

The Development of α,α -Trehalose Production and Its Applications

(Received September 19, 2003)

Michio Kubota,^{1,*} Ikuo Sawatani,¹ Kazuyuki Oku,¹ Kanou Takeuchi² and Sae Murai³

¹*Amase Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.*
 (7-7, Amase-minamimachi, Okayama 700-0834, Japan)

²*L' PLAZA, Hayashibara Shoji, Inc. (1-2-3, Shimoishii, Okayama 700-0907, Japan)*

³*C' PLAZA, Hayashibara Shoji, Inc. (1-2-3, Shimoishii, Okayama 700-0907, Japan)*

Abstract: I. The development of trehalose production from starch. Two novel enzymes, malto-oligosyltrehalose synthase (MTSase, EC 5.4.99.15) and malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase (MTHase, EC 3.2.1.141) were isolated from bacterial strains belonging to the genus *Arthrobacter*. It was found that trehalose was produced from starch by the joint reaction of both enzymes. We improved the enzyme-producing strain and established a method for the enzyme production. In order to increase the reaction yield of trehalose, several enzymes such as isoamylase and cyclomaltodextrin glucanotransferase were added into the MTSase/MTHase reaction. We succeeded in the conversion of starch into trehalose in a high reaction yield of more than 85% by the multi-enzyme reaction. In 1995, Hayashibara Co. started a mass production of trehalose crystal powder, and now the production amounts to twenty thousand tons a year. **II.** The application of trehalose. Trehalose has many good properties to improve the qualities of foods. The hydration activity of trehalose is applied to keep foods from damage by moisture or freezing. This saccharide has inhibitory actions on starch retrogradation, protein denaturation, fat oxidation and the deterioration of other nutrients such as vitamins or superoxide dismutase-like components. The interaction with minerals is applied to prevent Ca insolubilization by phosphate or Mg elution from vegetables and meat. This saccharide also masks unpleasant taste and odors in foods. The acid production from trehalose by oral microbials is low compared to that from sucrose. Experiments using an ovariectomized murine model of osteoporosis suggested that ingestion of trehalose might be effective in the prevention of osteoporosis. In addition to these applications for foods, trehalose is a useful ingredient for cosmetics and pharmaceuticals.

Key words: trehalose, malto-oligosyltrehalose synthase, malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase, mass production, application

α,α -トレハロースの生産技術の開発とその用途開発**

久保田倫夫^{1,*}, 澤谷郁夫¹, 奥 和之¹, 竹内 叶², 村井佐恵³

¹ 株式会社林原生物化学研究所天瀬研究所 (700-0834 岡山市天瀬南町 7-7)

² 株式会社林原商事 L' プラザ (700-0907 岡山市下石井 1-2-3)

³ 株式会社林原商事 C' プラザ (700-0907 岡山市下石井 1-2-3)

トレハロース (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) は、2分子のグルコースが α,α -1,1結合した非還元性のオリゴ糖で、微生物から動植物まで広く自然界に存在している。キノコ類、酵母類、酒類、味醂、大豆製品、エビ類、海藻類など食品中に含まれており¹⁾、古くから日常的に食されてきた糖質の一つである。従来のトレハロース製造は酵母の菌体から抽出し精製する方法で行われていたが、含量が低いことや抽出・精製に製造コストがかかることなどから、製品価格は高価で大量製造も困難であった。そのため、試薬や化粧品に少量用いられていただけで、とても食品原料として大量に利用することはできなかった。アミノ

酸醗酵微生物による醗酵法や、マルトース/トレハロースホスホリラーゼやトレハラーゼを用いた酵素法なども検討されていたが、いずれの製造方法も工業的大量生産には至っていなかった。

1995年、著者らは、土壌から単離した細菌 *Arthrobacter* sp. Q36株が新規なトレハロース生成酵素系を有することを報告した²⁾。その生成反応には2種類の新規酵素が関与しており³⁾、一つの酵素は、 α -1,4-グルカンの還元末端グルコースに作用し、分子内転移反応で α -1,4結合を α,α -1,1結合に変換してマルトオリゴ糖からマルトオリゴシルトレハロースを生成する malto-oligosyltrehalose synthase (MTSase, EC 5.4.99.15) であり⁴⁾、もう一つの酵素は、マルトオリゴシルトレハロースのマルトオリゴ糖部分とトレハロース部分の間の α -1,4結合を特異的に加水分解する malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase (MTHase, EC 3.2.1.

*Corresponding author (Tel. +81-86-231-6731, Fax. +81-86-231-6738, E-mail: michio@hayashibara.co.jp).

**平成15年度日本応用糖質科学会技術開発賞受賞講演

141)であることを明らかにした⁵⁻⁷⁾。MTSaseとMTHaseとが共同的に作用することによって、デンプンから効率的にトレハロースが生成することがわかり、両酵素を用いたデンプンからのトレハロースの大量生産技術が開発され⁸⁻¹³⁾、1995年、(株)林原によってトレハロースの実製造が開始された。現在、日本国内では年間約25,000トンの需要があり、食品、化粧品、医薬品などに6000を越すアイテムで利用されている。米国FDAにGRAS (Generally Recognized As Safe)の申請が受理され、欧州(EU)ではNovel Foodsとして認可されるなど世界各国で評価を受け、国際的な糖質として利用が広がっている。

本稿では、デンプンからのトレハロースの大量生産技術の開発およびトレハロースの特性と用途について紹介する。

1. 酵素生産菌

研究当初、著者らは、MTSaseとMTHaseを生産する菌株として、*Arthrobacter* sp. Q36や*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909など6菌株を見いだしていた²⁾。工業化に使用する酵素生産菌を選択するため、培養や糖化などの試験を行ったところ、*Sulfolobus*属の酵素は高い安定性を有していたが(Table 1)^{14,15)}、培養での酵素生産量がきわめて少ないことや、デンプン糖化でのトレハロース収率も数%低いこと¹⁶⁾などいくつかの欠点があった。一方、*Arthrobacter* sp. Q36は、水飴や酵母エキスなどを培地組成として通常の通気・攪拌培養して酵素生産でき、また、酵素の安定性も他の*Brevibacterium helvolum* ATCC 11822や*Rhizobium* sp. M-11の酵素より少し良好であった。そこで、*Arthrobacter* sp. Q36株を酵素生産菌として選択し、トレハロース生産の工業化を開始した。Q36株はMTSaseとMTHaseとをほぼ同時に生産し、しかも、片方の酵素だけを過剰生産することなく、両酵素活性をトレハロース生成反応に適する比率で生産した。NTG変異などで育種・改良した高生産株もほとんど同じ比率で酵素を生産した。DNA解析したところ、遺伝子は隣接して存在しオペロンを形成していることがわかり¹⁷⁻²⁰⁾、両酵素を一定の比率で生産(タンパク質合成)することとの関連が示唆された。Q36株は両酵素とも菌体内に生産し蓄積するが、培養後期に溶菌するため、溶菌によって培養液中に放出された酵

素は菌体外酵素の場合と同様に処理することができ、培養液をそのままSF膜で除菌し、UF膜で濃縮することによって酵素剤を調製することができた。しかしながら、Q36酵素を用いたデンプン糖化では、約45°Cの糖化温度でトレハロース生成反応を実施できたものの²¹⁾、50°C以上では急速に酵素の失活が起こるなど工業的製造条件としてはすこし不満が残るものであった。

Arthrobacter ramosus S34株はMTSase/MTHase生産菌を再検索して得られた株で²²⁾、先のQ36酵素と比べ、S34酵素は約10°C高い熱安定性を有し(Table 1)、デンプン糖化温度約55°Cでトレハロース生成できる酵素である。しかも、pH5付近でも比較的安定で、デンプン糖化の際に組み合わせて用いるイソアミラーゼ反応(後述)に適する性質も有していた。開発の当初、S34株の酵素生産量はきわめて低かったが、NTG変異などによる育種や培養条件の検討などによって両酵素の生産量を数千倍に高めることができた。現在、本菌株の酵素剤を用いて、デンプンからトレハロースを製造している。

2. トレハロース生産

アミロースなど α -1,4-グルカンにMTSaseとMTHaseとを作用させると、両酵素が共同的に作用して高収率でトレハロースを生成する(Fig. 1)。この反応を工業規模において、効率的で経済的に実現させるため、種々の重要な検討を加えなければならなかった。例えば、使用するデンプンの種類を検討したところ、安価で工業的に入手できるトウモロコシやタピオカ由来のデンプンがトレハロース生成に良好であった⁸⁾。また、デンプンを糊化・液化した後の加水分解率については、低い加水分解率の方が高いトレハロース生成率であった¹¹⁾。液化デンプンにMTSaseとMTHaseを作用させただけでは、酵素反応がデンプンの分岐構造(α -1,6結合)付近で止まるため、デンプンを完全に反応させることができず、トレハロース生成率は不十分であった。そこで、デンプンの分岐構造を加水分解するイソアミラーゼまたはプルラーナーゼを反応に加えてトレハロース生成を試験した。両枝きり酵素を比較したところ、イソアミラーゼを加えた反応の方が5-7%高いトレハロース生成率であった¹⁸⁾。MTSaseはマルトースやマルトトリオースにほとんど作用しないため、反応後期にはこれら低

Table 1. Enzymatic properties of MTSase and MTHase from *Arthrobacter* sp. Q36,^{4,5)} *S. acidocaldarius* ATCC 33909^{14,15)} and *A. ramosus* S34.²²⁾

	MTSase			MTHase		
	Q34*	ATCC 33909**	S34***	Q34*	ATCC 33909**	S34***
Molecular mass (Da)	81000	74000	75000	62000	59000	62000
Isoelectric point	4.1	5.9	4.5	4.1	6.1	4.7
Optimum pH	7.0	5.0-5.5	6.0	6.5	5.5-6.0	6.0
Optimum temperature (°C)	40	75	50	45	75	50-55
pH stability	6.0-9.5	4.5-9.5	5.0-10.0	5.0-10.0	5.5-9.5	4.5-10.0
Thermal stability (°C)	~40	~85	~55	~45	~85	~50

Arthrobacter* sp. Q34, *S. acidocaldarius* ATCC 33909, ****A. ramosus* S34.

分子オリゴ糖がすこし蓄積した. cyclomaltoextrin glucanotransferase (CGTase) を反応に加え, その不均化反応で低分子オリゴ糖を高分子化し, 再度 MTSase と MTHase の基質として利用できるように工夫することによって, 反応収率を数%高めることができた. 反応終期にわずかに残るグルコシルトレハロースをグルコアミラーゼでトレハロースとグルコースに加水分解し, 反応収率をさらに高めた. このように, MTSase と MTHase だけでなく種々の酵素を組み合わせることにより (Fig. 2), デンプンからトレハロースを反応収率 85% 以上で得ることに成功した. 糖化反応物の糖組成はほとんどトレハロースとグルコースであるため, トレハロースの結晶化は容易で, しかも蜜切れなど作業性もよく, トレハロース製造を高収率に実施することができた. このように独自の酵素法でデンプンからトレハロースを生成させ, それを結晶・粉末化して, 純度 98% 以上の 2 含水結晶トレハロース粉末を製品化し, 商品名『トレハ™』として市場に供給している.

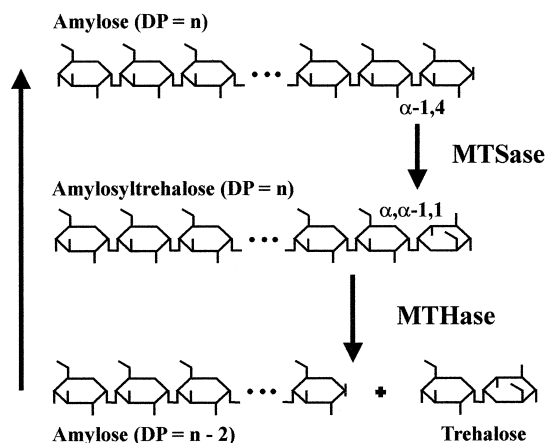


Fig. 1. Scheme of trehalose production by MTSase and MTHase.

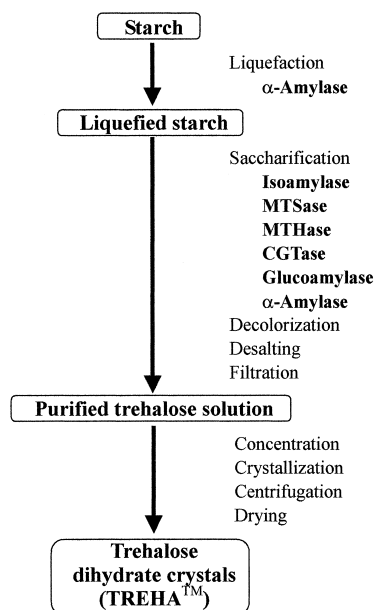


Fig. 2. Production of trehalose dihydrate crystals (TREHA™) from starch.

3. トレハロースの機能・特性

トレハロースは非還元性でメイラード反応による着色がほとんどなく, 酸や熱に安定などの物性に加え (Table 2), 食品中の種々の成分を安定化することや好ましくない変質を抑制することなどの機能・特性を有している. 特に, 水に対する作用 (水和活性) は強く, 製品中の水分活性を低下させ保湿性を高め, 保存・日持ちを向上させることや凍結・冷蔵などによって起こる離水を防止することなど²³⁾, 水分にとって好ましい機能がある. これは, トレハロース分子の水酸基が水分子と類似した構造で, 水クラスター (トリジマイト構造) に結合しやすい性質をもつためと考えられている. トレハロース結晶は, 通常, 2 含水結晶として得られるが, 水分が 10% 未満の濃縮液からは無水結晶が晶出する. また, 2 含水結晶を比較的高温で真空乾燥することで無水結晶に変換することもできる. 含水結晶はほとんど吸湿せず安定で, 無水結晶は容易に吸湿して安定な含水結晶に変わる. この無水結晶の特性は, 熱に不安定な成分を含む天然物などを加熱することなく乾燥・粉末化することに応用できる²⁴⁾. 水だけでなく, 炭水化物やタンパク質にも機能し, デンプンの老化やタンパク質の変性を抑制する作用がある²⁵⁻²⁷⁾. このような親水性の成分以外にも, 脂質, 特に不飽和脂肪酸の変敗を顕著に抑制することが見いだされ²⁸⁻³³⁾, 食品の三大栄養素すべてにトレハロースが好ましい機能を発揮することがわかった.

1) 炭水化物に対する作用

デンプンを含む食品は常温や低温に置くと, デンプンの老化によって硬化, パサつき, 白濁などが起こり, 品質が劣化する. デンプン溶液に糖質を混合し, 加熱して糊化した後, 冷所に保存し, デンプンの老化を調べたところ, トレハロースが強い抑制作用を有することがわかった²⁵⁾. 和菓子, 洋菓子, 麺類などデンプン質食品に広く利用され, 日持ち向上が認められている. また, 生米に 2% 程度のト

Table 2. Properties of trehalose.¹⁰⁾

Melting point	Dihydrate	97.0°C
	Anhydride	210.0°C
Heat of fusion	Dihydrate	57.8 kJ/mol
		53.4 kJ/mol
Specific rotation		$[\alpha]_D^{20} + 199^\circ$ ($c = 5$)
Solubility		68.9 g/100 g H ₂ O at 20°C
		140.1 g/100 g H ₂ O at 50°C
		602.9 g/100 g H ₂ O at 90°C
Hygroscopicity	Dihydrate	Nonhygroscopic under RH 90%
	Anhydride	Hygroscopic over RH 30%
Relative sweetness		45% of sucrose
Digestibility		Digested and absorbed by the small intestine
pH stability of solution		>99% (pH 3.5–10, at 100°C for 24 h)
Heat stability of solution		>99% (at 120°C for 90 min)
Storage stability		100% (at 37°C for 12 months)
Maillard reaction with glycine		Not colored (at 100°C for 90 min)
Maillard reaction with peptone		Not colored (at 120°C for 90 min)

レハロースを加えて炊飯すると、低温保存時の硬化が抑えられる。外食産業の米飯、チルド流通のおにぎり等に利用されている。

アクリルアミドは神経毒作用を有し発がん性も疑われている物質で、最近、ポテトチップスやシリアルなど高温で加工したデンプン質食品などに微量含まれていることが報告され、その生成はグルコースなど還元糖がアスパラギンと反応することによって起こると考えられている。トレハロース存在下でグルコース・アスパラギン混合液を加熱処理したとき、アクリルアミド生成が抑制されることがわかった (Fig. 3)³⁴。また、グルコースの加熱分解物である5-ヒドロキシメチル-2-フルフラールの生成も抑制する³⁵。

2) タンパク質に対する作用

一般的に糖質はタンパク質を安定化する作用を有している。特にトレハロースは、その作用が優れた糖質で、凍結や乾燥による変性から保護する作用が強い。卵白に糖質を5%添加し、 -20°C で5日間冷凍し解凍後の変性を調べたところ、スクロース、マルトースなどと比較して、トレハロースは抑制効果が優れていた²⁸。茶碗蒸し、厚焼き玉

子、親子丼などの冷凍食品に効果的であった。ワサビ由来の酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) や野菜のSOD様活性成分 (没食子酸, カテキンなど) を安定化する作用もわかっている (Table 3)³⁶。

3) 脂質変敗に対する抑制作用

脂質、特に不飽和脂肪酸は酸化しやすく、変敗臭と呼ばれる特有の刺激臭 (揮発性アルデヒドなど) を生じ、脂質を含む食品の風味劣化や品質低下をもたらす原因となっている。

不飽和脂肪酸を糖質水溶液に分散し加熱した後、不飽和脂肪酸の分解 (Table 4) と揮発性アルデヒドの生成 (Table 5) を調べたところ、両者ともにトレハロースが最も強い抑制作用を示した²⁸。不飽和脂肪酸やそのモデル物質を用いてNMR解析したところ、不飽和脂肪酸の *cis*-オレフィン水素とトレハロースの3位および6'位水酸基との間に水素結合の形成が示唆され、抑制作用メカニズムとして、脂肪酸の不飽和結合とトレハロースとが直接的に相互作用して (Fig. 4)、酸化開始のヒドロペルオキシド化を阻害することによるものと推定された³⁷。この脂質変敗に対する抑制作用は、脂質を含有する多くの食品に広く応用

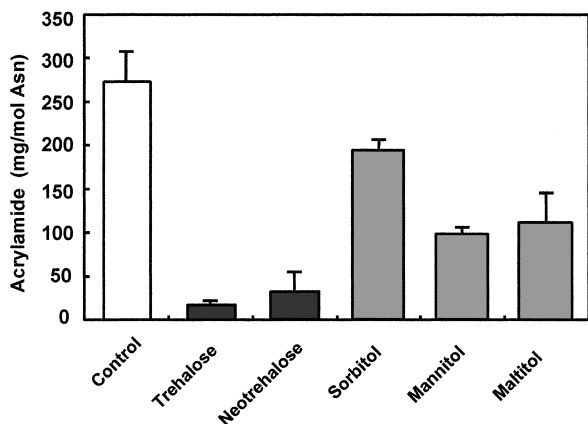


Fig. 3. Effect of non-reducing saccharides on acrylamide formation from asparagine and glucose.*

Mixtures containing 0.1 mmol of asparagine, 0.1 mmol of glucose, 0.1 mmol of non-reducing saccharide and 1 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) were heated at 150°C for 20 min. The amounts of acrylamide were analyzed by gas-chromatography. *Unpublished data.

Table 3. Effects of saccharides on SOD-like activity of carrot powder.³⁶⁾

Saccharide	Remaining activity (%)
Non addition	11
Sorbitol	5
Mannitol	11
Glucose	30
Maltose	32
Sucrose	28
Trehalose	65

Ten percent by weight of each saccharide was mixed with minced carrot, and dried *in vacuo* at 40°C for 64 h. The dried matter was powdered and then preserved at 40°C for 7 days. The SOD-like activity of each preparation was measured by NBT method.

Table 4. Effect of saccharides on the degradation of unsaturated fatty acids by boiling.²⁸⁾

Saccharide	Degradation weight (mg)		
	α -Linoleic acid	Linolenic acid	Oleic acid
Non addition (Control)	47.7	59.0	39.7
Trehalose	33.4	22.3	14.7
Sucrose	50.8	57.0	36.6
Maltose	46.0	52.9	39.7
Neotrehalose	47.8	61.3	34.6
Maltitol	37.1	31.6	21.7
Sorbitol	40.5	57.0	31.0

Mixtures containing 100 mg of unsaturated fatty acid, 0.5 g of cellulose powder, 1 mL of 5% saccharide solution and 0.25 mL of 0.6 M phosphate buffer (pH 6.0) were boiled for 1 h.

Table 5. Effect of saccharides on the formation of volatile aldehydes from α -linoleic acid by boiling.²⁸⁾

Saccharide	Volatile aldehydes (mg/mL-HSG)		
	Propanal	Butanal	Hexanal
Non addition (Control)	10.0	0.23	0.11
Trehalose	1.27	0.07	0.02
Sucrose	9.51	0.23	0.09
Maltose	9.40	0.19	0.10
Neotrehalose	8.60	0.19	0.08
Maltitol	2.44	0.08	0.02
Sorbitol	8.00	0.19	0.09

Mixtures containing 100 mg of α -linoleic acid, 0.5 g of cellulose powder, 1 mL of 5% saccharide solution and 0.25 mL of 0.6 M phosphate buffer (pH 6.0) were boiled for 1 h. The each volatile aldehyde content in headspace gas (HSG) was measured by gas-chromatography.

することができ、その応用例として古米臭、魚臭、マヨネーズ劣化などに対する抑制作用がある³⁸⁾。特に魚臭については、揮発性アルデヒドだけでなくエチルメルカプタンやトリメチルアミンの生成も抑制することがわかっている³⁹⁾。また、縮合リン酸塩を使用しない冷凍すり身への利用も開発されている⁴⁰⁾。

2-ノネナルなどの揮発性アルデヒドは、ヒト、特に高齢者の皮膚脂質の酸化によって発生する体臭成分である。高齢者を対象にボランティア試験したところ、トレハロースを皮膚にスプレーすることによって体臭が低減する結果を得た (Table 6)^{30,31)}。脂質過酸化物のヒドロペルオキシドやそのラジカルはタンパク質の修飾、DNAの損傷などを引き起こし生体成分に好ましくない物質である。牛血清アルブミンやプラスミド χ 174 DNAを用いて *in vitro* 試験したところ、脂質過酸化物によるタンパク質修飾やDNA損

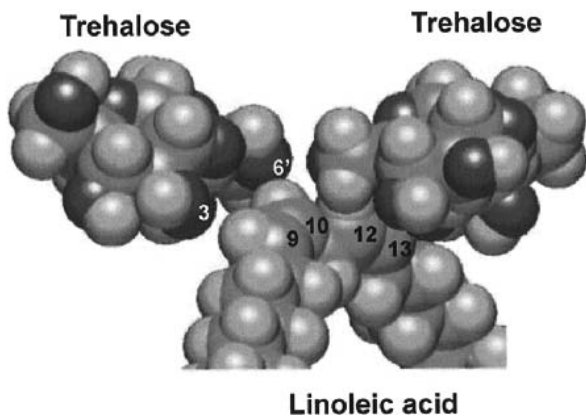


Fig. 4. A possible model of the interaction between trehalose and linoleic acid.³⁷⁾

The molecule modeling was carried out by WinMOPAC version 3.0.

Table 6. Effect of trehalose on the formation of volatile aldehydes from aged person.³⁰⁾

Age of persons (years old)		Volatile aldehydes (μ g)	
		Trehalose treatment	
		Before	After
<55 9 persons	Total SA ^a	5.68 \pm 3.05	4.83 \pm 1.55
	Total UA ^b	1.28 \pm 0.96	0.71 \pm 0.82
	2-Hexenal	0.06 \pm 0.17	0.08 \pm 0.23
	2-Octenal	0.89 \pm 1.00	0.36 \pm 0.56
	2-Nonenal	0.33 \pm 0.45	0.28 \pm 0.46
>55 8 persons	Total SA ^a	10.93 \pm 3.89	8.12 \pm 3.10
	Total UA ^b	17.17 \pm 10.14	5.40 \pm 4.66**
	2-Hexenal	5.44 \pm 4.39	0.71 \pm 1.65*
	2-Octenal	5.11 \pm 3.71	2.59 \pm 1.92*
	2-Nonenal	6.61 \pm 3.75	2.11 \pm 1.87*

After bathing, 17 male persons (more than 48 years old) sprayed the upper part of their own body with 2% trehalose and wore cotton undershirts for 20 h. The volatile aldehydes from the shirts were assayed by gas-chromatography. ^aSaturated aldehydes (pentanal, hexanal, heptanal, octanal and nonanal), ^bUnsaturated aldehydes (2-hexenal, 2-octenal and 2-nonenal). Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as compared with the value before trehalose-treatment.

傷を抑制することがわかった^{31,41)}。トレハロースはリン脂質膜やビタミンEの安定化にも効果があり⁴²⁾、保湿作用とともに化粧品用途に有用な機能を有している。

4) ミネラルに対する作用

カルシウムやマグネシウムなどミネラル類は、炭水化物、タンパク質、脂質と比べると、食品中の含量は少ないものの、健康維持に必要な栄養素であり、最近の食生活の適正化が目指されている中で最も注目されている栄養素の一つである。

トレハロースと食品添加物の塩化カルシウムの混合液から2種類のトレハロース-塩化カルシウム複合体結晶を調製することができた⁴³⁾。一つは、トレハロース：塩化カルシウム：水=1：1：1の組成の結晶 (複合体I) で、もう一つは、トレハロース：塩化カルシウム=1：2の結晶 (複合体II) であった。NMR法で調べたところ、複合体Iではトレハロース2位と4位水酸基が複合体形成に関与し、複合体IIでは4位水酸基のみが関与していると推定された。これら複合体結晶は、塩化カルシウムに比べ、吸湿性や潮解性の少ない安定な粉末で刺激味も緩和されていた。カルシウムイオンはリン酸塩などが存在すると不溶性の塩として沈殿しやすい。トレハロースと塩化カルシウムの混合液にリン酸塩を加えた後、上清中に残存する溶性カルシウムを定量したところ³¹⁾、トレハロース濃度に依存して溶性カルシウム量が増加することがわかった (Fig. 5)。トレハロースはカルシウムと複合体をつくることによって不溶性リン酸カルシウム塩の形成を阻害し、溶性カルシウム量を増加させると考えられた。

マグネシウム塩もトレハロースと相互作用することがNMR解析からわかっている。塩化マグネシウム含有の苦汁 (にがり) をトレハロースで粉末化すると、比較的吸湿性の低い苦汁粉末が調製できる。トレハロース水溶液中で肉や野菜などを加熱調理すると、組織からのマグネシウム溶出が抑制され (Table 7, 8) アク生成も少ない⁴³⁾。ホウレン草葉の場合、クロロフィルからのマグネシウムの離脱も抑制され、加熱後の色調保持にも効果的であった。そ

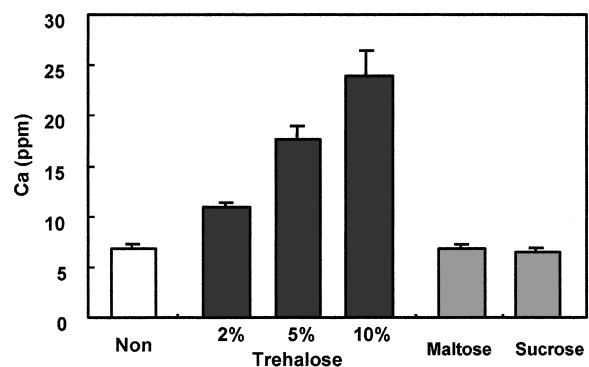


Fig. 5. Effect of saccharides on calcium dissolution in phosphate buffer.³³⁾

Mixtures containing 92 mg of calcium chloride, 0 to 5 g of saccharide and 50 mL of K-NaPO₄ (50 mM, pH 6.8) were incubated at 37°C for 30 h. The soluble calcium contents were analyzed by absorption spectrophotometry.

の他、鉄や銅イオン存在下でのビタミンC（アスコルビン酸）の分解・着色を抑制する作用もある（Fig. 6）。

トレハロースはミュータンス菌など歯（虫歯）原因菌による不溶性グルカン生成の基質ならず、酸生成も穏やかで⁴⁴⁾、歯にやさしい甘味料として利用できる。骨粗しょう症モデルマウスにトレハロースを経口投与したとき、骨強化の作用が認められた⁴⁵⁾。この作用はサイトカインを介し

Table 7. Effect of saccharides on elution of Ca and Mg from pork meat.*

Saccharide	Elution weight (mg)	
	Ca	Mg
Non addition (Control)	1.07	1.16
Trehalose	1.17	0.47
Sucrose	1.05	1.19
Maltose	1.44	1.20
Neotrehalose	1.03	1.20
Maltitol	1.46	1.55

Pork meat (30 g) was added into each saccharide solution (400 mL, 10%) and boiled for 5 min. The amounts of Ca and Mg eluted from the pork meat were measured by atomic absorption spectrophotometry. *Unpublished data.

Table 8. Effect of saccharides on the mineral elution from spinach.*

Saccharide	Elution weight (mg)			
	Ca	Mg	Na	K
Non addition (Control)	4.43	6.99	1.96	91.0
Trehalose	3.85	3.27	1.88	88.3
Sucrose	4.61	6.96	1.92	96.5

Spinach (20 g) was added into each saccharide solution (400 mL, 10%) and boiled for 5 min. The amounts of mineral eluted from the spinach were measured by atomic absorption spectrophotometry. *Unpublished data.

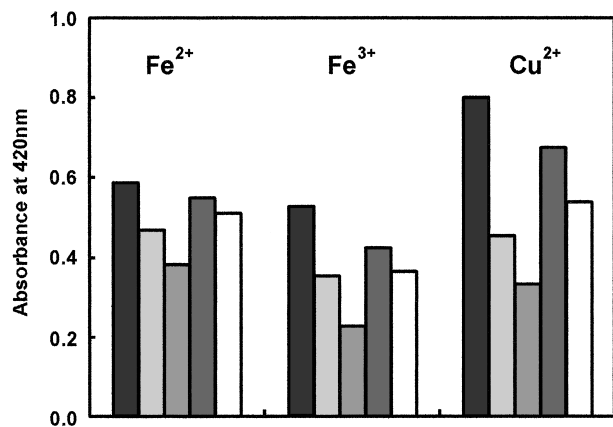


Fig. 6. Effect of trehalose on decomposition of L-ascorbic acid by metals.³³⁾

Mixtures containing 14.8 mM L-ascorbic acid, 10 or 100 mM saccharide and 10 mM metal chloride were incubated at 50°C for 40 h (96 h for FeCl₂). ■, non addition; □, 10 mM trehalose; ▒, 100 mM trehalose; ▓, 10 mM maltose; ◻, 100 mM maltose.

た破骨細胞の分化を抑制することによるものと考えられている^{46,47)}。

4. 新しい食感・味覚を付与した商品開発

トレハロースはこれまでの糖質にはないユニークな機能や特性を有しており、それらを食品に応用・利用することによって新しい食感や味覚を付与することができる。これまでに、著者らがユーザーに提案してきた新商品のいくつかを紹介する。

1) 米粉パン

主原料の小麦粉をパン用米粉（グルテン添加した米粉）に全量置換し製造した米粉パンは、もちもち感の強い新食感を味わえる商品である。トレハロースの脂質変敗抑制作用によって米の本来の風味が引き立っており、さらに、保湿作用やデンプン老化抑制作用によって、パサツキが少なく、ソフト感が持続するなど日持ちも向上している。製造時において、米粉パンはイーストの醗酵が進みすぎる傾向があるが、トレハロースを配合することで適正な醗酵時間にコントロールすることができるという利点もある。経済的な意味合いにおいても、全国各地の特産米を利用した米粉パンの普及など地方経済の活性化のアイテムとして期待される。

2) 野菜・果物チップス

食物繊維を多く含む野菜や果物は現代の食生活に求められる素材の一つである。「お菓子感覚で野菜や果物のおいしさをそのまま食べる」をコンセプトに、野菜・果物チップスを提案した。たとえば、ニンジンチップスは、薄くスライスしたニンジンの両面にトレハロースをまぶし、それを5分間蒸煮した後、乾燥（50–60°C, 18時間）して製造する。トレハロースの安定化作用によって、乾燥での組織の縮みが抑制されており（Fig. 7）、ニンジンの色合いも損なうことなく色鮮やかで、味や栄養素をそのまま閉じ込めている。ノンフライでトレハロースの良質な甘味を有しており、パリパリした食感のスナック風の菓子である。

3) トレハメレンゲ

メレンゲは多くの洋菓子に用いられる生地で、卵白に砂糖を加えて気泡させたものである。砂糖の一部（30%程度）をトレハロースで置き換えたメレンゲは、気泡が安定

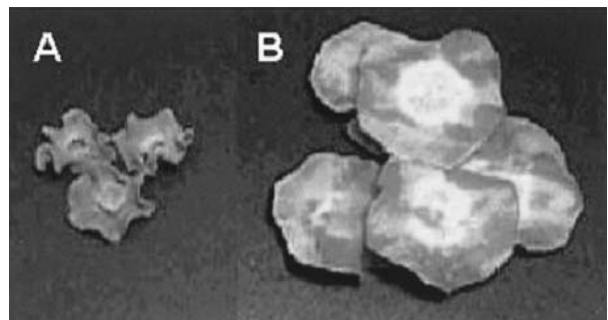


Fig. 7. The effect of trehalose on carrot chips.

A, non addition; B, trehalose added. Thinly-sliced carrot was steamed for 5 min and dried at 60°C for 18 h.

しており、口当たりが軽くフワツとした食感が味わえる。メレンゲの絞り出しから終わりまでしっかりした気泡の状態を維持しており、また、仕込みの都合で数時間冷蔵庫に入れておいても離水もなく、菓子製造過程での作業性が向上するメリットもある。

砂糖の90%程度をトレハロースに置換した乾燥（焼成）メレンゲは、乾燥焼き後も気泡の残存が良好で、サクサクした食感を持つ新しいメレンゲ菓子である。酸味の効いた果汁を加えても気泡は安定しており、フルーティーなメレンゲ菓子を創作することもできる。

5. おわりに

MTSaseは、 α -1,4-グルカンの還元末端グルコースの結合を分子内転移反応で α,α -1,1結合に変換するまったくユニークな触媒活性をもつ酵素である。立体構造解析の結果^{48,49}、MTSaseは基本的に α -アミラーゼファミリー酵素と類似した活性部位と触媒残基を有しているものの、その活性部位の一部分はMTSaseに特有な構造であることがわかり、その活性部位の構造が α,α -1,1転移活性を発現していると考えられた。このことは、活性部位の部分的な差異が異なる酵素活性、言い換えれば、我々がまだ見いだしていない酵素活性を創り出す可能性を意味しているのではないだろうか。MTSaseの発見は、デンプンに対してユニークな作用を示す酵素はまだまだ自然界に存在するという一つの道標ではないだろうか。この信念に基づき、著者らは新しい酵素の検索を続けており、最近、デンプンから環状四糖（4個のグルコースが α -1,3と α -1,6とで交互に結合した環状オリゴ糖）を生成する2種類の酵素、6- α -glucosyltransferaseと3- α -isomaltosyltransferaseを見いだした^{50,51}。また、このような新しい酵素を他の酵素と組み合わせることによって、有用なオリゴ糖を生産することができる。MTSaseは、トレハロース生産に利用することだけでなく、G4-アミラーゼと組み合わせることによって、デンプンからマルトシルトレハロース含有水飴（ハローデックス™）の生産を実現している⁵²。6- α -glucosyltransferaseはイソマルトデキストラナーゼと組み合わせることでデンプンからイソマルトースを高率に生産することができる⁵³。

トレハロースは多彩な機能・特性をもつ多機能性糖質で、食品、化粧品、医薬品など広い用途に有用で、特に、食品用途では、大量製造技術の開発によって、さまざまな商品に利用できるようになり、品質の改良や日持ちの向上などに役立っている。さらに、トレハロースの特長を活用した新商品の創出も実現している。現在、食品の多様化や健康志向の高まりが進むなか、このような消費者の要望にマッチした食品素材の一つであるといえる。トレハロースは、ハローデックス™や環状四糖など新しいオリゴ糖とともに、デンプンから製造される糖質、いわゆるデンプン糖の新しい可能性を大きく広げてゆくものと期待される。

日本応用糖質科学会技術開発賞受賞の荣誉に浴し、身に余る光栄に存じますとともに、心から感謝申し上げます。谷口 肇会長、坂野好幸副会長、三橋正和副会長、南浦能至副会長、理事の諸先生方、ご推薦いただきました小巻利章中国・四国支部長ならびに受賞選考委員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本技術開発は、株式会社林原生物化学研究所天瀬研究所、株式会社林原商事L'プラザおよびC'プラザにおいてなされたもので、本技術開発に関し終始一貫してご指導・ご鞭撻いただきました株式会社林原参与辻阪好夫博士、ならびに株式会社林原生物化学研究所常務取締役栗本雅司博士に深く感謝申し上げます。前天瀬研究所所長の杉本利行氏、天瀬研究所所長の福田恵温博士および株式会社林原生物化学研究所開発センターチーフディレクターの茶園博人博士をはじめ技術開発に協力していただきました天瀬研究所の所員の皆様、L'プラザおよびC'プラザのスタッフの皆様方にお礼申し上げます。本技術開発の工業化に多大の協力をいただきました株式会社林原取締役小川 明氏ならびに製造関係者の皆様方に深く感謝申し上げます。

最後になりますが、本技術開発を事業化していただきました株式会社林原代表取締役林原 健社長に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 奥 和之, 澤谷郁夫, 茶園博人: 食品中のトレハロース含量. 日食工誌, **45**, 381-384 (1998).
- 2) K. Maruta, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1829-1834 (1995).
- 3) 茶園博人, 丸田和彦, 仲田哲也, 西本友之, 渋谷 孝, 久保田倫夫, 福田恵温, 杉本利行, 栗本雅司, 辻阪好夫: 細菌における二つの新規なトレハロース生成系. 応用糖質科学, **43**, 213-221 (1996).
- 4) T. Nakada, K. Maruta, K. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2210-2214 (1995).
- 5) T. Nakada, K. Maruta, H. Mitsuzumi, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2215-2218 (1995).
- 6) 津崎桂二, 久保田倫夫: トレハロース生成に関与する新規な酵素. 蛋白質 核酸 酵素, **42**, 834-841 (1997).
- 7) 久保田倫夫: 新たに見いだされたトレハロース生成に関する酵素系. 化学と生物, **36**, 79-80 (1998).
- 8) 田淵彰彦, 万代隆彦, 渋谷 孝, 福田恵温, 杉本利行, 栗本雅司: 新規酵素による澱粉からのトレハロース生成. 応用糖質科学, **42**, 401-406 (1995).
- 9) 茶園博人: 澱粉からのトレハロース生成酵素の研究. 応用糖質科学, **44**, 77-82 (1997).
- 10) 茶園博人: 新規酵素法によるトレハロースの生産とその利用. 応用糖質科学, **44**, 115-120 (1997).
- 11) 杉本利行, 久保田倫夫, 仲田哲也, 津崎桂二: 新規酵素による澱粉からのトレハロース製造. 農化, **72**, 915-922 (1998).
- 12) 久保田倫夫: トレハロース. 「工業用糖質酵素ハンドブック」, 岡田茂孝・北畑寿美雄監修, 講談社, 東京, pp. 173-

- 189 (1999).
- 13) M. Kubota: Trehalose production. in *Glycoenzymes*, M. Ohnishi, ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 217-225 (2000).
 - 14) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 263-266 (1996).
 - 15) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophilic Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 267-270 (1996).
 - 16) K. Mukai, A. Tabuchi, T. Nakada, T. Shibuya, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Starch/Stärke*, **49**, 26-30 (1997).
 - 17) K. Maruta, K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 10-13 (1996).
 - 18) K. Maruta, K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 717-720 (1996).
 - 19) K. Maruta, H. Mitsuzumi, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**, 177-181 (1996).
 - 20) K. Maruta, M. Kubota, S. Fukuda and M. Kurimoto: Cloning and nucleotide sequencing of a gene encoding a glycogen debranching enzyme in the trehalose operon from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biochim. Biophys. Acta*, **1476**, 377-381 (2000).
 - 21) 杉本利行: 酵素糖化法による澱粉からのトレハロース生産. バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 777-779 (1995).
 - 22) T. Yamamoto, K. Maruta, H. Watanabe, H. Yamashita, M. Kubota, S. Fukuda and M. Kurimoto: Trehalose-producing operon *treYZ* from *Arthrobacter ramosus* S 34. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1419-1423 (2001).
 - 23) 竹内 叶: トレハロースの冷凍食品への応用. 月刊フードケミカル, **18**, 42-44 (2002).
 - 24) 榊原生物化学研究所, 万代隆彦, 渋谷 孝, 杉本利行, 三宅俊雄: 脱水剤およびそれを用いる含水物の脱水方法並びにその方法で得られる脱水物, 特許第 3168550, 2001-05-21.
 - 25) 竹内 叶: トレハロースの食品の品質改良効果と応用. 月刊フードケミカル, **13**, 29-33 (1997).
 - 26) 竹内 叶: トレハロースの各種食品への品質改良について. *New Food Ind.*, **40**, 1-7 (1998).
 - 27) 竹内 叶: トレハロースの物性と機能(2). *Fragrance J.*, **2000-3**, 199-201 (2000).
 - 28) 奥 和之, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司: 不飽和脂肪酸の加熱分解に及ぼすトレハロースの影響. 日食工誌, **46**, 749-753 (1999).
 - 29) 奥 和之, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司: トレハロースの機能とその応用. 科学と工業, **74**, 383-387 (2000).
 - 30) 久保田倫夫: 不飽和脂肪酸の変敗に及ぼすトレハロースの影響. *Cellulose Commun.*, **8**, 71-75 (2001).
 - 31) 奥 和之, 澤谷郁夫, 杉本純夫, 神戸三幸, 竹内 叶, 村井佐恵, 黒瀬真弓, 久保田倫夫, 福田恵温: トレハロースの機能特性. 応用糖質科学, **49**, 351-357 (2002).
 - 32) 久保田倫夫: 機能性オリゴ糖の開発—トレハロース—. 化学工業, **53**, 45-51 (2002).
 - 33) 久保田倫夫: トレハロースの新しい機能. *New Food Ind.*, **44**, 1-8 (2002).
 - 34) 奥 和之, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: メイラード反応によるアクリルアミド生成に及ぼすトレハロースの抑制作用. 農化, 2003年度大会要旨集, p.68 (2003).
 - 35) 澤谷郁夫, 奥 和之, 黒瀬真弓, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: トレハロースによるアクリルアミド生成抑制. 応用糖質科学 (講演要旨), **50**, 400 (2003).
 - 36) 阿賀 創, 渋谷 孝, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司: トレハロースによる野菜のスーパーオキシドジスムターゼ様活性の安定化. 日食工誌, **45**, 210-215 (1998).
 - 37) K. Oku, H. Watanabe, M. Kubota, S. Fukuda, Y. Tsujisaka, M. Kurimoto, Y. Inoue and M. Sakurai: NMR and quantum chemical study on the OH... π and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidation on function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12739-12748 (2003).
 - 38) 竹内 叶: トレハロースの食品分野への応用. *Fragrance J.*, **2000-4**, 94-96 (2000).
 - 39) 奥 和之, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司: トレハロースによる魚肉加熱時のトリメチルアミン生成抑制影響. 日食工誌, **46**, 319-322 (1999).
 - 40) 下村武生, 茶園博人: 縮合リン酸塩を使用しない冷凍すり身の製造技術開発—トレハロースの冷凍すり身への利用—. *ジャパン フードサイエンス*, **2000-8**, 37-43 (2000).
 - 41) 向井直子, 奥 和之, 西本典子, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司: 脂質過酸化による DNA 損傷およびタンパク修飾に及ぼすトレハロースの抑制効果. 農化 (講演要旨), **74**, 259 (2000).
 - 42) 奥 和之, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫, 櫻井 実: リポソーム膜の加熱酸化に及ぼすトレハロース, ネオトレハロースの抑制作用. 応用糖質科学 (講演要旨), **50**, 439 (2003).
 - 43) 奥 和之, 黒瀬真弓, 澤谷郁夫, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: トレハロースと金属塩との相互作用. 応用糖質科学 (講演要旨), **49**, 455 (2002).
 - 44) T. Neta, K. Takada and M. Hirasawa: Low-cariogenicity of trehalose as a substrate. *J. Dent.*, **28**, 571-576 (2000).
 - 45) Y. Nishizaki, C. Yoshizane, Y. Toshimori, N. Arai, S. Akamatsu, T. Hanaya, S. Arai, M. Ikeda and M. Kurimoto: Disaccharide-trehalose inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *Nutr. Res.*, **20**, 653-664 (2000).
 - 46) C. Yoshizane, N. Arai, C. Arai, M. Yamamoto, Y. Nishizaki, T. Hanaya, S. Arai, M. Ikeda and M. Kurimoto: Trehalose suppresses osteoclast differentiation in ovariectomized mice: Correlation with decreased *in vitro* interleukin-6 production by bone cells. *Nutr. Res.*, **20**, 1485-1491 (2000).
 - 47) C. Arai, M. Kohguchi, A. Akamatsu, N. Arai, C. Yoshizane, N. Hasegawa, T. Hanaya, S. Arai, M. Ikeda and M. Kurimoto: Trehalose suppresses lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis bone marrow in mice. *Nutr. Res.*, **21**, 993-999 (2001).
 - 48) 久保田倫夫, 丸田和彦, 福田恵温, 栗本雅司, 小林正則, 松浦良樹: トレハロース生成酵素 MTSase の構造と機能解析. 応用糖質科学, **48**, 153-161 (2001).
 - 49) M. Kobayashi, M. Kubota and Y. Matsuura: Refined structure and functional implications of trehalose synthase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 1-8 (2003).
 - 50) H. Aga, K. Maruta, T. Yamamoto, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Cloning and sequencing of the genes encoding cyclic tetrasaccharide-synthesizing enzymes from *Bacillus globisporus* C 11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 827-838 (2002).
 - 51) T. Nishimoto, H. Aga, K. Mukai, T. Hashimoto, H. Watanabe, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of glucosyltransferase and glucanotransferase involved in the production of cyclic tetrasaccharide in *Bacillus globisporus* C 11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1806-1818 (2002).
 - 52) 竹内 叶: マルトシルトトレハロースシラップの食品への利用. 食品と科学, **2003** (9), 82-85 (2003).
 - 53) 西本友之, 松下美緒, 川島 晶, 橋本貴治, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫: 新規なイソマルトース製造方法. 応用糖質科学 (講演要旨), **49**, 457 (2002).