

高压処理を利用した酵母からのトレハロースの抽出

杵淵美倭子*, 山崎 彬*, 山元皓二**

* 越後製菓(株)総合研究所 (940 長岡市呉服町 1-4-5)

** 長岡技術科学大学生物系 (940-21 長岡市上富岡町 1603-1)

Extraction of Trehalose from *Saccharomyces cerevisiae* by High-Pressure Treatment

Miwako KINEFUCHI,* Akira YAMAZAKI* and Kouzi YAMAMOTO**

* *Research Institute, Echigo Seika Co., Ltd.*

(1-4-5, Gofukumachi, Nagaoka 940, Japan)

** *Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology*
(1603-1, Kamitomioka-cho, Nagaoka 940-21, Japan)

Commercially available yeasts normally contain approximately 10% dry weight of trehalose. For the purpose of obtaining liquid trehalose economically and safely, without using heat or an organic solvent, we used a high-pressure treatment to extract the trehalose, with inactivating trehalase.

Our results showed that trehalase is inactivated by the application of a minimum of 700 MPa and that trehalose is not hydrolyzed even at pressures as high as 1500 MPa.

Using high-pressure treatment, therefore, we have succeeded in extracting trehalose from yeast at 12% dry weight when 700 MPa is applied for 10 min at 30°C.

It has been confirmed that high-pressure treatment is very effective for simultaneously inactivating trehalase and extracting trehalose.

ここ数年、二糖類であるトレハロース (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) の機能性について注目が高まってきている。BROWN らによればトレハロースは2分子のD-グルコースが1.1結合した、ややシンメトリーな形をしており¹⁾、2水和物で化学的に安定で、爽やかな甘味を持った糖である。

自然界では昆虫、キノコ²⁾、酵母³⁾、イワヒバ等の体内に10%程度のトレハロースが存在していることが知られている。このトレハロースを用いて昆虫は血リンパ中の糖量を加減することで耐寒性を獲得し⁴⁾、イワヒバは乾燥からDNAを保護し⁵⁾、酵母は圧力耐性、冷凍耐性を維持しているといわれている^{6,7)}。

生体内でのトレハロースの役割についての詳細は今後の研究に委ねられるところであるが、トレハロース存在下で乾燥させたリン脂質は、完全に水和したリン脂質と同じ転移温度を示した(DSC上)というCROWE らの報告があり⁸⁾、乾燥状態での生体膜の水の代替物としてトレハロースが役立っているものと推察される。一方、トレハロースの機能を利用した新製品

開発も医薬品、化粧品分野等で始まっている^{9,10)}。

酵母はトレハロースを多量に含んでいてかつ安価なので、トレハロースの工業生産に酵母を利用することが考えられる。すでに吉川らは70°C・50%エタノールを抽出溶媒としてトレハラーゼを熱失活させた酵母からトレハロースの抽出を試みている¹¹⁾が、エタノールの回収、事前の熱処理など食品加工への利用としては解決すべき課題が多い。

われわれは以前より食品用超高压機を利用して伝統的食品の餅および副資材の殺菌¹²⁾、米菓の製造工程での糊化等に応用を試みてきたが¹³⁾、酵母からのトレハロースの抽出に安全で効率的な方法として応用できるのではないかと考え、抽出実験を試みることにした。圧力処理方法では処理室内の品物を短時間で均一に処理することが可能である。また圧力処理方法ではメーラード反応が非常に抑制され褐変現象が生じにくい。とくに抽出液そのものを食品に利用することを想定すると、加熱をして酵素失活をする方法に比較して商品価値が高くなるという利点があると考えた。

大隅の報告によれば¹⁴⁾、酵母に圧力処理を行った場合、核と核膜は100~200 MPaで損傷を受け、400 MPaで細胞内のオルガネラは全く認められなくなり、500 MPa以上になって外形的な異変(細胞内の破壊、出芽痕部位の障害)が出始めるとある。このことから酵母からトレハロースを抽出するには500 MPa以上の圧力処理を行えば良いことが示唆される。

本実験ではまずトレハロースおよびそれを分解する酵素であるトレハラーゼに対する圧力の効果を明らかにし、次に酵母からのトレハロースの抽出に必要な圧力処理条件を決定した。抽出操作は岡田¹⁵⁾、江口¹⁶⁾らの定義でとらえ、抽質が抽材に移動しやすくなる点に圧力を利用することを主眼とした。そして抽出液と抽残物の2相分離までを実験した。

実験方法

1. 試料と高圧機器

本研究には生酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, 中越酵母㈱製 水分65%)を用いた。使用に際しては、必要に応じて原タンクから採取し脱水した新鮮な酵母を使用した。この酵母はアンスロン法で約12%(乾物重量当り)のトレハロースを含むことが確認された株である。

高圧機は石川島播磨重工業㈱(IHI)製になる食品用高圧特機で、最高1500 MPaまで加圧することができる。

圧力機器を使用する場合の基本的条件は以下のように設定した。設定圧力まで上昇するに要する時間は200 MPaで1.1分、400 MPaで1.8分、600 MPaで2.4分、700 MPaで3.0分、1500 MPaで5.0分とした。減圧は700 MPaまでは30秒以内、1500 MPaは5.0分とした。

圧力処理時間は昇圧と減圧時間は含まず保持時間で10分とした。

温度制御はナイブラインを循環させて行った。圧力処理容器内の温度は昇圧時に断熱圧縮により100 MPaごとに3℃上昇するが、昇圧後すぐ降下して設定温度になるので昇圧時の温度上昇は無視した。

圧力容器の処理容量は400 MPaまでは7 l、700 MPaまでは3.6 l、1500 MPaまでは340 mlであり、実験には必要かつ十分な大きさを備えている。

圧力処理を行う場合、被処理物を軟質樹脂袋に入れ脱気包装した後、チャンパー内でナイブラインを介して行った。

2. トレハラーゼの失活実験

実験にはシグマ社製のトレハラーゼ(ブタの腎臓由来、0.5ユニット/ml)を使用した。この1 mlを採取し所定の温度の蒸留水60 mlを加えて希釈した。希釈液を脱気包装し2℃、35℃、60℃の条件下で1200 MPaまでの圧力処理を行った。処理後、酵素液0.5 mlと0.25 μMのトレハロース基質液0.5 mlを混ぜ十分攪拌しながら40℃・60分間反応させた。

残存するトレハラーゼの活性は生成した還元糖量をソモギ-ネルソン法で測定し、未処理酵素液と基質液との反応で生じた還元糖量を100としたときの値で示した。

3. トレハロースの分解実験

シグマ社製トレハロースを使用し0.15 Mのトレハロース液を作った。脱気包装後700 MPaまでは30℃で、1500 MPaまでは45℃の条件下で圧力処理を行った。分解の有無については液体クロマトグラフ(HPLC)で調べた。HPLCは日本分光製TRI ROTAR-V1、カラムは日本電工製Shodex Ks-800p, Shodex Ks-801、樹脂はイオン交換樹脂を用いた。溶媒には液体クロマトグラフ用の蒸留水を流速1 ml/minの割で流しオーブシ温度60℃を採用した。検出器はRID-300、計算機はDS-L300を使用した。

4. 酵母からのトレハロースの抽出ならびに定量法について

1) 抽出方法

脱気包装した酵母50 gをそのまま、または酵素失活をさせるために85℃のホットバス中で1時間加熱した後に圧力処理をした。圧力処理後、蒸留水50 mlを加え1時間攪拌抽出を行った。その後、15,000 rpm・5分の遠心分離を行って上澄みと沈澱物に分けた。予備実験により、2回の固液分離操作で抽出がほぼ完了することを確認したので、2回の抽出の上澄み液をあわせて0.2 μmのフィルターで濾過し濾液中のトレハロース量を測定した。

2) トレハロースの定量

定量にはガスクロマトグラフ(HITACHI G-5000)を用いた。カラムは2 mのガラスカラムを使用し充填剤としてSilicone SE-30 Chromosorb WAW DMCS 5%を用いた。カラム温度は235℃に設定し、キャリアガスはHeを用いて流量30 ml/minとした。検出機はFIDを使用した。

濾液中のトレハロースはトリメチルシリル化剤を用いて誘導体化して測定し、定量は10%ラクトース液を用いた内部標準法を採用した。トリメチルシリル化

剤は GL サイエンス社の TMSI-C 剤を用いた。10% 程度の糖水溶液 10 μl に 1 ml のシリル化剤を混合し 50℃ で 1 時間反応させ誘導体化した。

定量したトレハロースを乾物酵母 1 g 当りの g 量として示した。

3) 圧力処理後の酵母の形態観察

酵母 50 g を脱気包装し 30℃・700 MPa で圧力処理した酵母と、無処理の酵母を 0.1% メチレンブルー液で染色し光学顕微鏡で観察し写真撮影した。また圧力処理によって生じた変化について写真撮影をした。

実験結果および考察

1. トレハラーゼ失活について

Fig. 1 に各温度・圧力条件下のトレハラーゼの活性を還元糖生成比で示した。われわれは添加物を用いずにトレハロースの抽出を行うことを目的としたので、実験ではとくに pH 調整のための緩衝剤を使用せず蒸留水で希釈を行った。pH 6.8 の試料は、圧力処理後も pH の変動は認められなかった。トレハラーゼは圧力によって徐々に活性を失い 700 MPa 付近で失活をした。

圧力による酵素失活については、功刀が数種のタンパク質加水分解酵素で調べている¹⁷⁾。これによれば酵素活性が 1/2 に減少するための圧力は 10~500 MPa

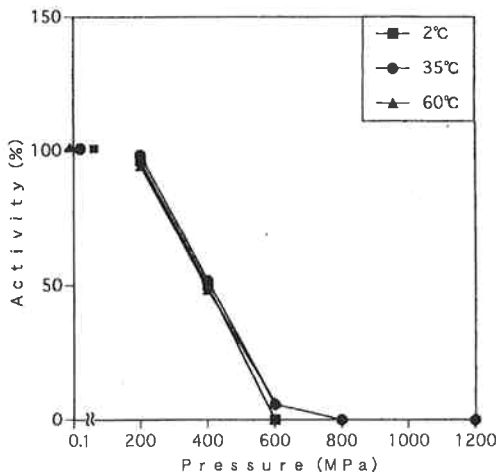


Fig. 1. Relationship between trehalase activity and pressure under different temperatures.

A pressure was applied to a trehalase solution (pH 6.8) for 10 min. The trehalase activity decreased with increasing pressure, and trehalase was finally inactivated by high-pressure treatment of 700 MPa.

と非常に幅広く、酵素によって圧力耐性が大きく違うことがうかがわれる。トレハラーゼ [EC 3.2.1.28] はグルコシド結合の加水分解酵素である。炭水化物の分解と合成に関与する酵素の圧力耐性については報告が少ないが、森らはグルカノヒドロラーゼ類のタカアミラーゼについて報告している¹⁸⁾。それによると圧力失活は pH 6.86 のとき 25℃ で 700 MPa, 35℃ で 750 MPa, 45℃ で 780 MPa であった。本実験においても 700 MPa がトレハラーゼ失活の最低圧力であるという結果が得られた。EC 3.2.1 型の酵素類全体が圧力耐性を持つのか酵素の耐熱性と圧力耐性の関係など非常に興味深いものがある。

われわれはトレハラーゼの失活に対して、圧力と温度の相乗効果により、より低い圧力条件下でトレハラーゼの失活ができないものかと考え、2℃, 35℃, 60℃ での実験を行った。しかし Fig. 1 から明らかなように 10 分の加圧条件ではとくに温度による大きな差は見受けられなかった。酵素の熱失活に対しては圧力による活性回復の報告があり¹⁹⁾、酵素失活と圧力と温度の関係については今後多くの豊富な実験の積み重ねが必要である。

本実験ではブタ腎臓由来のトレハラーゼは 2℃, 35℃, 60℃ の温度条件下 700 MPa・10 分の圧力処理で失活することを確認した。一般的には微生物起源の酵素の方が安定しているといわれている。したがって酵母の場合には 700 MPa 以上の圧力処理でトレハラーゼを失活できるものと推察された。

2. トレハロースの分解について

Fig. 2 に示したように、トレハロースは 30℃ (ただし、700 MPa 以上 1500 MPa までは 45℃)・1500 MPa までは分解しないことが確認された。したがって、圧力処理によりトレハラーゼを失活させながら酵母からトレハロースを抽出することが可能になった。

一般に液相での化学反応は、温度の上昇にともなって速度が大きくなるが、圧力との関係で考えれば増大、低下、変わらないのいずれともいえる。圧力の影響の度合は活性化体積によって評価され、この体積が負のときは反応は促進され、正のときは抑制される。

玉岡らの報告にあるように sucrose の活性化体積は、 $\text{sucrose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glucose} + \text{fructose}$ 反応において、25℃・150 MPa で 6.0 ml/mol と活性化体積プラスを示し、明らかに反応が抑制される方向に進む¹⁹⁾。また、林らは 60℃ におけるトウモロコシデンプン、ローストビーンガムの加水分解の報告を行っているが²⁰⁾、生成還元糖量はわずかにマイナスとなり、活性化体積は

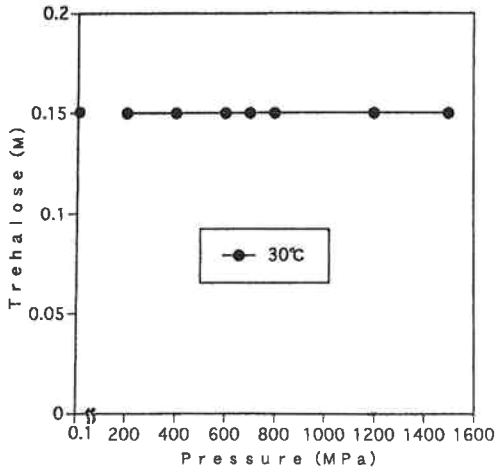


Fig. 2. Hydrolysis of trehalose by high-pressure treatment.

Pressure was applied to a 0.15 M trehalose solution for 10 min. The trehalose was not hydrolyzed even when the pressure was increased to as high as 1500 MPa.

1.68×10^{-3} ml/mol, 0.9×10^{-3} ml/mol と正の値を示している。

これらの例からトレハロースも加水分解はしないだろうと予測された。しかしトレハラーゼ失活を完全に行うためには 700 MPa 以上の加圧が必要である。そのためにはトレハロースは 700 MPa 以上の圧力で非分解であることが必要条件であるので高圧機器の最高処理圧である 1500 MPa まで実験した。トレハロースに 1500 MPa の圧力処理をした場合でも生成還元糖はほとんど検出されず、本実験で用いた圧力範囲でトレハロースは加水分解されないことが実証された。

3. 酵母からのトレハロースの抽出

1) トレハロースの抽出量

熱処理によって酵素失活をした後、圧力処理を行ってトレハロースを抽出した結果を Fig. 3 に示した。処理圧力が上昇するにつれ収量は上昇し、700 MPa で抽出液中のトレハロースの量は酵母の乾燥重量当りで約 12% であった。

圧力処理のみによってトレハロースを抽出した結果を Fig. 4 に示した。加えた圧力が 400 MPa まではトレハロースの抽出量は非常に少なく、700 MPa でほぼ上限に達し酵母乾燥重量当り約 12% のトレハロースが抽出された。700 MPa 以下ではトレハラーゼが失活しておらず、抽出中に酵素によるトレハロースの分解が生じたものと考えられる。

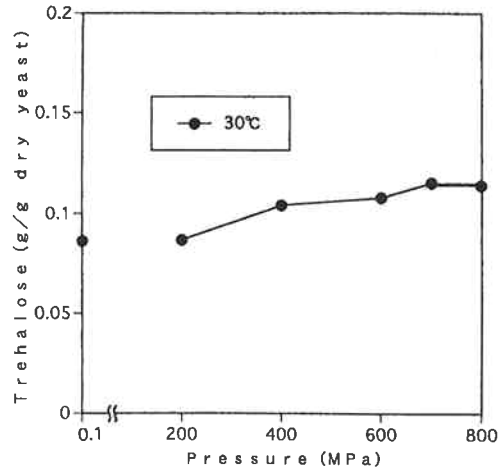


Fig. 3. Relationship between yield of trehalose and applied pressure.

Yeast was subjected to heat- and pressure-application treatment. The yield of trehalose increased with increasing applied pressure, and attained equilibrium when the applied pressure was 700 MPa.

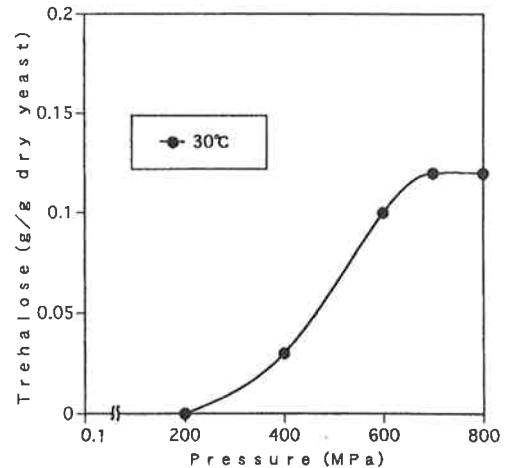


Fig. 4. Extractability of trehalose from yeast after treatment at various pressures.

The trehalose weight in the extracted liquid increased with increasing applied pressure and attained equilibrium at 700 MPa.

2) 圧力処理による酵母の形状変化

酵母細胞は 500 MPa 以上で細胞の亀裂が生じたり出芽痕部位の損傷が起こるとされている。その SEM 像によれば外見は丸く酵母型を保持しており¹⁴⁾、完全にクラッシュされているのではなく、外形を残したまま

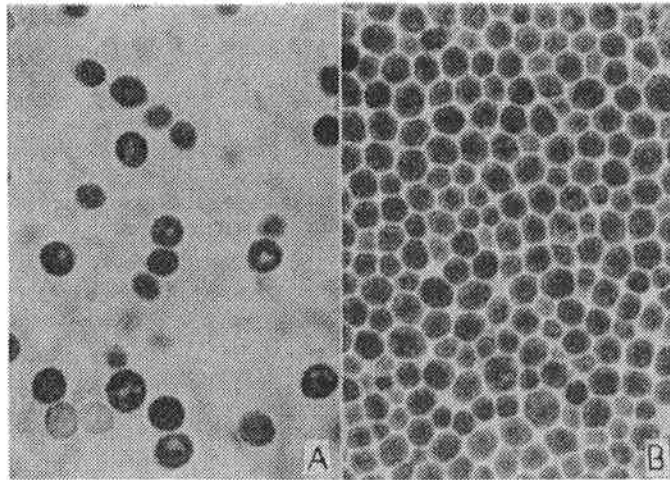


Fig. 5. Microscopic photograph of pressurized yeasts.

A, non-treatment; B, 700 MPa. Each with 0.1% methylene blue dyeing. The pressurized cells changed shape slightly.

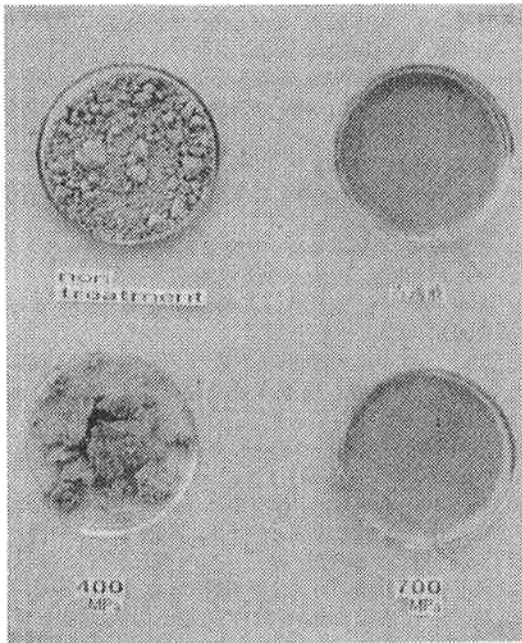


Fig. 6. Photograph of non- and pressurized yeasts and a yeast fluid.

A yeast solid changed to a yeast fluid by pressure treatment at 700 MPa.

細胞内部の組織が損傷し細胞液が浸出しやすくなっていることをうかがわせる。

Fig. 5 は、生酵母を脱気包装して 700 MPa の圧力

処理をした細胞の顕微鏡観察の結果を示したものである。大きく割れたり引きちぎれたという形のものは見受けられなかった。しかし酵母は多角形に変型しており、圧力解除された後も細胞が一度強く圧縮された痕跡を示している。

Fig. 6 に示したように酵母は常圧ではポロポロした粒塊である。しかし圧力を上昇させていくと 500 MPa 付近から流動化し 700 MPa で液状となることが本実験で明らかになった。圧力解除後の細胞の大きさはほとんど変わらないことを考えると、細胞液が浸出し、空洞があちこちにできている細胞が残ったと推定された。

3) 圧力処理の有効性

生体から有用物質を分離する固液抽出の工程を考えた場合、抽出速度が大きな課題となる。抽出速度は固体（生体）内部での抽質（トレハロース）の拡散と生体外部の境膜拡散とに分けて考えなければならないが、律速は生体内部の拡散速度であると考えられる。

もし生体内がスポンジのように多孔質であれば固体の形状を平板か球として扱うことができるといわれている。その場合、表面濃度は外部液濃度と等しく一定に保たれると仮定すれば抽出残率と抽出率は次式で与えられる²¹⁾。

$$\begin{aligned} \text{抽残率} &= 1 - \text{抽出率} \\ &= 8/\pi^2 \cdot \sum 1/(2n+1)^2 \exp[-(2n+1)^2 \\ &\quad \times \pi^2 \text{Det}/4 \delta^2], \end{aligned} \quad (\Sigma=0 \text{ から} \infty)$$

n は抽出回数, De は生体内有効拡散係数, t は時間, δ は球の半径 (酵母の)。

ここで De が大きければ抽残率は小さくなり抽出率が上昇する。

本実験で得た酵母の例では 500 MPa 以上の加圧で液状となり固液抽出がしやすい条件を備えた。固体である細胞は, 15% 程度の圧縮と急速な解除をとおして, 細胞内部組織の微小な損傷を引き起こしており, そのため抽出剤である水が入りやすく, わずか 2 回の抽出操作でほぼ完全に抽出できたものと考えられる。つまり圧力処理によって生体内有効拡散係数 (De) を大きくすることができたといえる。

以上要するに, 圧力処理はトレハラーゼの失活に加えて, 酵母を圧縮するという過程を通して細胞からトレハロースを含んだ液を浸出させるとともに細胞の中に抽媒 (水) が入りやすい条件を作りだすことでトレハロースの抽出を容易にした。

本実験で試料とした酵母は, とくにトレハロース高生産株を選択したわけではない。高生産株の酵母からはより多量のトレハロースを抽出できる可能性がある。さらに, 添加物を含まず, 水が抽媒である粗抽出液はそのまま食品に利用できる可能性を拓いたものであり, この点においても圧力処理は有効であるといえる。

要 約

市販の酵母 (*S. cerevisiae*) に圧力処理を施しトレハロースの抽出を試みた。

(1) トレハラーゼは 2°C, 35°C, 60°C の温度において 700 MPa・10 分の圧力処理で失活することを確認した。

(2) トレハロースの分解は 30°C (ただし, 700 MPa 以上 1500 MPa までは 45°C)・1500 MPa・10 分の圧力処理では分解しないことを確認した。

(3) 酵母に 30°C・700 MPa・10 分の圧力処理を施した後, 水でトレハロースを抽出したとき, 抽出液中には 0.12 g/g (乾燥酵母当り) のトレハロースを含んでいた。

生体からの有用物質の抽出において高圧力処理は, 抽出効率を高める, 酵素失活に利用できる等の優れた方法であることが確認できた。

この実験にあたり新鮮な酵母試料を提供していただ

いた中越酵母㈱に対して謝意を表します。また, 本研究の実験に尽力された五十嵐俊勝氏に感謝します。

文 献

- 1) G. M. BROWN, D. C. ROHRER and C. A. BEEVERS: *Acta Cryst.*, **B28**, 3145-3158 (1972).
- 2) 吉田 博, 藤本水石, 林 淳三: 日食工誌, **39**, 601-607 (1992).
- 3) Y. ODA, K. UNO and S. OHTA: *Appl. Environ. Microbiol.*, 941-943 (1986).
- 4) 神崎 浩: 日本農芸化学会大会講演要旨集, **68**, p. 396 (1994).
- 5) R. P. ADAMS, E. KENDALL and K. K. KARTHA: *Biochem. Sys. Ecol.*, **18**, 107-110 (1990).
- 6) 河合弘康: 化学と生物, **31**, 374-381 (1993).
- 7) 岩橋 均, 藤井真介, 大淵 薫, 小松泰彦: 日本農芸化学会大会講演要旨集, **68**, p. 601 (1994).
- 8) J. H. CROWE, and L. M. CROWE: *Science*, **223**, 701-703 (1984).
- 9) 食品と開発, **28**, 61-62 (1993).
- 10) 月刊フードケミカル, **4**, p. 15 (1993).
- 11) 吉川ユミ, 永田和久, 松本幹治, 大矢晴彦: 化学工学論文集, **17**, 601-606 (1991).
- 12) 山崎 彬, 笹川秋彦, 杵淵美倭子, 山田明文: 「高圧バイオサイエンス」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 328 (1994).
- 13) 笹川秋彦, 杵淵美倭子, 山崎 彬, 山田明文: 「高圧バイオサイエンス」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 336 (1994).
- 14) 大隅正子: 「加圧食品—研究と開発—」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 157 (1990).
- 15) 岡田 功: 「化学工学」, 電気大出版局, 東京, p. 229 (1990).
- 16) 江口 彌, 中塩文行, 長浜邦雄, 平田 彰, 宝沢光輝: 「化学工学便覧」, 化学工学会編, 丸善, 東京, p. 540 (1988).
- 17) 功刀 滋: 「食品への高圧利用」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 105 (1989).
- 18) 森 章, 巻本彰一, 谷口吉弘: 「高圧科学と加圧食品」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 151 (1991).
- 19) 玉岡 徹, 伊藤典一, 林 力丸: 「高圧科学と加圧食品」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 151 (1991).
- 20) 林 健一, 高橋真哉, 浅野裕志, 林 力丸: 「加圧食品—研究と開発—」, 林 力丸編, さんえい出版, 京都, p. 277 (1990).
- 21) A. B. NEWMAN: *Trans. Am. Inst. Chem. Eng.*, **27**, 310 (1931).

(平成 7 年 3 月 27 日受付; 平成 7 年 5 月 29 日受理)