

酵素の産業的利用に関する研究

小巻利章

Industrial Application of Enzyme

Toshiaki KOMAKI

ABSTRACT

Industrial application of enzyme from microorganism has a history over 100 years, and for the this 40 years, there were the remarkable developments. Especially, a sweetener (isomerized sugar) produced from starch by enzymatic method was displaced to 30 % of sugar consumed in Japan. In the production of the isomerized sugar, two enzymes were mainly used, which hydrolyzed starch to glucose and isomerized glucose to fructose, respectively. On the other hand, the discovery of two enzymes enabled the industrial production of trehalose from dextrin. One converted 1,4 linkage of glucose residue at reducing terminal in dextrin, to 1,1 linkage through the intramolecular transglycosylation and another released trehalose from the modified terminal. Thus various oligosaccharides and glycosides got to be industrially produced using various enzymatic transglycosylation. This review introduced the history of enzyme developments.

キーワード：酵素，澱粉加水分解，ぶどう糖異性化，転移酵素，機能性食品，トレハロース
Keywords: enzyme, starch hydrolysis, glucose-isomerization, glycosyltransferase, functional food, trehalose

1. まえがき

昨年は、19世紀に当時の大化学者 V. Liebig等の発酵は細胞の生活作用そのものではなく、細胞の中にある物質の作用だとする発酵酵素説と微生物学者 Pasteur 等の発酵が生活細胞による生活機能的発酵説との論争が、終止符を打った Buchnerの実験から丁度100年になる。

彼は酵母をすりつぶし、その搾汁を砂糖に加えて発酵する事を発見し発酵が生活細胞その物ではなく、酵母の中にある物質”酵素”の作用であることがを明かにした。その後酵素についての実態が明らかになり、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、合成酵素の6種に分類され1992年の Enzyme Nomenclature には3488種に及ぶ酵素が登

録されており、まだ新しい酵素の発見が続いている(表1)。

生体内に於いて行われている消化分解、合成、転換、修飾などの各種の化学反応は、全てタンパク質を本体とする酵素による触媒作用によって、常温、常圧下で円滑にかつ規則正しく営まれているといえる。

酵素の産業的利用の最初は麴の製造利用であった。麴は *Asp. oryzae* と呼ばれる黄色の胞子を生成する糸状菌で、蒸し米や、ふすまで培養され、その培養物が清酒、味噌、醤油製造に古くから利用され、麴中にはアミラーゼ(澱粉分解酵素)、プロテアーゼ(蛋白質分解酵素)が存在し、この製造技術が、1890年に米国へ輸出されている。我が国の技術輸出の第1号といえる。当時農商務省の御用掛として日本酒製造技術の研究を担当していた 高峰讓吉博士 [1] は麴を用いた

表1 酵素の種類

1. 酸化還元酵素	897 種	2.6 窒素を含む原子団の転移	78 種
1.1 CH-OH基を電子供与体とするもの	311 種	2.7 リンを含む原子団の転移	282 種
1.2 アルデヒドまたはオキシ基を電子供与体とするもの	84 種	2.8 硫黄を含む原子団の転移	47 種
1.3 CH-CH基を電子供与体とするもの	79 種	3. 加水分解酵素	993 種
1.4 CH-NH ₂ 基を電子供与体とするもの	44 種	3.1 エステル結合に作用するもの	280 種
1.5 CH-NH基を電子供与体とするもの	48 種	3.2 グリコシル化合物に作用するもの	163 種
1.6 上記以外でNADHまたはNADPHを電子供与体とするもの	51 種	3.3 エーテル結合に作用するもの	10 種
1.7 その他の窒素化合物を電子供与体とするもの	15 種	3.4 ペプチド結合に作用するもの	327 種
1.8 硫黄を含む基を電子供与体とするもの	22 種	3.5 ペプチド結合以外のC-N結合に作用するもの	145 種
1.9 ヘムを電子供与体とするもの	4 種	3.6 酸無水物に作用するもの	46 種
1.10 ジフェノール類を電子供与体とするもの	12 種	3.7 C-C結合に作用するもの	10 種
1.11 過酸化水素を電子受容体とするもの	14 種	3.8 ハロゲン化合物に作用するもの	7 種
1.12 水素を電子供与体とするもの	6 種	3.9 P-N結合に作用するもの	1 種
1.13 オキシゲナーゼ (電子供与体1種)	58 種	3.10 S-N結合に作用するもの	2 種
1.14 オキシゲナーゼ (電子供与体2種)	130 種	3.11 C-P結合に作用するもの	1 種
1.15 スーパーオキシドラジカルを電子受容体とするもの	1 種	3.12 S-S結合に作用するもの	1 種
1.16 金属イオンを酸化するもの	3 種	4. 脱離酵素 (リアーゼ)	332 種
1.17 -CH ₂ -基を電子供与体とするもの	5 種	4.1 C-C結合に作用するもの	153 種
1.18 還元型フェレドキシンを電子供与体とするもの	6 種	4.2 C-O結合に作用するもの	125 種
1.19 還元型フラボドキシンを電子供与体とするもの	1 種	4.3 C-N結合に作用するもの	21 種
1.97 その他	3 種	4.4 C-S結合に作用するもの	17 種
2. 転移酵素 (トランスフェラーゼ)	1002 種	4.5 C-ハロゲン結合に作用するもの	5 種
2.1 C ₁ の転移	134 種	4.6 P-O結合に作用するもの	9 種
2.2 アルデヒドまたはケトン残基の転移	4 種	4.99 その他	2 種
2.3 アシル基の転移	161 種	5. 異性化酵素 (イソメラーゼ)	145 種
2.4 グリコシル基の転移	254 種	5.1 ラセマーゼおよびエピメラーゼ	42 種
2.5 メチル基以外のアルキル基などの転移	42 種	5.2 シス-トランス-イソメラーゼ	11 種
		5.3 分子内酸化還元酵素	46 種
		5.4 分子内転移酵素	32 種
		5.5 分子内脱離酵素	11 種
		5.99 その他	3 種
		6. 合成酵素 (リガーゼ, シンテターゼ)	119 種
		6.1 C-O結合の形成	22 種
		6.2 C-S結合の形成	32 種
		6.3 C-N結合の形成	56 種
		6.4 C-C結合の形成	5 種
		6.5 リン酸エステル結合の形成	4 種

高峰式ウイスキー醸造法を開発し、米国のフェニックス社に輸出した。1893年にイリノイ州のベオリアにトウモロコシを原料とするウイスキー工場が建設されたが、旧来法の糖化剤である麦芽の製造業者の猛烈な反対に逢い米政府に解散を命じられている。貿易摩擦も、また100年前からの歴史があることになる。翌年高峰博士は米国でタカミネラボ社を開設し医薬消化剤タカジスターゼの生産を始めた。わが国では三共株が今日でも生産している。日本では京都で佐藤商會が繊維工業用の糊抜き剤として麴から抽出した液状製品を1903年から販売した。1908年仏、独では細菌(枯草菌 *B. subtilis*)を用いた耐熱性のアミラーゼ[2]の生産が始まり繊維工業で織布の経糸に付けられた澱粉糊の糊抜き剤として利用された。わが国でも1939年来長瀬産業、上田化学、及び大和化成等で同様の酵素の製造が始まっている。

1957年には、国際酵素化学シンポジウムが東京、京都で開催され約200人の外国人学者が出席され、当時としてはわが国での初めての大規模な国際学会であった。

2. 第2発展期

2.1 澱粉質の酵素糖化技術の開発

工業生産された酵素の大部分が、澱粉分解酵素(アミラーゼ)を主体とした繊維工業での糊抜き剤として利用されていた時代から、国際酵素化学シンポジウム開催を機会に食品、医薬、その他工業で酵素を利用しようとする機運がやや高まってきた。

細菌起源の蛋白分解酵素(プロテアーゼ)は味噌、醤油の速醸目的にまた皮革工業での脱灰剤として皮革表面の老廃蛋白の除去に使用されるようになった。

最も大きな開発は当時余剰農産物であった甘藷澱粉を原料としてブドウ糖を酵素的に生産する技術の実用化であった。澱粉に作用して、直接これを構成単位であるブドウ糖にまで分解する酵素の存在は、1913年頃から喜多[3]によって予測され、北野[4]、徳岡[5]らは黄麹菌(清酒用の麹菌 *Asp. oryzae*)の澱粉から直接グルコースを生産する酵素の存在を認めていた。北原[6]は1949年頃から *Asp. usami* の糖化型アミラーゼを精製し、これを"γ-アミラーゼ"と名付けていた。ブドウ糖生産酵素の工業生産に拍車を掛けたのは、1951年のJ. A. C. S. の掲載論文であった(実際に読んだのは3年後であった)。Phillips [7] は *Rhizopus deremer* から単離して" Glycoamylase"として、また Kerr [8] は、 *Asp. niger* NRRL300#1から単離して、"Amyloglucosidase"と名付けて同一号に発表されたのである。その後、福本、辻坂 [9] は両酵素を結晶状に単離しそれぞれの澱粉分解機作を明らかにした。

これらの研究とは別個に、30~33%の高濃度の澱粉乳液に液化型アミラーゼを添加して、これを加熱して澱粉の糊化と液化とを同時に進行させる澱粉液化法が、水飴製造で行われていた。しかし、この糖化液は濾過が事実上実施不可能であったのが、筆者らの瞬間高温液化法の開発で解決できた[10]。生の澱粉はそのままでは酵素による消化作用を受けにくく、水と共に加熱することで「糊化」と呼ばれる現象が起こり、澱粉粒は著しく膨潤し、澱粉分子のミセル構造が崩れて、十分に水和して酵素消化作用を受けやすくなる。水飴の製造工程では濃縮コストを考えるとできるだけ高濃度で実施したい、その意味で澱粉を予め糊化させてから作用させることは事実上不可能で、澱粉乳液に酵素を加えて徐々に加熱して、ある温度に達したらその時点で糊化した澱粉分子はただちに酵素消化され、さらに加熱・糊化・消化を連続的に続けて逐次液化させる方法が古くから行なわれていた。この方法では、最終の液化液中に不溶性の物質が残存しこれが濾過障害となり事実上濾過が不可能であった。この不溶性物質が澱粉分子であり、逐次液化されている液化中に、未糊化で残っている分子間で再配列し、より強固なミセル結合が新生し、酵素が作用し得る温度範囲では糊化しない分子となり、液化液中に不溶性物質として残存することを見出し、酵素が作用できる温度範囲で、澱粉分子を瞬間的に、かつ一斉に、高温度まで加熱する方法を開発した。その後きわめて耐熱安定性の高いα-アミラーゼが開発されて[11-14]、現在ではα-アミラーゼ含有澱粉乳液と高圧蒸気とをジェットクッカー、ハイドロヒーター等を使って、瞬時に混合して、瞬間的に105℃±3℃に加熱液化する方法が行われ効率的に澱粉の完全液化が容易に行なわれている。

甘藷澱粉原料、細菌α-アミラーゼ液化、グルコアミラーゼ糖化によるブドウ糖生産が工業的に実施されたのは1959年の春であった。当時戦時中に増産された甘藷が余剰農産物として澱粉に加工されて約100万噸在庫されていた。従来の酸糖化法では、苦みのあるゲンチオピースなどの副生物が多くて、ブドウ糖の収量が悪かった。酵素糖化法はこれらの欠点を解決し、粉末ジュースの原料などに使用されて数年で甘藷澱粉の在庫は一掃された。その後、ブドウ糖をさらに甘味の強い果糖に転換(異性化)する為の酵素グルコースイソメラーゼ(ブドウ糖異性化酵素)[15-18]の開発が始まり、1971年に工業化し、さらに1977年には固定化酵素を用いた連続方式のバイオリアクターが開発され、異性化糖(ブドウ糖・果糖混液)の生産量は年間113万噸(製品量)に達し砂糖消費量の約30%に相当するようになった。世界的にも約1000万噸が生産されている。これは砂糖の全生産

量の約10%に相当する。

グルコアミラーゼの生産菌のスクリーニングの過程で、当時純ブドウ糖の適切な定量方法がなく、グルコースオキシダーゼ（ブドウ糖酸化酵素）を工業生産し（草井等）[19]、これを用いてブドウ糖のみを特異的に酸化して定量する方法を確立した。今日では、グルコースオキシダーゼの酸化反応で生成した過酸化水素を還元型色素を受容体として、ペルオキシダーゼで酸化してその発色よりグルコースのみを定量する試薬キットが発売され我々の研究室でも常用している。

2.2 マルトース、マルトトリオースの生産

糖化酵素として、全く α -アミラーゼを含有しない大豆起源の β -アミラーゼと、澱粉分子中の分岐点である α -1,6結合を特異的に切断するプルラーゼを用いることによって、マルトース含量の高い糖化液の製造が可能になり粉末状のマルトース製剤が市販されるようになった。さらに糖化液をイオン交換樹脂を用いるクロマトグラム技術の応用により、さらに高純度のマルトースとマルトトリオースを主体とする区分への分離が可能となった。マルトースの β -1水塩結晶をスプレイドライヤー方式で生産する技術が確立し、中空球状の粉末が市販されるようになった。この比甘味度が約30%で、低甘味と特有の味質で菓子業界に愛用されている[20]。マルトトリオース含有製品は、水分保持性、澱粉質の老化防止性に於いて優れた特性を有しており、独特の市場を有している。

2.3 G4生成 α -アミラーゼを用いた、マルトーステトラオース主体の水飴製造

生成物のアノマー型が α -型であるが、澱粉分解機構はエクソ型で、澱粉分子の非還元性末端から逐次4糖単位に切断する α -アミラーゼが発見され[21]、これを用いて糖化した水飴は約50%のマルトテトラオースと、10%弱のマルトトリオースおよびデキストリン約30%を主成分とする特殊水飴が生産されている。特徴として、低甘味（比甘味度20）、保湿性に優れており砂糖の20から40%を置換して用いられている。

2.4 トレハロースの生産用酵素の発見とトレハロースの工業生産

トレハロースはグルコースの α -1,1結合からなる非還元性2糖類（ $G^{1-1}G$ ）で、自然界では広く動植物、微生物に遊離の状態が存在している。昆虫類ではエネルギーとして利用されるばかりではなく、耐寒性、特に冷凍耐性に重要な役割を果たすものとして知られていた。現在製パン業界では、工場酵母を含むパン生地を製造し、これを冷凍して販売店に運搬し、販売店の店頭で、解凍・発酵（ほいろ）・焼成して、焼き立てのパンを供給することが実用化しており、この時

に用いる酵母は冷凍耐性（*Saccharomyces rosei*）でなければならぬが、この冷凍耐性酵母は、高濃度のトレハロースを含有しており、かつてはトレハロースの給源であった。

砂漠地帯に生息する、クワムシや、イワヒバはひからびて一見して死んでいるようであるが、水を与えれば生き返ることが観察されている。この様な乾燥耐性は、含有するトレハロースが影響している。これらの現象は、凍結、乾燥、或いは高浸透圧と言った悪条件下での生体膜、膜タンパク質に対するトレハロースの保護効果と考えられている[22,23]。

トレハロースの製造方法は、酵母からの抽出法、微生物による醗酵法などが研究されているが、実用的な大量生産の方法は開発されていなかった。林原グループでは、澱粉の液化物に対して作用して、還元性末端基のグルコース結合を1,4から1,1に変換して非還元性のマルトオリゴシルトレハロースを合成する酵素（Maltooligosyl-trehalose synthase）と、この非還元性糖質の末端基のトレハロースを特異的に切断してトレハロースを生産する酵素（Maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase）の2者を同時に生産する菌株を発見した。新しい酵素が発見されると、その酵素の生産菌は *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Sulforobus* など広い範囲の各種の菌株より発見された。

1995年春から澱粉原料で α -アミラーゼ液化、枝切り酵素と上記2酵素による糖化作用でトレハロースの工業生産が始められた[24]。この発見は、この分野の研究に携わる者の一人として、如何に自然界は、まだまだ秘められた、未知な酵素が存在する宝庫であるかと言うことを如実に知らされた貴重な経験でもある。

トレハロースは開発後、その特性が化粧品や、各種の食品工業で活用されているが、その効果の機構についてはまだまだ説明を必要とする分野が多い。例えば、筆者の少ない経験でも、卵焼きに応用すると、焼き上がりが軟らかく、プロの料理人が驚くほどである。多分卵蛋白の熱変性をマイルドにする様な、水分子の補足であろうと思われるが、焼酎の湯割り、水割り時に1%以下の僅か量を添加するだけで、焼酎の角がとれて風味自体がマイルドに変化し、極めて好評であるが、その機構は不明である。

2.5 洗剤への応用開発

合成洗剤中に含まれていたトリポリリン酸ナトリウムは洗濯助剤として極めて有効なものであったが、河川の水質を富裕化することからその使用が問題になり、1996年頃から蛋白分解酵素の洗濯助剤としての利用が注目されるようになった。これは、肌着類の汚れ

は、身体から分泌した体脂肪と、皮膚から脱落したタンパク質の付着が主体であり、体脂肪は界面活性剤によって取り除き易いがタンパク質の汚れが落ち難く、このタンパク質を除く目的である。細菌起源の好適蛋白分解酵素のスクリーニングが実施されて実用化したのが、酵素活性を持った粉塵発生の問題が生じ、顆粒状酵素剤さらにはその上をコーティングした酵素剤が開発されてようやく問題が解決し、今日では日本、欧州各国及び米国で使用されるようになり最大の酵素の市場となっている[25]。さらに脂肪分解酵素や繊維素分解酵素の応用も実用化している。

蛋白分解酵素の精製品は、コンタクトレンズの洗浄剤成分として実用化している。

また、繊維素分解酵素は、繊維加工工業でジーンズ生地を、染色後ストンウォッシングする際に用い、生地の軟化を図るなどに応用されている。

3. 成熟期；転移酵素活性の応用

澱粉加水分解加工に於いて加水分解酵素のみならず異性化酵素が利用されてきたが、種々の転移酵素または加水分解酵素の転移活性を利用したオリゴ糖等や配糖体の製造が次々と試みられてきた。

3. 1 グルコシル基の転移

3. 1. 1 CGTaseによる環状デキストリンの製造と利用

澱粉を分解して α -1, 4結合の直鎖のオリゴ糖を生成すると同時に、その還元性末端と非還元性末端とを転移反応で結びつけて環状のデキストリンを生成する酵素は、古くから発見されていてアミラーゼの一種と考えられていたが、転移酵素に分類されてシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ (CGTase) と命名されている (EC2. 4. 1. 19)。生成物はグルコース鎖長が6, 7, および8で、それぞれ α , β , および γ シクロデキストリンと呼ばれている。環状構造の内部空隙の直径は、それぞれ5~6, 7~8, 9~10 Åで、環状構造の外周部は水酸基が配列して親水性を、内孔部は水素が配列して疎水性を示し、この中に適した大きさのゲスト化合物を取り込んで包接化合物を生成することが特徴で種々の応用法が開発されている。メントール、ワサビ等香料や香辛料のような揮発性の成分を包接して揮散防止、安定化さらには魚獣臭などの悪臭をマスキング、酸化や光に不安定な物質の安定化、難溶性物質の可溶化、乳化、起泡性の改良、コレステロールの除去など食品、化粧品、医薬、衣料品、化学工業等の広い範囲の応用が実用化している[26]。また、シクロデキストリンの溶解度を改善する目的で、マルトースとの混合溶液に澱粉枝切り

酵素であるプルラーゼを作用させ、その酵素の縮合反応を利用して1~2分子のマルトースが1, 6結合した極めて溶解度の高い分岐シクロデキストリンが工業的に製造されている。

3. 1. 2 CGTaseによるカップリングシュガー、その他の転移糖、配糖体の製造

CGTaseは澱粉分解時に、砂糖を加えて反応させると、これを受容体として、砂糖にグルコースまたはマルトースを分子間転移して、グルコシルシクロロース ($G^{1-4}G^{1-2}F$) またはマルトシルシクロロース ($G^{1-4}G^{1-4}G^{1-2}F$) を生成する。これらのオリゴ糖は、カップリングシュガーと呼ばれ、虫歯の成因にならない糖質として始めて実用化された[27]。

ステビオシドは、キク科の多年性植物ステビア葉に含まれる甘味成分ステビオール配糖体で、砂糖の100~200倍の甘味度を有している。しかし甘味の質は砂糖に比べて、円やかさに欠け、苦みを呈し、そのうえ残味が強く、舌にいつまでも甘味が残るなどの欠点がある。この場合も同酵素 (CGTase) の転移反応を用いてグルコース残基を1~2個結合させて、グルコシルステビオシドとすることで甘味の質は著しく改善され、実用化している[28]。その後、 β -フラクトフラノシダーゼ (EC, 3, 2, 1, 26) を用いて砂糖と共に反応させると、砂糖が分解されて生ずるフラクトースがステビオシドの19位カルボキシ基に結合しているグルコース残基に選択的に結合して、味質をさらに改善できることも知られている[29]。

またこの酵素CGTaseはその他ピラノース環を形成しそのC2, C3, C4位OH基がequatorialである単糖類及びそれらのC1位誘導体を受容体として分子間転移をする事ができる[30]。グリチルリチンを受容体として澱粉質と共にCGTaseを作用させると α -グルコシルグリチルリンが合成され味質が著しく改良される[31]。

またルチンは、毛細血管の強化出血予防、血圧調製などの生理作用を有するビタミンPとして、また黄色色素として古くから知られた有用物質であるが、難溶性が最大欠点である、これに澱粉質を混合して高濃度としてCGTaseまたは α -グルコシダーゼ (EC 3, 2, 1, 20) を作用させると α -グルコシルルチンが合成され、このものは溶解度が著しく高く欠点が改良された[32]。

高濃度の澱粉質と乳糖の混合液にCGTaseを作用させると、乳糖のグルコース残基1位水酸基にグルコース基が1分子結合した非還元3糖のグルコシルラクトシドが合成され、このオリゴ糖もまた小腸で消化吸収されずに、大部分大腸に運ばれて、ビフィズス菌に利用されて腸内細菌叢浄化の効果がある[33]。

アスコルビン酸は医薬品及び食品用途として、大量に利用されているが、空気酸化を受けるなど不安定な物質である。澱粉にアスコルビン酸を受容体として加えてCGTaseを作用させると、アスコルビン酸の2位の水酸基にグルコシル基が転移されて、酸化に安定なグルコシルアスコルビン酸が転移生成物となり、安定なビタミンCが合成できる[34]。

スクロース ($G^{1-2}F$) に作用してこれを分子内転移してイソマルチュロース ($G^{1-6}F$) に変換する酵素が、*Protaminibacter rubrum*の菌体内に生産されることが、ドイツの砂糖工場で発見されていた。イソマルチュロースは発見者らの研究所が存在する町の名前がPalatineであったことからパラチノースと呼ばれて、虫歯になりにくい糖として、チュウイングガム等に利用されている[35, 36]。パラチノースの興味ある性質として、口腔内細菌で虫歯になる原因細菌である、*Streptococcus mutans*による酸の生成もなく、また菌が歯の表面に定着する際の主役となる粘着剤の不溶性グルカンの生成にも、無関係であり、むしろ不溶性グルカン生成酵素であるデキストランシュクラゼの阻害剤になり、不溶性グルカンの生成が中途半端に終わることであろうと推察されている。

この酵素は最初 α -グルコシルトランフェラーゼと呼ばれていたが、その後この酵素反応は、分子内転移でイソマルチュロースの他にトレハロース ($G^{1-1}F$) をも生産し、ムターゼの一種と判断されて、分類上5類の異性化酵素に属するとされイソマルチュロースシンターゼ (EC 5, 4, 99, 11) と呼ばれるようになった。

3. 1. 3 α -グルコシダーゼの転移反応の利用

Asp. niger の α -グルコシダーゼは、マルトースその他の低分子マルトオリゴ糖に作用して、その非還元性末端から加水分解して α -グルコースを遊離する酵素であるが、同時に転移活性が強く、グルコースの6位および4位のCに、グルコースを転移してイソマルトース ($G^{1-6}G$)、パノース ($G^{1-6}G^{1-4}G$) を生成する[36]。イソマルトオリゴ糖と称して工業生産されている[37]。

Acereomonium 属の真菌は、3位と4位に特異的に転移する α -グルコシダーゼを生産する。これを利用して、ニグロース ($G^{1-3}G$)、ニグロシルグルコース ($G^{1-3}G^{1-4}G$) およびニグロシルマルトース ($G^{1-3}G^{1-4}G^{1-4}G$) を主体とするオリゴ糖製品が開発されている。これらのオリゴ糖はそれぞれ特有の性質を有しており例えば塩慣れ効果などの新しい応用が開かれつつある。グルコシダーゼの転移反応についてはその起源によって、転移反応の強弱や受容体特異性が異なる。例えば*Candida tropicalis*の α -グルコ

シダーゼは転移反応が強力で、澱粉とグリセリンの混合物にこの酵素を作用させると、澱粉を分解しそのグルコシル基をグリセリンのC1位の、OH基に転移させ、 α -グルコシルグリセリンを著量に合成する[38]。

α -グルコシダーゼの酵素的性質も、起源によってかなり異なるから、スクリーニングによって特性に随分異なる酵素が得られる可能性は高いと思う。また生成物の機能や特性も異なるから、実際に応用にあたって、種々試みる必要がある。

3. 2 フラクトシル基の転移

β -フルクトフラノシダーゼ (別名インバターゼ、シュクラゼ) は、砂糖 (シュクロース, $G^{1-2}F$) を加水分解してグルコースとフルクトースにする酵素であるが、起源によっては砂糖濃度が高い場合または水が少ない場合は転移反応を示すことが明らかにされた。高砂糖濃度の時は、分解と同時に、生成したフルクトースが砂糖を受容体とし、その転移生産物は、砂糖に1分子のフルクトースが結合した1-kestース ($G^{1-2}F^{1-2}F$) であり、さらに反応が進むと、次のこのkestースを受容体となり、2分子結合したニストース ($G^{1-2}F^{1-2}F^{1-2}F$) が生成される[39]。さらにフルクトシルニストースも生成する。これらのフルクトオリゴ糖はヒト小腸酵素では消化されずに、大腸に達する。大腸内には通常約100種類、100兆個の細菌が棲息している、この中にはいわゆる悪玉と善玉の両者がいる。勿論善玉が悪玉より優勢であることが、腸内細菌叢として好ましいことであり、健康を維持する上で重要なことである。最も好ましい腸内細菌叢は、母乳で育っている健康な乳児のそれである。細菌的にはビフィズス菌が多数を占め、クロストリジウムの様な悪玉菌は少ない、しかし大人になるとビフィズス菌数が減少し、悪玉菌が増加し、排泄物は悪臭を放つようになり、発ガン性物質の腸内蓄積も大になる。誠に好都合なことに、上記したフルクトオリゴ糖は悪玉菌が利用できずに、善玉菌のビフィズス菌のみが利用し増殖する、その結果腸内細菌叢は浄化されて、排泄物の臭気が少なくなる等の利点があり、新規に制定された「特定保健用食品」に、いち早く指定されている(1993年)。

この酵素の性質は起源によって、転移活性の強弱、受容体の特異性などに於いて幾分差がある。我々が分離した *Asp. oryzae* KB菌は、2種の酵素を生産しその1つは、pH 5.0の酸性側で作用させると、加水分解活性が強く、転移反応により同様のオリゴ糖を生成するが時間と共に加水分解し、蓄積されないが、pH 8.0で作用させると、加水分解活性が弱く、転移生

成物の蓄積が起こり転移糖生産に好適である[40]。またこの酵素はN-アセチルグルコサミンを良く受容体としてフルクトシル N-アセチルグルコサミンを効率よく生産する。*Arthrobacter* sp. K-1の生産するβ-フラクトフラノシダーゼは、他の起源の一般の糸状菌酵素とはかなり特異性が異なり、砂糖にキシロース、ガラクトース、乳糖等を加えて作用させると、砂糖のみの時のようにケストースは殆ど生成せずキシロスクロースや、乳糖に砂糖のフラクトースが結合したヘテロオリゴ糖（乳果オリゴ糖と呼ばれている）を生成する。このオリゴ糖もまた特定保健用食品として認められている[41]。またこの酵素は、先述の如くステビオグルコサイドの19位のカルボキシル基に、フラクトースを転移し、フルクトシルステビオサイドを合成し、味質が改善されることが利用されている。

3.3 ガラクトシル基の転移

β-ガラクトシダーゼは乳糖（ラクトース）をガラクトースとグルコースに加水分解する酵素であるが、基質濃度を高濃度にするると転移反応が起こり、ラクトシルラクトースのようなオリゴ糖を生産する。

*Asp. oryzae*の生産するβ-ガラクトシダーゼは乳糖分解酵素であるが、高濃度の乳糖溶液に作用させると、乳糖を分解し、そのガラクトシル基を乳糖（β-Gal 1'-4-G）のガラクトース基のC6位、または3位にβ-結合させて、3糖のガラクトシルラクトースを生成する[42]。*Lipomyces starkei*のβ-ガラシダーゼは同様に乳糖のガラクトースのC4位にガラクトース基を転移する[43]。これらのガラクトオリゴ糖は前述のフラクトオリゴ糖と同様に小腸で吸収されずに大腸に運ばれて、ビフィズス菌に選択的に資化されて、大腸内の菌叢の浄化作用に効果的であり”特定保健用食品”に認定されている。

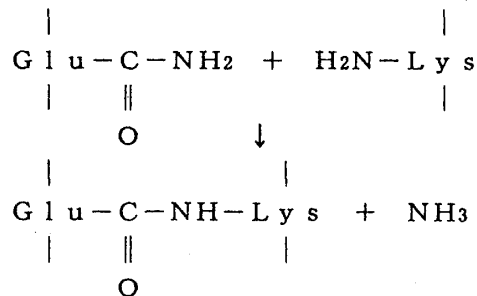
*Mortielera vinacea*の生産するα-ガラクトシダーゼは、ビート（砂糖大根）の抽出液中に含まれて、砂糖の精製結晶析出に阻害的に働く夾雑物ラフィノース（Gal 1'-6-G 1'-2-F）を加水分解してガラクトースと蔗糖にすることで蔗糖の結晶化を容易にするのに利用されている[44]。この酵素もまた転移作用を示し各種の単糖類、2糖類にα-1,6結合でガラクトース基を転移する。

3.4 アミノアシル基の転移反応の利用、トランスグルタミナーゼ（EC. 2. 3. 2. 13）の利用

アミノアシルトランスフェラーゼの一種で、ポリペチド鎖中のグタミン残基中の、γ-カルボキシアミド基と、各種の一般アミン間のアシル転移反応を触

媒する酵素である。アシル受容体として蛋白質中のリジン残基のアミノ基が作用すると分子内もしくは分子間に架橋結合が生成され、あたかも”糊の機能”を示す。1989年に味の素社及び天野製薬社が微生物により生産されることを発見し工業生産を始めた[45]。

例えば、豚のヒレ肉の表面に、この酵素剤を塗布したのち、3本分を合わせて密着させ、薄プラスチックフィルムで包んだ後、冷蔵庫で一晩放置する事で酵素作用により3本のヒレ肉が1本に接着される。これを筋に対して直角に切断すると通常の3倍の面積の大きなヒレカツができる。酵素作用の最適温度は40～50℃であるが豚肉をこの温度で処理することは好ましくないため冷蔵庫内で反応させる。接着した豚肉は70～200g/cm²の引っ張り強度を有しており、通常の調理中にはがれることはない。魚類、植物蛋白についても同様に広い範囲に応用できる。



トランスグルタミナーゼによる蛋白分子間架橋

3.5 その他の転移反応の利用

キシロシダーゼはキシランの非還元性末端からエクソ型に作用してキシロースを分解遊離する酵素であるが、キシロビオース（β-X 1'-4-X）を基質として転移反応をする。*Asp. awamori* K4菌は、ソルビトール、マンニトール およびトレハロースの非還元性側のC4位にキシロースを転移する[46]。

リゾチーム（β-(1-4)-N-アセチルグルコサミダーゼ EC 3.2.1.17）は溶菌酵素として発見された酵素で、医薬品として消炎剤に利用されているが、細菌細胞膜の構成成分である、多糖類の加水分解を触媒する。すなわちN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸とのβ-1,4結合を切断する。この酵素も30%の硫酸中で転移反応し、キトオリゴ糖（6～7糖）を合成することが知られている[47]。

これらの転移生成物がどのような機能をもっているのか等についての特性について、まだまだ研究しなければならないことが多い。

4. 酵素作用を利用した調味料の生産

食品加工において大量利用されている天然調味料の

製造には酵素が重要な役割を果たしている。

動物・魚介類のエキス製造にはプロテアーゼ系（蛋白分解酵素）が利用されている。植物エキス製造にはセルラーゼ系（繊維素分解酵素）やヘミセルラーゼ、ペクチナーゼが、酵母エキスの製造には核酸分解酵素系、プロテアーゼ系およびデアミナーゼが、アミノ酸製造にはプロテアーゼ系およびグルタミナーゼが利用されている。

いずれのケースでも目的に合致した基質特異性を有する酵素を選んで利用しなければならない。動物・魚介類のエキス製造では、原料の可溶化目的には *B. subtilis* 起源の細菌プロテアーゼが適している。呈味性を目的にするときには糸状菌起源のものが適している傾向にある。ほとんど捨てられていた甘海老頭からエキスの抽出には、*Aspergillus* 属 および、*Penicillium* 属の産生するプロテアーゼが適している。その他の原料としての、肉、魚肉、廃鶏肉や、マグロの煮汁、カニ煮汁、鯉節カスの場合も同様で、起源の異なるプロテアーゼを組合せることである。これは個々のプロテアーゼによって分解するペプチド結合の位置が異なるからである。グリシン、アラニン、グルタミン酸のような呈味性アミノ酸の増加が重要であり、グルタミンをグルタミン酸にかえるグルタミナーゼの活用も行われている。また、ロイシンやフェニルアラニンのような疎水性アミノ酸の多い蛋白の分解物中には苦みがでることが多い。この場合はカルボキシペプチダーゼを用いて、ペプチドの末端基の疎水性アミノ酸を切断除去することで苦みを消去できる等の応用が行なわれている。

ビール工場で大量排出されている酵母から酵母エキスの製造には、DNA、RNAを分解するヌクレアーゼを用いてアデニル酸、グアニル酸を生成させ、このアデニル酸をデアミナーゼを用いて呈味性のイノシン酸に変換することなどが実施されている。

以上述べたような、これらの目的に適した酵素剤が工業的に生産され市販されている。

5. 食品衛生法上の酵素の規制

食品衛生法の見解では「化学反応」とは、物質それ自身または他の物質との相互作用によって、別の物質にする現象で、大別すれば「合成」及び「分解」がある。「酵素反応」は「化学反応」に含まれる。

食品衛生法の第6条が改正されて次のようになった。

「人の健康を損なうおそれのない場合として厚生大臣が食品衛生調査会の意見を聴いて定める場合を除いては添加物並びにこれを含む製剤及び食品は、これを販売、または販売の用に供するために、製造し、輸入し、加工し、使用し、貯蔵し、若しくは陳列してはならな

い」ここで添加物とは「天然香料及び一般に食品として飲食に供されるものであって添加物として使用されるものを除く」とある。

平成7年5月現在で、指定された化学合成品たる添加物は348品目で化学合成品以外の添加物、いわゆる天然添加物は1,051品目である。

食品添加物規制の見直しと共に既存添加物の名簿が発表されたが、489件の中に酵素の名前は、74件記載されている。

食品産業バイオリアクタシステム技術研究組合の自主ガイドラインでは次のようになっている。

「生体触媒」微生物や動植物由来の酵素、細胞及び組織を含む。

「酵素級別」

- 1：食品として普通に用いられている動物の可食組織から得た酵素
- 2：植物の可食部分から得た酵素
- 3：食品の一部として伝統的に受け入れられている微生物や、食品製造工程に普通に用いられている微生物より得た酵素、またはその他の微生物より得た食品製造に用いられている酵素。以上は安全性が高く、食品と見なしうる。ただし適切な化学的、微生物学的規格明細の確立が急務。
- 4：食品中に普通の混在する非病原性微生物から得た酵素。ただちに食品とは見なし得ない。適切な化学的微生物学的規格の確立と必要に応じて長期間の毒性試験等を含んだ広い範囲の安全性試験による評価が必要。
- 5：その他の非病原性微生物から得た酵素。

4と同様

勿論酵素を製造する側ではその使用菌株が、安全性に於いて問題の無い菌種を選ばなければならないことは当然の義務である。

6. 結び

工業的に応用されている酵素の利用について述べたが、有機反応への利用、医薬への利用など書き尽くせないことが多々あるが、これからも新しい機能を有した酵素が次々と発見されて産業界に貢献するであろうことを、大いに期待して結びとしたい。

参考文献

- [1] Takamine, J. : Ind. Eng. Chem. , 6, 824 (1914).
- [2] Boiden, A. and Effront, J. ; 仏特許399087 (1908) 475431 (1915) 米特許1227374, 1227527 (1917)
- [3] 喜多 : Ind. Eng. Chem. , 5, 220 (1913)
- [4] 北野 : 工化 38, 873, 878, 884, 1044, 1049, 1055,

- (1935) 39, 43, 318, 802, (1936) 40, 70 (1937)
- [5] 徳岡：農化 13, 589 (1937), 麹学 19, 791, 925 (1941) 20, 14, 219, (1942)
- [6] 北原, 久留島：醸工 27, 1, 6, 213, 254 (1949) 28, 106, 388, 422, (1950) 30, 72 (1952) 32, 473 (1954)
- [7] Phillips, L. L. & Caldwell, M. L. : J. A. C. S., 73, 35 59, 3563 (1951)
- [8] Kerr, R. W. Cleveland, F. C. & Katzbeck, W. J. : J. A. C. S., 73, 3916 (1951)
- [9] 福本寿一郎, 辻坂好夫：科学と工業 28, 92, 285 (1954) 29, 268, 273, (1955) 30, 130, 398, (1956) : 酵素化学シンポジウム 9, 94 (1954) 13, 84 (1958), Nature 181, 70 (1958)
- [10] 小巻利章：澱粉工業学会誌, 4, 9, (1956), 6, 91, 64 (1959) Agric. Biol. Chem., 32, 123, 314, 860 (1968)
- [11] 天野, 大沼, 島村, 日農化講演要旨集, 129, (1966) 特許公昭46-12946 (1971)
- [12] Saito, N. Arch. Biochem. Biophys., 155, 290, (1973)
- [13] Madsen, G. Norman, B. E., Slott, S., Sterke 25, 304, (1973)
- [14] 服部, 中村, 田治, 野尻, 中井, 草井, アミラーゼシンポジウム79 (1974) 特許公昭53-2955 (1978)
- [15] Marshall, R. O., Kooi, E. R., : Science, 125, 648, (1957)
- [16] Tumura, N. Sato, T. Bull, Agric, Chem., Japan, 24, 326 (1960)
- [17] 高崎, 田辺：農化, 36, 1010 (1962); 37, 89, 93 (1963)
- [18] 山中：農化, 37, 231, 237, (1963)
- [19] Kusai, K. Sekuzu, I. Okunuki, K. Hagihara, B. Nakai, T. & Yamauti, S.; Biochem. et Biophys. Acta, 40, 555 (1967) :
- [20] 吉野善市：特許公開 昭60-92299 (1985)
- [21] 久保田倫夫, 仲田哲也, 堺修三：特許公開昭63-240784 6 (1988)
- [22] Young, S., : New Scientist, 31, Oct, 40, (1985)
- [23] Crowe, J. H., : Biochem. Biophys. Acta., 947, 367, (1988)
- [24] 杉本利行：食品工業, 38, 34, (1995), バイオサイエンスとインダストリー, 53, 25 (1995) EP, 0606753 A2, EP, 0628630 A2, 特許公開平7-143876, 170977, (1995)
- [25] 小巻利章：油脂, 23, 113, (1970), : 科学と工業, 54, 56, (1980) フレグランスジャーナル, 42, 51, (1980)
- [26] 戸田不二緒監修：“シクロデキストリン基礎と応用” 303, (1995 産業図書)
- [27] 岡田茂孝, 北畑寿美雄：日本食品工業学会誌, 22, 420, (1975)
- [28] Darise, M., Mizutani, Kenji., Kasai, R., Tanaka, O., Kitahata, S., Okada, S., Ogawa, S., Murakami, F., & Chen, FH., : Agric. Biol. Chem., 48, 2483, (1984), Ohtani, K., Aikawa, Y., Ishikawa, H., Kasai, R., Kitahata, S., Mizutani, K., Doi, S., Nkakura, M. & Tanaka, O., : Agric. Biol. Chem., 55, 449 (1991)
- [29] Ishikawa, H., Kitahata, S., Ohtani, K., Ikuhara & Tanaka, O. : Agric. Biol. Chem., 54, 3137, (1989)
- [30] Kitahata, S., Okada, S., and Fukui, T., : Agric. Biol. Chem., 42, 2369 (1978)
- [31] 三宅俊雄, 土屋裕美：特許公開昭58-870, (1983)
- [32] 米山 勝, 鈴木孝雄, 鈴木 綱, 三宅俊雄：特許公開平3-27293 (1991),
- [33] 原浩司, 藤田孝輝, 中野博文, 桑原宣洋, 小泉京子, 北畑寿美雄：日農化講演要旨 p 97, (1992)
- [34] Aga, H., Yoneyama, M., Suzuki, A., and Yamamoto, I., : Agric. Bio. Chem. 55, 1751 (1991)
- [35] 浜田, : 食品工業, 28, 16, 25, 34, (1983)
- [36] 中島良和；澱粉科学, 35, 131, (1988)
- [37] 千葉誠哉, 下村得治：アミラーゼシンポジウム, 7, 51 (1972)
- [38] Sawai, T., & Hele, E. J., J. Biol. Chemi. 237, 2047, (1962)
- [39] Hidaka, H., Hirayama, M., & Sumi N., : Agric. Biol. Chem., 52, 1181 (1988)
- [40] Kurakake, H., Onoue, T., Komaki, T., : Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 236 (1996)
- [41] Fujit, K., Hara, K., Hashimoto, H., & Kitahata, S. Agric, Biol, Chem., 54, 913, (1990), Ando, H., et. al. : Agric. Biol. Chem., 53, 2513, (1989)
- [42] 松本圭介, 小林洋一, 田村なつ子, 渡邊常一, 菅辰彦：澱粉科学, 36, 123, (1989)
- [43] Dombou, M., Yamamoto, H., Nakajima, H., Tanaka, K., & Komaki, T., : Denpun Kagaku, 38, 365, (1991)
- [44] Suzuki, H., Ozawa, Y., Oota, H., & Yoshida, H., Agric. Biol. Chem., : 33, 506 (1969)
- [45] Andou, H., et al., : Agric. Biol. Chem., : 53, 2513, (1988)
- [46] Kurakake, M., Osada, S., & Komaki, T., Biosci. Biotech. Biochem., 61, 2010, (1997)
- [47] Usui, T., Matsui, H., & Isobe, K., : Carbohydr. Res., 203, 65 (1990)