により、果糖含量が高く、砂糖と同等の甘味をもつ異性化糖「果糖ぶどう糖液糖」が砂糖よりも安価に大量生産できるようになった(1977年)こと、1966年、独占的实施権を付与した米国企業SBI(Standard Brand Incorporated)社、現在、Nabisco社の

Clinton Corn Processing Co.でも工業生産が始まった(1967 年製造、1968 年 1 月販売)こと、そして、1971 年には、日本でも酵素(グルコースイソメラーゼ)剤が販売されたことなどから、参入する企業が増え、異性化糖の生産量が急速に伸びた。公表されている資料によると、平成 22 年(2010 年)度の日本での異性化糖の生産量は、89.9 万トン。うち、「ぶどう糖果糖液糖」19.2 万トン、「果糖ぶどう糖液糖」が 67.2 万トン、「高果糖液糖」が 3.6 万トンである(以上、固形分換算)。この他、異性化糖に砂糖を数%混合した「砂糖混合異性化糖」が、16.8 万トン製造されていて、日本で消費する全甘味料の約 3 割を占めている。

異性化糖は、液状で、輸送、取扱等の利便性から大量消費の分野(飲料、製パン、製菓、調味料など)は勿論、広い分野で使用されていて、価格も安い(砂糖の7~8 割程度)。しかし、異性化糖は粉末化が難しいため、家庭では、容器(費)の問題や、習慣から、使われていない。今後の課題である。

ぶどう糖から果糖が安価に製造できるようになったため、果糖の、甘味料以外の用途として、マンノースイソメラーゼを用いるマンノースの製造法について研究し、その概要を記した。(以上は、1961 年から2000 年までの40 年間にわたり、著者が行ってきた表題の研究と、この研究に関連して行った研究をまとめたものである。)

10. 謝辞

通商産業省工業技術院には、本技術について、数多くの国内特許出願は勿論、外国出願についても、迅速に対応して戴いたことより、日本はもとより、海外での評価も高めて戴くことになりました。当時工業技術院研究業務課、総務課、会計課、成果普及対策室など、ご担当頂いた方々に感謝申し上げます。

著者は、元工業技術院発酵研究所(微生物工業技術研究所)に在職中、数多くの特許出願をし、当該研究だけでも、100 件を超える出願をしたと思っています。当時は充実した担当部局もないなか、同研究所企画室の坂 光氏には、特許出願の手続き、答弁書の作成などで、多大のご迷惑とご苦勞をお掛けしたが、いつも快く、また迅速に対応して頂きました。また、同研究所庶務課の相川せつさんには、このための数多くの書類のタイプ打ち(当時は和文タイプライターを使用されていた)を快く、また迅速に対応して頂きました。ご両氏に感謝申し上げます。

本著で取り上げた、耐熱性マンノースイソメラーゼ、耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼと耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの研究は、著者が転籍した宮崎大学でも引き続いて行ないました。ご指導とご支援を戴いた今田清久名誉教授、林 幸男教授、横井春比古教授と広瀬 遵准教授に感謝申し上げます。また、当時、学生として本研究の推進にご尽力戴いた方々に感謝申し上げます。

11. 参考文献、注

- (1) 頼富憲三郎, 澱粉科学, Vol.27, No.4, p.271(1980).
- (2) 高崎義幸, 工業技術院微生物工業技術研究所ニュース, 65 号, 7月号(1986).
- (3) (G_1 関係発明, 国内出願)発明の名称「グルコースの増収方法」ほか〔特公昭 57(1982)-39,

- 特公昭 57(1982)-14159, 特許 昭 54(1979)-100375 号, 特許昭 56(1981)-14159 号, 特許昭 60 (1985)-1268346 号, 特許昭 58(1983)- 101477 号, 特許昭 60(1985)-27513 号, 特許昭 60 (1985)-1299069 号, 特許昭 59(1984)-225447 号, 特許昭 60(1985)- 586 号, 特許昭 60(1985)-587 号, 特許昭 60(1985)-588 号, 特許昭 60(1985)- 589 号]
- (4) (G1関係発明, 外国出願) 発明の名称「プルラナーゼ様酵素、その製造方法及び該酵素を用いた澱粉の糖化法」, (米国) 特許昭 60(1985)- 06/719244 号, 特許昭 60(1985)- 4657865 号(デンマーク) 特許昭 60(1985)-1530/8 号, EU 特許出願(イギリス, フランス, 西ドイツ, ベルギー, オランダ).
- (5) Norman ほか, 特開昭 57(1982)-174,089.
- (6) 日本酵素協会, 日本酵素産業小史, p.80 (2009).
- (7) Lobry de Bruyn and Alberda van Ekenstein, *Rec.Trav.Chim.*, Vol.14, p.203(1895).
- (8) R.O.Marshall, E.R.Kooi, *Science*, Vol.125, p.648(1957), USP 2,950,228 (1.9.1957).
- (9) K.Ueda et.al., *J.Ferment.Technol.*, Vol.46, p.541(1967), 特開 203-159093, USP-3,306,752.
- (10) 足立収生, 松下一, 外山博美, 品川恵美子他, 特開 2003-159093.
- (11) 山中 啓, 化学と生物, Vol.48, No.9, p.643(2010).
- (12) N.Tsumura, T.Sato, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.25, p.616(1961), 同, Vol.29, No.12, p.1123(1965).
- (13) M.Natake, S.Yoshimura, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.27, No.5, p.342(1963).
- (14) M.Natake, S.Yoshimura, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.28, p.560(1964).
- (15) M.Natake, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.32, p.303(1968).
- (16) K.Yamanaka, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.27, p.265(1963).
- (17) K.Yamanaka, *Biochem.Biophys.Acta*, Vol.151, p.505, p.670(1968).
- (18) Hsu. Tz-yuan, Shen San-chiun, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol.4, No.3, p.342 (1964).
- (19) 津村信蔵, 坂倉悦子, 石川雅子, 佐藤友太郎, 日本農芸化学会昭和 39 年(1964)度大会演要旨集(1964.7), 発酵協会誌, Vol.23, No.11, p.516(1965), *Agric.Biol.Chem.*, Vol.29, No.12, p.129(1965).
- (20) 市村正道, 広瀬義夫, 勝屋登, 山田浩一, 日本農芸化学会誌, Vol.9, No.8, p.291 (1965).
- (21) G.Danno, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.34, No.12, p.1745(1970), 同, Vol.34, No.12, p.1805 (1970), 同, Vol.35, No.7, p.997(1971).
- (22) C.K.Lee, L.E.Hayes, M.Z.Long, USP-3,690,947 (1972).
- (23) B.L.Scallet, K.Shieh, Ehrental, L.Slapshak, *Die Stärke*, Vol.26, No.12, p.405 (1974), 特開昭 49(1975)-132,287.
- (24) M.W.Slein, *J.Am.Chem.Soc.*, Vol.77, p.1663(1955).
- (25) M.Suekane, M.Tamura, C.Tomimura, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.42, No.5, p.909(1978).

- (26) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.38, No.3, p.667(1974).
- (27) 高崎義幸, 田辺 脩, 日本農芸化学会誌, Vol.37, No.2, p.93(1962).
- (28) 高崎義幸, 田辺 脩, 日本農芸化学会誌, Vol.36, No.12, p.1010(1962), 同, Vol.36, No.12, p.1013(1962), 同, Vol.37, No.2, p.89(1962).
- (29) 高崎義幸, 田辺 脩, 日本農芸化学会誌, Vol.37, No.9, p.524(1963).
- (30) Y.Takasaki, O.Tanabe, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.28, No.9, p.606(1964), 同, Vol.28, No.9, p.609(1964), 同, Vol.28, No.10, p.740(1964), 同, Vol.30, No.3, p.220(1966), 同, Vol.30, No.12, p.127(1966).
- (31) 高崎義幸, 工業技術院発酵研究所報告, No.26, p.87(1964.9), 同, No.26, p.111 (1964.9).
- (32) Y.Takasaki, O.Tanabe, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.28, No.9, p.601(1964).
- (33) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.30, No.12, p.1247(1966).
- (34) Y.Takasaki, Y.Kosugi, A.Kamibayashi, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.33, No.11, p.1527(1969).
- (35) B.Schnyder, *Die Stärke*, Vol.26, No.12, p.409(1974).
- (36) 高崎義幸, 食品製造へのバイオリアクターの利用, p.72(1992).
- (37) 高崎義幸, 上林 明, 特願昭 43(1968)-3434, 特公昭 47(1972)-19030.
- (38) 高崎義幸, 上林 明, 工業技術院微生物工業技術研究所報告, No.37, p.31(1970),
“*Streptomyces Glucose Isomerase*” ed.by D.Pearlman, *Fermentation Advances*,
Academic Press, New York, London, p.561-589(1969), 特公昭 47(1972)-19030.
- (39) Y.Takasaki, A.Kamibayashi, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.38, No.5, p.1081(1974).
- (40) 高崎義幸, 上林 明, 工業技術院微生物工業技術研究所報告, No.7, p.23(1970),
特公昭 45(1970)-9823.
- (41) 高崎義幸, 上林 明, 特願昭 42-43813(1967), 特公昭 45-9823(1970).
- (42) 高崎義幸, 発酵と工業, Vol.41, No.6, p.477(1983).
- (43) E.K.Wardarip, IFT Annual Meeting „June 1996,” Carbohydrate Division Early History and the
Development of High Fructose Corn Syrup”, N.H.Mermelstein, *Food Technology*, June,
1975, p.21.
- (44) A.L.Antrim, A.-L.Auterinen, *Starch*, Vol.38, No.4, p.132(1986), Kalevi Visui, Enzyme
Engineering X International Conference, Sep.24-29, 1989, Kashikojima, Japan.
- (45) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol. 31, No.3, p.309(1967).
- (46) S.H.Brown, C.Sjeholm, R.M.Kelly, *Biotech.Bioeng.*, Vol.41, p.878(1993).
- (47) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.35, No.9, p.1371(1971).
- (48) S.Aran, Barker, H.Pelmore, P.J.Somers, *Enzyme Microb. Technol.* Vol.5, No.5, March,
p.121(1983).
- (49) 頼富憲三郎, 食品工業, 11 下, p.26(1981).
- (50) K.Yoritomi, T.Kezuka, M.Morita, 米国特許(USP)-4,267,045(1981).
- (51) 石川八郎, 日化協月報, 3 月報, p.14(1980).

- (52) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.36, No.13. p.2575(1972).
- (53) 小巻利章, 食品工業, 12 下, p.47(1976), T.Komaki, N.Taji, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.32, p.860(1968).
- (54) 頼富憲三郎, *The Food Industry*, Vol.19, No.22, p.22(1976).
- (55) The Status of Manufacturing and Marketing of Isomerase Brand High Fructose Corn Syrups at Clinton Corn Processing Company, October,1970.
- (56) 米村紀幸, 工業技術, 7 月号, p.44(1967), 工業技術院成果普及対策室, 工業技術, Vol.11, No.1, p.42(1970).
- (57) Miles Kali-Chemie GmbH&Co.KG, Biochemisches Werk , MKC Enzyme, Production Information, MKC-075/02/74.
- (58) The Outlook for Isoglucose in the United States, Western Europe and Japan, F.O.Light's *International Sugar Report*, April, 1978.
- (59) 小巻利章, 澱粉, Vol.21, p.1(1976).
- (60) 上田誠之助, 古賀偉郎, 塚本桂子, 昭和 40(1965)年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p.16.
- (61) Y.Takasaki, S.Furutani, S.Hayashi, K.Imada, *J.Fermen.Bioeng.*, Vol.77, p.93 (1994). 栗田浩康, 西原敏明, 竹山晴彦, 林田敦, 林 幸男, 高崎義幸, 日本農芸化学会平成 3(1991)年度大会講演要旨集, p.122(1991), 広瀬 遵, 木口英基, 菊池勇人, 横井春比古, 高崎義幸, 日本農芸化学会平成 4(1992)年度東京大会, p.255(1992), 高崎義幸, 西原敏明, 栗田浩康, 林 幸男, 日本農芸化学会平成 4(1992)年度大会講演要旨集, p.325(1992), 高崎義幸、古谷誠吾、林 幸男、日本農芸化学会平成 5(1993)年度大会講演要旨集, p.126(1993) (以上, 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ).
- (62) 高崎義幸, 栗田浩康, 西原敏明, 林 幸男, 日本農芸化学会平成 8 (1996)年度東京大会講演要旨集, p.255(1996), 高崎義幸, 中島秀之, 広瀬 遵, 横井春比古, 林 幸男, 平成 8(1996)年度日本農芸化学会大会(4 月, 京都)講演要旨集, p.293, 高崎義幸, 平成 8(1996)年度日本農芸化学会西日本支部大会支部創立 60 周年記念シンポジウム(10 月 12 日, 於宮崎大学), 高崎義幸, 柿並真由美, 中島秀之, 広瀬 遵, 横井春比古, 平成 9(1997)年度日本生物工学会九州支部大会(佐賀大学)講演(12 月 6 日) (以上, 耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼ).
- (63) 高崎義幸, 食品工業, p.44(1994-6.30), 高崎義幸, 食品と容器, Vol.37, No.12, p.44(1994), 高崎義幸, 食品工業, p.40(1995-5.30), 高崎義幸, 日本農芸化学会誌, Vol.71, No.6, p.621 (1997), 高崎義幸, でん粉と食品, No.26, p.15(2001).
- (64) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.31, No.4, p.435(1967).
- (65) N.J.Palleroni, M.Doudoroff, *J.Biol.Chem.*, Vol.218, p.535(1956).
- (66) 高崎義幸, 田辺 脩, 日本農芸化学会誌, Vol.37, No.9 p.524(1963), *Agric.Biol. Chem.*, Vol.28, No.9. p.601(1964), *Agric.Biol.Chem.*, Vol.28, No.9, p.605(1964).

- (67) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.30, No.12, p.1247(1966), 工業技術院発酵研究所報告, No.28, p.89(1965).
- (68) J.Hirose, K.Maeda, H.Yokoi, Y.Takasaki, *Biosci.Biotech.Biochem.*, Vol.65, No.3, p.658 (2001).
- (69) Y.Takasaki, K.Hinoki, Y.Kataoka, O.Fukuyama, N.Nishimura, S.Hayashi, K.Imada, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol.76, No.3, 237(1993).
- (70) Y.Takasaki, K.Hinoki, Y.Ino, T.Ogawa, S.Hayashi, K.Imada., *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol.57, No.3, p.477(1993).
- (71) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.31, No.4, p.435(1967).
- (72) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.31, No.3, p.309(1967).
- (73) 高崎義幸, 日本食品科学工学会誌, Vol.48, No.2, p.150(2001).
- (74) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.40, No.1, p.1515(1976), 同, Vol.40, No.1, p.1523 (1976), 同, Vol.83, No.2, p.341(1989).
- (75) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.53, No.2, p.341(1989).
- (76) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.51, No.1, p.9(1987), 高崎義幸, 鶴田拓郎, 林幸男, 今田清久, 発酵工学会誌, Vol.70, No.4, p.255(1992). 高崎義幸, 甲斐哲郎, 北島万里子, 林幸男, 今田清久, 宮崎大学研究所報告, Vol.38, p. 71(1992.8).
- (77) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.49, No.4, p.1091(1985), 同, Vol.55, No.3, p.687 (1991), 高崎義幸, 澱粉科学, Vol.29, No.2, p.145(1982).
- (78) Y.Takasaki, H.Shinohara, M.Tsuruhisa, S.Hayashi, K.Imada, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.55, No.7, p.1715((1991), 高崎義幸, 鶴久通浩, 篠原弘路, 林 幸男, 宮崎大学研究所報告, Vol.38, p.85 (1992.8).
- (79) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.47, No.10, p.2193(1983).
- (80) Y.Takasaki, *Agric.Biol.Chem.*, Vol.46, No.6, p.1539(1982), 高崎義幸, 澱粉科学, Vol.29, No.2, p.145(1982).
- (81) B.A.Oyofo, R.E.Droleskey, J.O.Norman, H.H.Mollenhauer, R.L.Ziprin, D.E, Corrier, J.R.DeLoach, Poultry Science, Vol.68, p.1351(1989), B.A.Oyofo, J.R.DeLoach, D.E, Corrier, J.O.Norman, R.L.Ziprin, H.H.Mollenhauer, Poultry Science, Vol.68, p.1357(1989).
- (82) アマノエンザイム, 特開平 3-30721(1991).
- (83) (糖の分離関係発明)「糖の分離方法」特公昭 54(1979)-20577 ほか〔特公昭 54(1979)-20578, 特公昭 54(1979)-20579, 特公昭 54(1979)-20580, 特公昭 55(1980)-1028, 特公昭 55(1980)-7240, 特公昭 55(1980)-41759, 特公昭 55(1980)-41760, 特公昭 56 -17080 (1981), 特公昭 56(1981)-20578, 特公昭 56(1981)-38597, 特公昭 55(1980)-50680, 特公昭 56(1981) -51560〕
- (84) “*Enzymes and Food Processing*” ed.by G.G.Birch, N.Blakebrough, K.J. Parker, Applied Science Publishers Ltd. London, p.41(1981).

- (85) (G_2 関係発明)「バチルス属細菌の生産する複合網アミラーゼによるマルトースの製造法」特公昭 53(1978)-6232 ほか〔特公昭 49(1974)-144255, 特公昭 49(1974)-144256, 特公昭 49(1974)-144354, 特公昭 52(1977)-30589, 特公昭 52(1977)-30590, 特公昭 53 (1978)-1829, 特公昭 53(1978)-5747, 特公昭 53(1978)-5748, 特公昭 53(1978)-5749, 特公昭 53 (1978)-5750, 特公昭 53(1978)-5751, 特公昭 53(1978)-6232, 特公昭 53(1978)-12591, 特公昭 53(1978)-13707, 特公昭 53(1978)-15158, 特公昭 53(1987)-30590, 特公昭 55 (1980)-5159, 特公昭 55(1980)-51551, 特公昭 56(1981)-31, 特公昭 56(1981)-36, 特公昭 56 (1981)-3031, 特公昭 56(1981)-3033, 特公昭 56(1981)-3159, 特公昭 56(1981)-18191, 特公昭 56(1981)-20834, 特公昭 56 (1981)-25111, 特公昭 56(1981)-25112, 特公昭 56 (1981)-25113, 特公昭 56 (1981)-25115, 特公昭 56 (1981)-25116, 特公昭 56(1981)-25117, 特公昭 56(1981)-28155, 特公昭 56(1981)-29995, 特公昭 56(1981)-35434, 特公昭 56 (1981)-35438, 特公昭 56 (1981) -35934, 特公昭 57(1982)-35957, 特公昭 56(1981)-39631, 特公昭 56(1981)-53991, 特公昭 57(1982)-24757, 特公昭 57(1982)-35954, 特公昭 57 (1982)-46838, 特公昭 57(1982)-127011, 特公昭 57(1982)-127012, 特公昭 58(1983) -18191, 特公昭 59(1984) -45355, 特公昭 60(1985)-15314, 特公昭 62(1987)-3158, 特公昭 62(1987)-25977, 特公昭 62(1987)-126973, 特公昭 62(1987)-126974, 特公昭 62 (1987)-126992, 特公昭 62(1987) -126993, 特公昭 62(1987)-126994, 特開昭 62 (1987) -25977, 特開昭 62(1987)-126973, 特開昭 62(1987)-126974, 特開昭 62(1987)-126991, 特開昭 62(1987)-126992〕
- (86) (G_3 関係発明)「アミラーゼ G_3 によるマルトトリオースの製造法」昭 59(1984)-37957 ほか〔特公昭 57(1982)-127011, 特公昭 57(1982)-127012, 特公昭 59(1984)-33359, 特公昭 59 (1984) -37951, 特公昭 60(1985)-15315, 特公昭 63(1988)-25993〕
- (87) (G_4 関係発明)「マルトテトラオースの製造法」特公昭 63(1988)-39234 ほか〔特公昭 63 (1988) -14995, 特開昭 62(1987)-25978, 特開昭 62(1987)-25993, 特開昭 63 (1988) -202379〕
- (88) ($G_{4.5}$ 関係発明)「アミラーゼ $G_{4.5}$ によるオリゴ糖の製造法」特公昭 59(1984)-4118 ほか〔特公昭 59(1984)-44119, 特公昭 58(1983)-44356, 特公昭 60(1985)-36278〕
- (89) (G_6 関係発明)「バチルス属アミラーゼ G_6 によるオリゴ糖の製造法」特公昭 59(1984)-4118 ほか〔特公昭 58(1983)-443356, 特公昭 58(1983)-4117, 特公昭 58(1983)-44350, 特公昭 58 (1983) -58155, 特公昭 59(1984)-34360, 特公昭 59(1984)-34361, 特公昭 59(1984) -37955〕

注 1: 蜂蜜: 蜂蜜は、蜜蜂が、レンゲ、アカシアなどの花から砂糖を含む蜜を採取し、巣に持ち帰る途中、さらに帰巣後、蜂の口の唾液腺から出るインベルターゼ(砂糖をぶどう糖と果糖に分解する酵素)で、ぶどう糖と果糖に分解し、濃縮したもので、蜂が採取する花の種類や、加工中または保存中に生成したと考えられる、マルトース(麦芽糖)などのオリゴ糖、デキストリンのほか、蔗糖、ミネラル、ビタミン、有機酸などの微量成分が含まれているが、蜂蜜は、基本的には、水分約 20%の濃厚な糖液で、主成分は、ほぼ等量のぶどう糖と果糖である。蜂蜜は、古来、外用薬(殺菌

剤、傷薬、化粧品、芳香剤など)として、また、内服薬(精神安定、整腸剤、下剤、二日酔い薬、駆虫剤、抗がん剤、精力剤など)として利用され、現在も、蜂蜜がもつ生理機能について研究されているが、蜂蜜が、これまで、多くの人々に、親しまれ、受け入れられてきたのは、蜂蜜がもつ特有の風味と甘味、そして、確実なエネルギー源としての機能が大きかったのではないかと思う。

注 2: HFCS: 「High Fructose Corn Syrup」の略称で、日本の「異性化糖」に対する、米国での名称である。日本の、果糖含量 42%の「ぶどう糖果糖液糖」と果糖含量 55%の「果糖ぶどう糖液糖」に対応して、「HFCS42」と「HFCS55」がある。米国では、澱粉原料はトウモロコシであるため、「水あめ」、「液糖」はコーンシラップ(corn syrup)と呼ばれてきた。トウモロコシ以外の、麦、米、タピオカなどが原料の場合は「High Fructose Syrup, HFS」と言われている。欧州(EU)では、異性化糖は「イソグルコース(Isoglucose)」と呼ばれ、日本の「ぶどう糖果糖液糖」と「果糖ぶどう糖液糖」に対応して、「Glucose-Fructose Syrup(GFS)」と「Fructose-Glucose Syrup(FGS)」という名称が付けられている。

注 3: マンノース: ぶどう糖、果糖、ガラクトース(乳糖に含まれる)と同じ六単糖 $C_6H_{12}O_6$ の一つである。マンノースは殆どが環状の構造[α -ピラノース(65.5%)と β -ピラノース(34.5%)、図 37]をしていて、鎖状の構造のもの(アルデヒド型)はわずか(0.005%)である。 α -ピラノースは甘味があるが、 β -ピラノースは苦味がある。マンノースは、コンニャクいものグルコマンナンや、針葉樹材などに含まれるマンナンなどの多糖の主要構成糖で、ゾウゲヤシ、アブラヤシなどに含まれるマンナンを加水分解して製造するか、クランベリー、コケモモなどから遊離のマンノースが採取されている。また、モリブデンを触媒とするぶどう糖の異性化によっても製造されている。マンノースが還元(水素添加)されたマンニトール(mannitol、マンニット mannit と云う)は、海藻、キノコ、ニンジン、タマネギなどに含まれている糖アルコールの一種で、チューインガムや、あめ類の粘着防止に、また、医薬(利尿剤)など、広い分野で使用されている。

注 4: マンノースイソメラーゼ: D-マンノースイソメラーゼは D-マンノースと D-フルクトース(果糖)の間を相互変換する酵素で、六炭糖間を異性化する最初の酵素として、細菌(*Pseudomonas saccharophila* F-1)に見出された⁶⁵⁾。著者は、グルコースイソメラーゼを生産する微生物の検索過程で、マンノースイソメラーゼを生産する、*Xanthomonas* 属細菌^{30,66)}、*Streptomyces* 属放線菌^{67,70)}、を分離し、また、耐熱性マンノースイソメラーゼを生産する *Pseudomonas* sp.MI⁶⁹⁾ と *Agrobacterium radiobacter* M-1^{30,31)}を分離し、報告してきた。また、*Streptomyces* 属放線菌マンノースイソメラーゼ反応の平衡と反応温度の関係⁷¹⁾と *Streptomyces* 属放線菌グルコースイソメラーゼ反応の平衡と反応温度の関係について研究⁷²⁾し、これらの報文を統合して、博士論文をまとめた。

論文名: 微生物糖イソメラーゼによるヘキソース異性化反応に関する研究

論文要旨: *Streptomyces* 属放線菌のグルコースイソメラーゼを用い、「グルコース→フルクトース」異性化反応系の熱力学的諸量を求めた。反応温度、25℃、40℃、60℃と 70℃で求めたグルコースイソメラーゼ反応の平衡定数([フルクトース]/[グルコース])は、それぞれ、0.74、0.92、1.15と1.30であった。すなわち、グルコースからフルクトースが生成する反応は吸熱反応であり、温度が高くなるほど、フルクトース側に片寄る反応であることを明らかにした。また、*Streptomyces* 属放線

菌のマンノースイソメラーゼを用い、1℃から 40℃の温度範囲で、マンノースイソメラーゼの平衡定数([フルクトース]/[マンノース])を求めた結果、マンノースイソメラーゼの平衡定数は 3.0 で、温度によって、ほとんど影響を受けないことを明らかにした。以上の 2 つの異性化反応系から求めた熱力学的諸量から、未だ、酵素が発見されていない「マンノースーグルコース」異性化反応系の反応の平衡定数([マンノース]/[グルコース])は 0.24 (≒20/80)と算出し、グルコース側に片寄った反応であることを明らかにした。

注 5: マルトオリゴ糖: 澱粉を部分分解して得られる、ぶどう糖同志が、 α -1,4-グルコシド結合で結合したオリゴ糖(直鎖オリゴ糖)で、マルトース(G_2)、マルトトリオース(G_3)、マルトテトラオース(G_4)、マルトペンタオース(G_5)、マルトヘキサオース(G_6)などの総称名。 α -1,6-グルコシド結合をもつオリゴ糖は分岐オリゴ糖と総称され、区別されている。

注 6: 多糖類の酵素分解: 多糖類(澱粉、セルロース、キシランなど)を分解する酵素には、分子の内部からアト・ランダム(at random)に分解する酵素[エンド(endo)型分解という(多糖が澱粉の場合、 α -アミラーゼ)]と分子の非還元性末端から規則的に分解する酵素[エキソ(exo)型分解という(多糖が澱粉の場合、グルコアミラーゼや麦芽 β -アミラーゼがあり、グルコアミラーゼは、澱粉からぶどう糖の製造に利用され、麦芽 β -アミラーゼはビールや麦芽飴[主成分は麦芽糖(マルトース)]の製造に利用されている。

著者は、澱粉から、(1) ぶどう糖が 2 分子結合したマルトースを生成する細菌 [*Bacillus cereus* var. *mycoides*^{74,85}) (β -アミラーゼとプルラナーゼからなる複合酵素を生産)と *Bacillus megaterium* のアミラーゼ⁷⁵]、(2) マルトースとぶどう糖が 3 分子結合したマルトトリオースを生成する細菌 (*Bacillus subtilis*) のアミラーゼ^{76,88})、(3) マルトトリオースを生成する細菌 (*Microbacterium imperiale*) のアミラーゼ^{77,86})、(4) ぶどう糖が 4 分子結合したマルトテトラオースを生成する細菌 (*Bacillus circulans*) のアミラーゼ^{78,87})、(5) マルトテトラオースとぶどう糖が 5 分子結合したマルトペンタオースを生成する細菌 (*Bacillus circulans*) のアミラーゼ^{79,88})、(6) ぶどう糖が 6 分子結合したマルトヘキサオースを生成する細菌 (*Bacillus circulans*) のアミラーゼ^{80,89})、そして、(7) ぶどう糖が 10 分子程度結合したデキストリンを生成する細菌 (*Bacillus* 属) アミラーゼなど、細菌の生産する種々のマルトオリゴ糖やデキストリンを生成アミラーゼについて報告してきた。このうち、マルトトリオースはマルトースよりも、まろやかな甘味があり、吸湿性と保水性が大きく、食品の乾燥防止効果が大きいこと、低着色性で、耐酸性と耐熱性に優れているなどの特性があり、工業化され、製菓、飲料、練り製品などの甘味料として利用されている。

注 7: DE: ぶどう糖当量、Dextrose Equivalent の略。全固形分中の還元糖量をぶどう糖(デキストロース)として表した百分率。

12. 著者略歴

高崎義幸(たかさき よしゆき)

学 歴

1959 年 大阪府立大学大学院農学研究科修士課程1年修了

1967 年 農学博士(大阪府立大学)

職 歴

1959 年 通商産業省工業技術院発酵研究所入所

1967 年 主任研究官

1973 年 微生物探索研究室室長

1985 年 研究企画官

1985 年 微生物探索管理部部長

1988 年 細胞機能部部長

1989 年 宮崎大学工学部工業化学科(後に、物質工学科に改組)教授

2000 年 同大学名誉教授

受賞歴

1968 年 科学技術庁長官発明賞(発明協会)「イソメラーゼ技術」

1968 年 工業技術院長賞(通商産業省工業技術院)
「酵素法によるぶどう糖から果糖(異性化糖)製造の工業化」

1969 年 内閣総理大臣発明賞(発明協会)「イソメラーゼ技術」

1969 年 毎日工業技術奨励賞(毎日新聞社)「イソメラーゼ技術」

1970 年 日本農芸化学奨励賞(日本農芸化学会)「イソメラーゼ研究」

1971 年 科学技術功労者(科学技術庁)「イソメラーゼ技術」

1975 年 紫綬褒章「イソメラーゼ技術」

1989 年 科学技術庁長官発明賞(発明協会)「プルラナーゼを用いるぶどう糖製造法」

異 性 化 糖 (HFCS) 関 連 技 術 発 展 の 歴 史

西暦年	基幹研究・基幹技術の開発と関連研究、関連事項	当該発明、関連技術の開発研究と工業化
756	砂糖 日本に伝来〔中国, 唐の僧 鑑真, 聖武上皇に献上 (東大寺献物帖)〕	
1726	江戸幕府, サトウキビから砂糖の生産を奨励	
1747	テンサイから砂糖を発見(ドイツ, アンドリアス・マルクグラーフ)	
1807	小麦から澱粉を製造(米)	
1811	澱粉を酸分解しぶどう糖を生成(酸糖化法の発見)(ロシア, Gottlieb & Kirchoff)	
1814	英仏戦争時, 砂糖の代替として酸糖化により澱粉からぶどう糖を製造 (Saussure)	
1833	麦芽の無細胞抽出液から澱粉を糖化する物質を発見(フランス, Payen & Persoz)	
1844	トウモロコシ澱粉を製造 (米, Wm Colgate & Co.)	
1847	蜂蜜, 果汁, 転化糖から左旋性の糖(果糖)を発見(フランス, Dubrunfaut)	
1864	トウモロコシ澱粉を酵素分解して水アメを製造(米, Union Sugar Co.)	
1878	酵素(Enzyme)の概念を提唱(ドイツ, ウィルヘルム・キューネ)	
1894	酵素と基質について {鍵と鍵穴} 説を発表(ドイツ, エミール・フィッシャー)	
1895	アルカリによるぶどう糖から果糖への変換(Lobry de bruyn & Alberda van Ekenstein)	

1897	酵母の無細胞抽出物を用いアルコール発酵を証明 (ドイツ, エドゥアルト・ブフナー)	
1912	酸糖化により澱粉から水アメを製造 (日本)	
1916	酸糖化により澱粉からぶどう糖を製造 (日本)	
	固定化微生物の研究 (インペルターゼ含有酵母を骨炭に固定 (Nelson, Griffin ら))	
1923	澱粉液化酵素 (<i>B. subtilis</i>), ドイツ、フランスで生産, 結晶ぶどう糖を製造 (Newkirk)	
1926	ナタマメのウレアーゼを結晶化 (酵素はタンパク質) (ジェームス・サムナー)	
1935	イオン交換樹脂の発明	
1940	細菌 α -アミラーゼによる澱粉液化法 (日本, 1940 ~)	
	ぶどう糖のアルカリ異性化特許 (米, Sidney Cantor Kenneth Hobbs)	
1947	Emden Meyerhof Parnas (EMP) 回路の確立	
1947 (-1949)	<i>Aspergillus usami</i> の澱粉糖化酵素を γ -アミラーゼ (後のグルコアミラーゼ) と命名 (北原)	
1948	<i>Aspergillus</i> 属澱粉糖化酵素を発見 (米, Corman), 微生物深部好気培養法の確立と普及 (日本)	
1949	イソアミラーゼの発見 (丸尾)	
1951	<i>Rhizopus</i> 属澱粉糖化酵素を発見 (福本)	
	<i>Aspergillus</i> 澱粉糖化酵素をグルコアミラーゼと命名 (米, Philips & Caldwell)	
1953	イオン「交換樹脂によるぶどう糖異性化特許 (米) トウモロコシ澱粉の二段液化法を開発 (小巻)	
1955	<i>Aspergillus niger</i> グルコアミラーゼによるぶどう糖製造 (Corn Product 社. & A, E, Staley 社ほか)	
1956	[澱粉の無制限買い上げ (農水省)]	
1957	キシロースで培養した細菌 (<i>Pseudomonas hydrophila</i>) を用い硫酸塩の存在下でぶどう糖を果糖に変換 (米, Marshall & Kooi)	
1958	[ぶどう糖工業の育成要領 (農水省)]	
1959	<i>Rhizopus niveus</i> グルコアミラーゼによる澱粉酵素糖化法の工業化 (福本)	
1961	<i>Aspergillus</i> 糖化酵素による澱粉糖化法の工業化 (米, Corn Product, A. E. Staley 社他)	グルコース異性化酵素生産菌の検索を始める (高崎)
	酵素固定化 (不溶化) 法の研究 (イスラエル, Katchalskii)	
1962		キシロース, 硫酸塩を必要としない <i>Bacillus megaterium</i> ぶどう糖異性化酵素を発表 (~1963) (高崎ら) グルコース異性化酵素生産菌の検索, 分離, 同定, 性質等 (高崎)
1963	キシロース培地で培養した <i>Lactobacillus brevis</i> キシロースイソメラーゼを用いぶどう糖を果糖に変換 (山中)	キシロース, 硫酸塩を必要としない <i>Paracolobacterium</i> ぶどう糖異性化酵素を発表 (~1966) (高崎ら) グルコースイソメラーゼ生産菌の同定, 性質, 基礎的培養と反応条件の検討 (高崎) <i>Xanthomonas</i> マンノースイソメラーゼを発表 (1963-1964),
1964	キシロースで培養した <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> のぶどう糖異性化酵素を発表 (津村)	グルコースイソメラーゼ生産菌の同定, 培養, 反応の中間工業試験等 (高崎) <i>Streptomyces</i> マンノースイソメラーゼを発表 (高崎)
1965		キシラン資化性放線菌 (<i>Streptomyces</i> sp. YT 株) をキシラン含有培地で培養してグルコースイソメラーゼの工業生産と同酵素を用いぶどう糖から果糖 (異性化糖) の工業生産を発表 (高崎ら, 参松工業)
1966		工技院, SBI 社とオプション契約を締結 (1966. 10) 工技院, SBI 社と再実施権付き独占実施契約を締結 (1966. 10, 国有特許輸出第 1 号)
1967		自己消化法によるグルコースイソメラーゼ抽出法を開発 (高崎ら)
1967 -1968	多段疑似移動層による石油化学品 (n-パラフィン, i-パラフィン) 分離装置の開発 (米, UOP 社)	グルコースイソメラーゼの熱固定化法を開発 (高崎ら) 熱固定化酵素の再利用による異性化糖の製造 (参松) グルコースイソメラーゼ反応の平衡と温度の研究 (高

		崎)マンノースイソメラーゼ反応の平衡と温度の研究(高崎)
		回分法により製造した果糖分 14%の「Isomeroose 30」を販売 (1968.1, SBI 社)
1968	高恒温液化法を組み合わせたトウモロコシ澱粉の二段液化法を開発 (小巻)	SBI 社, A. E. Staley 社にサブライセンス付与 (1972 年工業化)
	高温短時間(アルカリ)異性化法を開発 (貝沼)	
1969	<i>Aspergillus niger</i> グルコアミラーゼによる澱粉酵素糖化法に切り換え (日本)	<i>Streptomyces rubiginosus</i> グルコースイソメラーゼを精製, 結晶化 (高崎ら)
1970		果糖分 42%の「Isomeroose 100」を販売 (SBI 社)
1971		亜硫酸水素型陰イオン交換樹脂塔によるぶどう糖と果糖の分離法を開発 (高崎ら)
1972		グルコースイソメラーゼ酵素剤の販売 (日本) 固定化酵素による HFCS の連続生産を開始 (SBI 社) 工技院, (独) マイルス・カリケミ社 (Miles Kali Chemi) と実施契約締結
1973	<i>B. licheniformis</i> 耐熱性 α -アミラーゼを用い澱粉を液化 (米, Madsen 社)	固定化酵素による HFCS の連続生産 (30-40 万トン, SBI 社)
1974	連続式澱粉液化装置 (Jet Cooker)を開発	(独)マイルス・カリケミ社, 異性化酵素を販売, 欧州で異性化糖の工業生産始まる
1976	耐熱性 α -アミラーゼによるトウモロコシ澱粉液化法を開発、工業化 〔異性化糖の農林規格制定(農水省)〕	FDA(米国食品医薬品安全局)によりグルコースイソメラーゼ生産菌(<i>Streptomyces rubiginosus</i>)の安全性認可 (SBI 社)
1977	〔異性化糖の農林規格全面改正(農水省)〕	異性化糖メーカー16 社(日本) (果糖)四塔式回分分離装置を開発, 工業化 (参松) 果糖クロマト分離法により果糖 90%異性化糖の製造, 果糖 55%「果糖ぶどう糖液糖」を製造 (参松)
1978	〔異性化糖の農林規格改正(農水省)〕	単塔移動床式果糖分離法を工業化 (米) 1979 以降 疑似移動床式果糖分離装置を導入 (米, Staley 社他) <i>Bacillus</i> 属ブルラナーゼを併用する澱粉糖化法を開発
1979	疑似移動床式果糖分離装置を販売 (三菱化成)	
1980	〔異性化糖の農林規格改正(農水省)〕	
1985		工技院, フィン・シュガー社(フィンランド)とブルラナーゼを用いる澱粉糖化技術の実施契約を締結
1987		HFCS から結晶果糖を製造・販売 (米, A. E. Staley 社)
1991		酸性 (pH4.5~5) 下でトウモロコシ澱粉を液化できる <i>Bacillus licheniformis</i> 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼを開発 (高崎ら)
1994		耐酸・耐熱性グルコースイソメラーゼを用い, 嫌氣的条件下, 還元剤存在下で行うぶどう糖の酸性 (pH4.5~5) 異性化法を開発 (高崎ら)

受理日：2016年4月4日