

# ブランチングエンザイムの実用化と 高度分岐環状デキストリン (クラスターデキストリン™) の開発

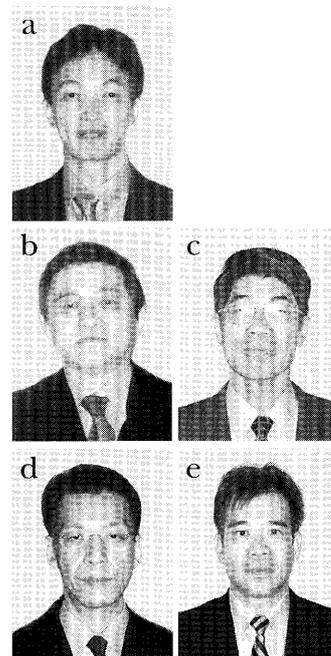
高田 洋樹<sup>1a</sup>・小島 岩夫<sup>1b</sup>・田治 襄<sup>2c</sup>・  
鈴木 裕治<sup>3d</sup>・山本 幹男<sup>4e</sup>

## Industrial Production of Branching Enzyme and Its Application to Production of Highly Branched Cyclic Dextrin (Cluster Dextrin™)

HIROKI TAKATA<sup>1</sup>, IWAO KOJIMA<sup>1</sup>, NOBORU TAJI<sup>2</sup>, YUJI SUZUKI<sup>3</sup>,  
and MIKIO YAMAMOTO<sup>4</sup> (Biochemical Research Laboratory, Ezaki  
Glico Co., Ltd., 4-6-5 Utajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka 555-8502<sup>1</sup>; KTB Consulting, 3-10-10  
Sakura, Minoh, Osaka 562-0041<sup>2</sup>; Process Engineering Division, Nagase ChemteX Corporation, 1-52  
Osadano-cho, Fukuchiyama, Kyoto 620-0853<sup>3</sup>; Research Institute, Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., 30  
Tajima, Fuji, Shizuoka 417-8530<sup>4</sup>) Seibutsu-kogaku **84**: 61-66, 2006.

Starch is a mixture of two distinct polymers, amylose and amylopectin. Amylose is an essentially linear glucose polymer of which the glucosyl units are connected by  $\alpha$ -1,4-glucosidic linkages. Amylopectin on the other hand is a branched polymer composed of short amylose chains connected together with  $\alpha$ -1,6 linkages to form a characteristic cluster structure. Starch is often processed using enzymes to produce glucose, maltose, maltooligosaccharides, maltodextrin, or dextrin, which have been used in various industries including the food, pharmaceutical, paper, textile, cosmetics, and chemical sectors. The enzymes used in the relevant processes have mainly been hydrolytic enzymes such as  $\alpha$ -amylase. We have focused instead on the potential of transferases as starch-processing enzymes, and in 1993 started development of branching enzyme, a member of the transferase group. Branching enzyme (BE, EC 2.4.1.18) is involved in the formation of branch linkages ( $\alpha$ -1,6 linkages) of starch and glycogen *in vivo*. In the course of studies of BE action on amylopectin, however, we found that BE acts mainly on the inner chains connecting the cluster units of amylopectin. This reaction results in cyclization of the inner chains and degradation of amylopectin to large cyclic glucans with a limited molecular size (highly branched cyclic dextrin, HBCD). The productivity of the original BE strain was improved several thousand-fold through mutagenesis and optimization of culture conditions. Scale-up of cultivation was also achieved. After researching an industrial-scale production process for HBCD, it was launched on the Japanese market in 2002 as a food material with the trade name of Cluster Dextrin™. Cluster Dextrin is used, among other applications, for improvement of taste, as a component of sports drinks, and as a spray-drying aid.

[**Key words:** branching enzyme, dextrin, *Bacillus stearothermophilus*, scale-up]



著者紹介 <sup>1</sup>江崎グリコ株式会社生物化学研究所 E-mail: takata-hiroki@glico.co.jp

<sup>2</sup>KTBコンサルティング (元ナガセ生化学工業株式会社), <sup>3</sup>ナガセケムテックス株式会社生産本部, <sup>4</sup>日本食品化工株式会社研究所

## はじめに

デンプンは、グルコースが $\alpha$ -1,4グルコシド結合によりおおむね直鎖状に結合したアミロースと、短いアミロースが $\alpha$ -1,6結合を介して多数結合した高分岐多糖であるアミロペクチンからなる。アミロペクチンは、図1に示すような房状構造（クラスター構造）が多数連結された巨大分子であり、アミロースとアミロペクチンの存在比やアミロペクチンの分岐構造は、植物種により違いがあるため、デンプンの物性や特徴は由来する植物ごとに異なっており、その用途に応じて使い分けられている。さらにデンプンは用途に応じ、化学的、物理的、あるいは酵素的に加工されている。酵素加工には、これまで主としてアミラーゼなどの加水分解酵素が利用されており、グルコース、マルトース、マルトオリゴ糖、デキストリンなど、種々のデンプン分解物が製造されている。これらのうち、デキストリンは、粉あめ（DE 20～40程度）、マルトデキストリン（DE 10～20程度）、デキストリン（DE 10以下）と細分類されることもあり、食品産業において固形分調節、甘味の調節、ボディ感の付与、あるいは粉末化基剤などとして、さまざまな目的に広く利用されている<sup>2)</sup>。（なお、DEは dextrose equivalentの略であり、デンプンの糖化率を示す数値である。直接還元糖〈グルコースとして算出〉/全固形分 $\times$ 100の式で算出する。）しかしながら、特に低分解度のものについては、溶解性の低さ、冷蔵や冷凍融解時の老化による白濁や沈殿、あるいは粉臭などの問題点もある。

クラスターデキストリン<sup>TM</sup>は、ほぼアミロペクチンのみからなるモチ種トウモロコシのデンプン（ワキシーコーンスターチ）をブランディングエンザイム（EC 2.4.1.18 以下、BEと略）により加工して得られる食品用デキストリンである。BEは、動植物、微生物に広く分布

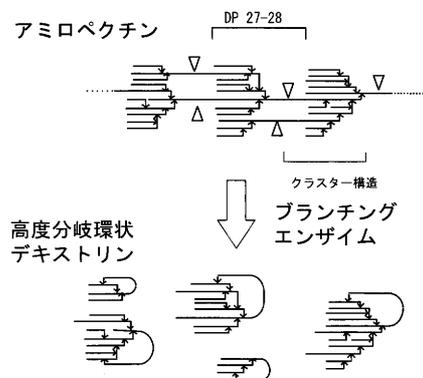


図1. アミロペクチンの構造とブランディングエンザイム（BE）の作用（模式図）。水平線および曲線： $\alpha$ -1,4-グルコシド結合で連結されたグルカン鎖（個々のグルコース残基は省略）。矢印、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合；白三角、BEの作用点。

するグルカン鎖転移酵素であり、生体内ではデンプンやグリコーゲンの $\alpha$ -1,6-グルコシド結合（分岐結合）合成に関与している。In vitroでの反応を調べたところ、*Bacillus stearothermophilus*由来のBEは、もっぱらアミロペクチンのクラスター構造の継ぎ目部分に作用し、これを環状化する反応を触媒した（図1）<sup>3,4)</sup>。この作用により得られる、分子量3万から100万のデキストリンを高度分岐環状デキストリンと名づけた。クラスターデキストリンは、高度分岐環状デキストリンを90%程度含有しており、通常のデキストリンと比較して、

- 1) 分子量分布が狭い（図2）。
- 2) 水によく溶け、その溶液は安定性がきわめて高い（図3）。
- 3) デンプンに由来する雑味や粉臭が少なく、オリゴ糖に由来する甘味も少ない。
- 4) 浸透圧が低い（10%（w/v）溶液での測定例：9mOsm。DE16デキストリンの10%（w/v）溶液での測定例：117mOsm。）<sup>9)</sup>

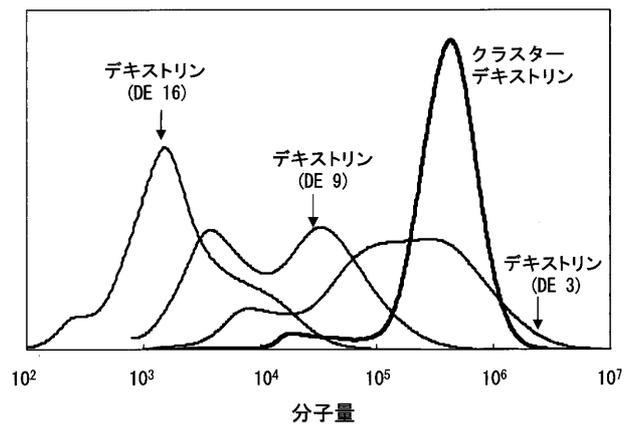


図2. 各種デキストリンの分子量分布の比較

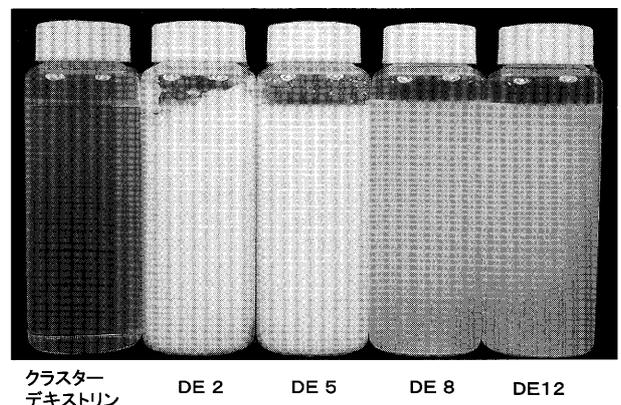


図3. 各種デキストリンの溶液安定性。5重量%の溶液を調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結、室温で解凍のサイクルを3回繰り返した。クラスターデキストリン溶液は透明状態を維持したのに対し、他のデキストリンは白濁している。

という性質を有している。

クラスター デキストリンの開発は、江崎グリコ (株)、ナガセテムテックス (株)、日本食品化工 (株) の3社共同により行い、2002年より市販を開始した。スポーツドリンクの成分、粉末化基剤、味質改良剤などとして高い評価を得、その売上げは順調に伸びつつある。本稿では、クラスター デキストリン発見の経緯、大量製造方法確立の経緯について述べると共に、クラスター デキストリンの機能と利用例についても簡単に紹介する。実際の製造条件などについては、企業秘密に該当する部分が多々あり、詳細を記すことができない。ご了解の上、ご容赦いただきたい。

### クラスター デキストリンの発見

江崎グリコはその社名をグリコーゲンからとっている。グリコーゲンは動物や微生物の貯蔵多糖であり、デンプンと同様化学的には $\alpha$ -1,4/1,6 グルカンである。しかし、アミロペクチンに比べ約2倍の分岐を持ち、全体として球状の構造をとっているといわれる。私達は、以前よりこの多糖には興味を持っていた。特に、BEがアミロペクチンとグリコーゲンの差の鍵となる酵素であると考え注目していた。そこで、土壌よりBE生産好熱性菌を分離するところから研究を開始した。最終的に選択したTRBE14株は*Bacillus stearothermophilus*と同定された<sup>5)</sup>。

転移酵素の作用検討には、微量のアミラーゼなど加水分解酵素の存在が大きな影響を与える。そこで、まずBE構造遺伝子のクローニングと、遺伝子発現系の構築を行った<sup>5)</sup>。得られた精製BEをアミロペクチンに作用させたところ、急激な粘度低下が観察された(図4)<sup>6)</sup>。当初は、狙い通りグリコーゲン様の多糖が合成されたのではないかと考えた。しかし、詳細な構造分析の結果、図1

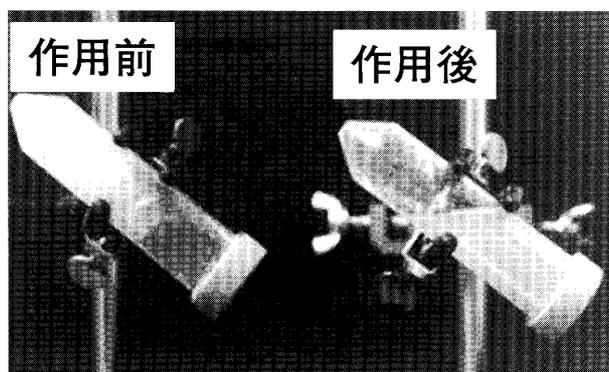


図4. ブランチングエンザイム (BE) によるアミロペクチンの粘度低下。10 g のワキシーコーンスターチを20 ml の緩衝液中で加熱し糊化した。ここに緩衝液 (左) またはBE液 (右) を添加し、50°C で16時間静置し、粘度を観察した。BEの作用により粘度が大幅に低下し、液状となった。

に示すような、高度に分岐した環状糖質が生成していることが分かった<sup>5,6)</sup>。すなわち、BEはクラスター構造の継ぎ目にもつばら作用し、これを環状化することによりアミロペクチンを低分子化していたのである。偶然から生まれたクラスター デキストリンであったが、先述のような有用な性質が見いだされたことから工業化の検討をはじめた。

### ブランチングエンザイムの大量製造方法開発

元菌株*B. stearothermophilus* TRBE14株のBE生産性は非常に低かった。計算では1トンの培養液から得られる酵素では、2.5 kgのクラスター デキストリンしか作れない。酵素作用の検討に用いた組換え株の活性もその数10倍にすぎなかった。したがって、まず菌株の改良が必須であった。

菌株改良法としては、伝統的な突然変異誘発法と遺伝子組換え技術を用いる方法がある。開発当時、組換え技術の食品への利用が受け入れられるには、相当な時間がかかると考えた。そこで、手間と時間がかかることは予想されたものの、突然変異誘発法を用いることに決定した。

変異原としてニトロソグアニジン、またはエチルメタンシルホン酸を用い、定法により変異処理を行った。プレートアッセイ法の開発はできなかったため、コロニーを1個ずつ試験管で培養し、力価を検定する方法をとった。得られた高活性株を次の変異処理にかけていった。このような処理を200回近く繰り返し、最終的に約5000倍に活性の上昇した株を得ることができた(図5)。得られた株は孢子形成能を失っており、生育温度範囲、pH範囲も変わるなど大幅に性質が変わっていた(表1)。しかし、クラスター デキストリン製造に邪魔となる酵素

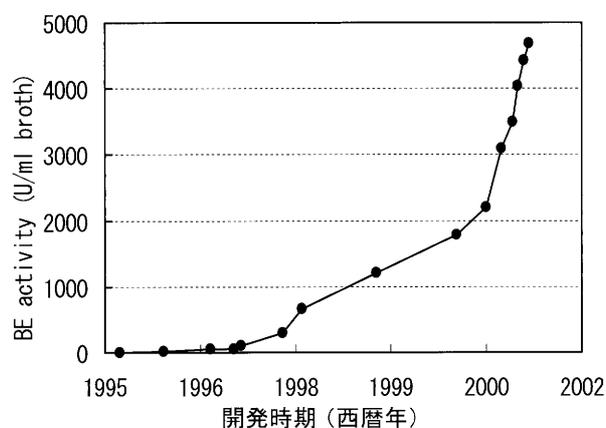


図5. 変異誘発処理によるブランチングエンザイム生産性の改良。開発途中の代表的な変異株のBE生産性(試験管培養)をプロットした。

表1. 選択した変異株の性質

	親株	変異株
形態	桿菌	桿菌
グラム染色	+	+
胞子	+ (楕円形)	-
カタラーゼ	-	-
嫌気下での生育	-	-
ゼラチン分解性	+	-
カゼイン分解性	+	-
デンプン分解性	+	+
pH6.8 での生育	+	+
pH5.7 での生育	-	+
硝酸塩の還元	+	+
5% NaCl 存在下での生育	-	+
40°C での生育	+	-
50°C での生育	+	+
60°C での生育	+	+
65°C での生育	+	-
GC 含量	48%	48%

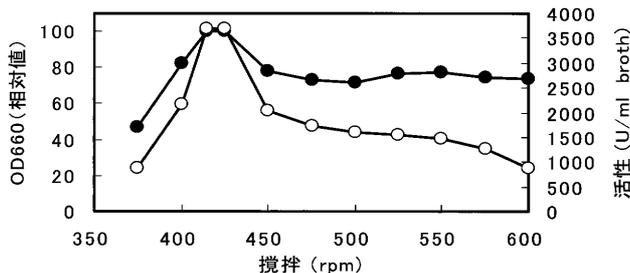


図6. 3 lジャーを用いた培養条件の検討. 培地, 培養温度, 通気量などの諸条件を固定し, 攪拌速度を変化させて培養を行った. それぞれにおける最高の濁度 (660 nm) と活性をプロットした. ●, 相対OD660; ○, 活性.

( $\alpha$ -アミラーゼなど)の増加は起こっていない株を選択することができた. このことは, 以降のBE製造工程検討においても重要であった. すなわち, 複雑な精製工程を要することなく, クラスターデキストリン製造が可能なBE製剤を得ることが可能となった.

変異株の取得と並行して培地の検討, ジャーによる培養条件の検討, 培養スケールアップの検討も進めた. 数トンレベルまでのスケールアップは比較的順調に行うことができたが, 実製造レベル(数10トン)では非常に活性が低くなってしまいう問題が起こった. そこで再び3~5 lジャーの規模に戻って検討を行った. 図6は, その一例であり培地, 培養温度, 通気量などを固定し, 攪拌速度を変化させた実験結果である. この図から明らかのように, 最適な攪拌速度の幅は10 rpmほどしかない

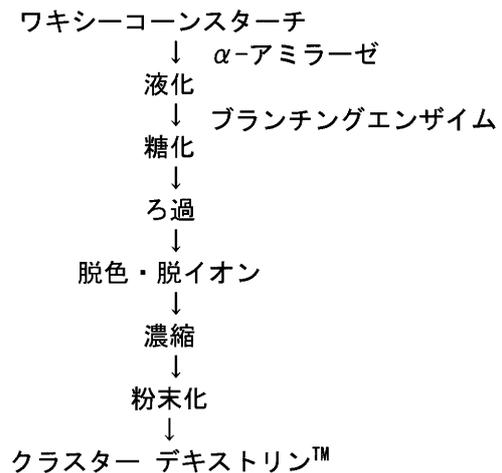


図7. クラスターデキストリンの製造工程概略

ことが分かった. この狭い培養条件を実製造レベルで実現することは, 攪拌速度の変更だけでは難しく, 培養温度や通気量を総合的に調整して, 最適な培養条件を設定することができた.

#### クラスターデキストリンの大量製造方法開発

図7にクラスターデキストリンの製造工程概略を示す. この工程は通常のデキストリン製造工程と基本的には同じであり, 大きな設備投資は不要であった. しかしながら, 酵素の使用条件, 反応条件, 生成物の精製工程など, ほとんどの工程で最適化のための調整が必要であった.

#### クラスターデキストリンの機能と利用

先述のようにクラスターデキストリンは通常のデキストリンと比較して異味異臭が少なく, 水溶性が高く, かつその溶液の安定性も高い. また, 低分子糖質が少ないため, 低甘味で着色しにくく浸透圧が低い. 以上の特徴は飲料への利用に適していることを示している. さらに, 本デキストリンには持久力増強効果があることが示されている. すなわち, クラスターデキストリンまたはグルコースをそれぞれ同量溶解した溶液をマウスに投与した後, 流水プールで泳がせて限界遊泳時間を測定した結果, クラスターデキストリンを投与したマウスは, グルコース投与に比べて限界遊泳時間は約2割伸びることが示されている<sup>7)</sup>. またビタミンやミネラルを添加しても, 適度な浸透圧に調整しやすいため, 胃から腸への移行が早く, 胃もたれのしにくい飲料を設計できる<sup>8,9)</sup>. これらの性質を利用して, 江崎グリコでは, クラスターデキストリンを高濃度に配合したスポーツ飲料(CCDドリンク)を開発した(図8). 野球, レスリング, トライアスロンなどのプロを含むトップアスリートやスポーツ愛



図8. クラスタールデキストリンを利用したスポーツドリンク

好家の方々に好評を頂いている。

また、クラスタールデキストリンは通常のデキストリンと比較して、粉末化基剤としてすぐれていることが分かった。たとえば油脂の粉末化基剤として用いた場合、高油脂含量の粉末を調製可能であり、得られた粉末油脂は粉体流動性が高く、褐変やブロッキングをおこしにくく、かつ水への分散性も高いという良好な性質を持っていた<sup>10)</sup>。さらに、油脂の酸化安定性を高める効果もあった。また、香料の粉末化に用いたところ、保存後も香気の保持率の高い粉末を調製することができた。以上の性質は、クラスタールデキストリンが乾燥しやすく、吸湿しにくいこと、高い皮膜形成能を持つこと、分子量分布が狭く低分子オリゴ糖や高分子成分が少ないことによる複合的な効果であると考えられる。

最後に、クラスタールデキストリンの味質改良効果について紹介する。本デキストリンは食品の酸味、苦味、甘味などをマイルドにする効果を持っている。たとえば、強度の酸味は「酢かど」と言った言葉で表されるように、かどがあり、不快味として感じられる場合があるが、クラスタールデキストリンはpHを変化させずに酸味を抑える効果を有する。たとえば、酸味飲料に0.5～3%程度添加した場合、酸味が抑えられてまろやかになり、飲みやすくなったということが官能評価により示された<sup>11)</sup>。また、茶カテキンの渋味を軽減する効果があることが、官能評価および味覚センサーを用いた評価により示された(図9)。これらの効果は、BEの高い特異性により、クラスタールデキストリンが比較的長い外部鎖を有するためと考えられる。すなわち、クラスタールデキストリンの外部鎖が溶液中でらせん構造をとり、その中に低分子物質をとりこむためと推定している。

このような味質改良効果は、重合度6～8のシクロデキストリンにおいてよく知られている。すなわち、シクロ

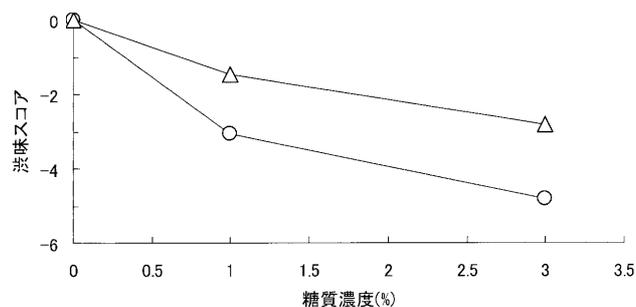


図9. クラスタールデキストリンによる味質改良効果。市販の茶カテキン製剤0.13%を純水に溶解し、1または3%になるように各糖質を溶解し、味覚センサー(株)インテリジェントセンサーテクノロジー社製)により、渋味を測定した(スコアが小さいほど渋味が低い)。渋味スコア1目盛りはウェーバー比20%に相当する。なお、ウェーバー比20%とは人間が識別可能な限界濃度差を意味する。○、クラスタールデキストリン；△、通常デキストリン。

デキストリンは、その疎水性空洞部分に低分子物質を包接することにより味質改良効果を発揮する。しかし、シクロデキストリンは、場合によっては包接能が強すぎて、食品の好ましい風味まで抑えてしまうことがある。クラスタールデキストリンは、溶液中での安定性が高く、粉っぽさを感じにくいこと、デキストリン特有の粉臭などの異味異臭も持たないという利点があり、適切に使用いただくことにより各種食品の味質を改良し、まとまりの良い飲食品を作ることが可能となる<sup>12)</sup>。

### おわりに

クラスタールデキストリンは、従来のデキストリンの持つ溶解性の低さ、冷蔵や冷凍融解時の老化による白濁や沈殿、あるいは粉臭などの問題点を改良した特性を持つ安全な食品素材である。これまでに、スポーツ生理学的な機能、呈味や風味、テクスチャー改善といった機能や、粉末化基剤としての良好な特性などが見いだされてきた。これらの機能は、さらに新しい飲食品への応用や食品のみならず、医薬化粧品、工業素材に対する幅広い可能性を提供してくれるものと考えている。また、BEはクラスタールデキストリン製造以外にも大きなポテンシャルを持った酵素であると考えている。さらに利用法の検討を進めていきたい。

クラスタールデキストリンの開発において、終始ご指導を頂きました京都大学大学院工学研究科教授 今中忠行先生に深く感謝申し上げます。また、ご指導を頂きました北陸先端科学技術大学院大学教授 高木昌宏先生、鹿児島大学名誉教授 故 檜作進先生、大阪府立大学農学研究科教授 北村進一先生に深く感謝いたします。クラスタールデキストリンの機能性研究においてご指導を頂きました京都大学大学院農学研究科教授 伏木 亨先生、同教授 松村康生先生に深く御礼申し上げます。本技術賞

は、個人にというよりも技術開発チーム全体に対して頂いたものと認識しております。江崎グリコ（株）前取締役生物化学研究所長 岡田茂孝博士、生物化学研究所長 栗木 隆博士、鷹羽武史博士、中央研究所長 米谷 俊博士、滝井 寛博士、新素材営業G 芳川憲司博士、谷本秀典氏、日本食品化工（株）中久喜輝夫博士、中村信之博士、小川浩一博士、海野剛裕博士、住吉秀幸氏、藤本佳則氏、ナガセケムテックス（株）橋 佳永氏、内田和男氏、田中朋子氏、田中悟広氏、劉 曉麗博士をはじめとする本プロジェクトに貢献されたすべての方々とのこの榮譽を分かち合いたいと考えます。

## 文 献

- 1) 檜作 進：澱粉科学, **40**, 133-147 (1993).
- 2) 高橋禮治：でん粉製品の知識, p.97, 幸書房 (1996).
- 3) Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *J. Bacteriol.*, **178**, 1600-1606 (1996).
- 4) Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Hizukuri, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *Carbohydr. Res.*, **295**, 91-101 (1996).
- 5) Takata, H., Takaha, T., Kuriki, T., Okada, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3096-3104 (1994).
- 6) Takata, H., Takaha, T., Nakamura, H., Fujii, K., Okada, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 119-123 (1997).
- 7) Takii, H., Ishihara, K., Kometani, T., Okada, S., and Fushiki, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2045-2052 (1999).
- 8) Takii, H., Kometani, T., Nishimura, T., Kuriki, T., and Fushiki, T.: *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 428-431 (2004).
- 9) Takii, H., Takii-Nagao, Y., Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Kuriki, T., and Fushiki, T.: *Int. J. Sports Med.* **26**, 314-319 (2005).
- 10) Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., and Matsumura, Y.: *J. Food Sci.*, **68**, 2248-2255 (2003).
- 11) 食品新素材有効利用技術シリーズ クラスタール デキストリン® (高度分岐環状デキストリン), 菓子総合技術センター (2003).
- 12) 高田洋樹, 芳川憲司, 藤本佳則, 住吉秀幸: 食品と科学, **45**, 73-77 (2003).