

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2815023号

(45)発行日 平成10年(1998)10月27日

(24)登録日 平成10年(1998) 8月14日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 P 19/14		C 1 2 P 19/14	Z
19/24		19/24	

請求項の数2 (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平1-268171	(73)特許権者	999999999 農林水産省食品総合研究所長 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22)出願日	平成1年(1989)10月17日	(73)特許権者	999999999 日本石油化学株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目3番1号 (幸ビル)
(65)公開番号	特開平3-130086	(72)発明者	谷口 肇 茨城県牛久市刈谷町2丁目194-4
(43)公開日	平成3年(1991)6月3日	(72)発明者	佐々木 堯 茨城県つくば市並木3-553
審査請求日	平成8年(1996)8月6日	(72)発明者	北岡 本光 茨城県つくば市千現1-14-10 コーポ ニューV208
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎
		審査官	谷口 博

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 セロピオースの製造方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 燐酸の存在下、シュクロースにシュクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼおよびセロピオースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするセロピオースの製造方法。

【請求項2】 下記の行程からなることを特徴とするセロピオースの製造方法。

(1) 燐酸の存在下、シュクロースにシュクロースホスホリラーゼを作用させてフルクトースとグルコース-1-燐酸を得る行程

(2) 前記行程(1)のフルクトースにグルコースイソメラーゼを作用させてグルコースを得る行程

(3) 前記行程(2)のグルコースと前記行程(1)のグルコース-1-燐酸にセロピオースホスホリラーゼを作用させてセロピオースと燐酸を得る行程

2

(4) 前記行程(3)の反応液から少なくとも一部のセロピオースを回収し、燐酸を含む残余の反応液の少なくとも一部を前記行程(1)に循環させる行程

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

本発明はセロピオースの新規な製造方法に関する。セロピオースはグルコース2分子が-1,4結合した二糖類であり、セルロースの最低構成単位として知られている。このセロピオースは、シュクロース、マルトースなどの二糖類に比べて安定であり、しかも食品としての利用を考える場合はノンカロリーであり、かつ甘味が少ないため、合成甘味料の増量剤に用いる等の用途が期待される。

〔従来の技術〕

セロピオースの製造法としては、従来はセルロースを

10

(2)

3

原料とするものしか知られておらず、たとえばセルロースの酸分解による方法や酵素分解による方法等が挙げられる。前者は、セルロースを加酢酸分解することによって生成するセロピオースオクタアセテイトを脱酢酸することによってセロピオースを製造する方法であり (A.N. Pereira et al., Methods Enzymol., 160, 26 (1988))、後者はセルロースにセルロース分解酵素であるセルラーゼを作用させることによりセルロースから直接セロピオースを生成させる方法である (谷口肇: 日本農芸化学会誌, 63, 1133 (1989))。

〔発明が解決しようとする課題〕

前記従来法のいずれにおいても、セロピオースはセルロースの分解産物として製造される。ところで、セルロースは植物の細胞壁に主成分として含まれるが、通常セルロースはそれ単独では存在せず、ヘミセルロース、リグニン等との混合物として存在する。そこで、前記従来法においてその原料としてセルロースを使用するならば、まずセルロース原料からアルカリ処理等の方法でヘミセルロース、リグニン等を除かねばならず、そのため原料の製造コストが高くなる。そのうえ、酸分解による方法においては分解反応に強酸が用いられるため、安全性の問題から食品用途への応用は難しい。また、酵素分解による方法においてはセルロースに対して十分な活性を示すセルラーゼが得られていないという問題がある。これらの理由によって、セロピオースを低コストで大量に製造する方法は確立していないのが現状である。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは従来法の欠点をすべて解消し、安価にしかも高収率で大量にセロピオースを製造できる新規な方法を開発すべく検討を重ねた結果、セロピオース製造における原料コストの低減を図るために原料をシュクロース (蔗糖) に求め、シュクロースに対して燐酸の存在下にシュクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼおよびセロピオースホスホリラーゼの三種の酵素を組み合わせて作用させることによって、容易にかつ高収率でセロピオースを製造できることを見出した。本発明はこの新しい知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は第 1 に燐酸の存在下、シュクロースにシュクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼおよびセロピオースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするセロピオースの製造方法を提供し、第 2 の下記の行程からなることを特徴とするセロピオースの製造方法

(1) 燐酸の存在下、シュクロースにシュクロースホスホリラーゼを作用させてフルクトースとグルコース - 1 - 燐酸を得る行程

(2) 前記行程 (1) のフルクトースにグルコースイソメラーゼを作用させてグルコースを得る行程

(3) 前記行程 (2) のグルコースと前記行程 (1) のグルコース - 1 - 燐酸にセロピオースホスホリラーゼ

4

を作用させてセロピオースと燐酸を得る行程

(4) 前記行程 (3) の反応液から少なくとも一部のセロピオースを回収し、燐酸を含む残余の反応液の少なくとも一部を前記行程 (1) に循環させる行程を提供するものである。

本発明で原料とするシュクロース (蔗糖) は、グルコース 1 分子とフルクトース 1 分子が - 1, - 2 結合した二糖類であり、天然に存在するものであっても、化学的に合成されたものであってもよい。また、本発明ではシュクロースとして糖蜜をそのまま用いることも可能である。

本発明の第 1 は、燐酸の存在下でシュクロースにシュクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼおよびセロピオースホスホリラーゼを作用させてセロピオースを製造する方法である。この酵素処理は、イミダゾール - 塩酸緩衝液、燐酸緩衝液等の適当な溶液で行われる。

ここで用いられる各酵素は、いずれも公知の酵素であるので市販品あるいはこれら酵素を生産する微生物等の培養により得られもの等のいずれでもよい。また、各酵素は精製品、未精製品、公知の固定化法により固定化された固定化酵素あるいは該酵素を含む微生物菌等のいずれの状態でも用いても差し支えない。これら各酵素の使用量は特に制限されず、適宜に決定されるが、通常は原料のシュクロース 1 モルに対しそれぞれ 0.1 単位以上、好ましくは 200 単位以上とするのがよい。これら酵素量を表す単位は、後記調製例に記載する方法により規定されるものである。

また、酵素処理系に存在させる燐酸としては、通常の無機燐酸の他、燐酸 2 水素ナトリウム、燐酸 2 水素カリウム、燐酸水素 2 ナトリウム、燐酸水素 2 カリウム、燐酸 3 ナトリウム、燐酸 3 カリウムなどの燐酸塩あるいは燐酸緩衝液等各種のものをを用いることができる。上記燐酸の使用割合は特に限定的ではないが、通常は原料のシュクロース 1 モルに対して 0.001 モル以上、好ましくは約 0.01 モル以上約 1.5 モル以下とするのがよい。また、原料であるシュクロースの濃度は 0.1% 以上、好ましくは 1% 以上にするのがよい。

酵素処理の反応温度は各酵素の失活しない温度であればよく、通常は約 20 ~ 60 の範囲で行われる。さらに、反応系の pH は用いる各酵素がいずれも失活しない範囲であれば良いが、通常は約 5 ~ 8 の範囲、好ましくは約 6 ~ 7.5 の範囲にするとよい。処理時間は特に限定されないが、通常は数時間から数百時間の範囲でセロピオースの生成量が最大となったところで終了すればよい。

酵素処理反応終了後、適宜の方法により反応液からセロピオースを分離精製する。上記方法では処理液中に酵素が含まれるので、通常は初めに反応液を加熱して酵素を失活させ、その後適宜の分離手段により処理液からセロピオースを分離する。この際、反応物のシュクロース

(3)

5

などが分離に障害になるならば、あらかじめ適宜の分解酵素により分解する。たとえば、反応液にインペルターゼを加えることにより未反応のシュクロースを分解させた後、活性炭カラムクロマトグラフィー等の方法によりセロピオースを精製することができる。なお、反応液からのセロピオースの分離には、溶解度の差を利用してセロピオースを選択的に析出させる方法もある。

本発明の第 2 は、下記の (1) ~ (4) の行程からなることを特徴とするセロピオースの製造方法である。

(1) 燐酸の存在下、シュクロースにシュクロースホスホリラーゼを作用させてフルクトースとグルコース - 1 - 燐酸を得る行程

(2) 前記行程 (1) のフルクトースにグルコースイソメラーゼを作用させてグルコースを得る行程

(3) 前記行程 (2) のグルコースと前記行程 (1) のグルコース - 1 - 燐酸にセロピオースホスホリラーゼを作用させてセロピオースと燐酸を得る行程

(4) 前記行程 (3) の反応液から少なくとも一部のセロピオースを回収し、燐酸を含む残余の反応液の少なくとも一部を前記行程 (1) に循環させる行程

上記の各行程の酵素処理は、通常イミダゾール - 塩酸緩衝液、燐酸緩衝液等の適当な溶液中で行われる。ここで用いられる各酵素はいずれも公知の酵素であるので、市販品あるいはこれら酵素を生産する微生物等の培養により得られるもの等のいずれでもよい。また、各酵素は精製品、未精製品、公知の固定化法により固定化された固定化酵素あるいは該酵素を含む微生物菌等のいずれの状態でも差し支えない。

これら各酵素の各行程における使用量は特に制限されず、適宜に決定されるが、通常は各行程の原料とするシュクロース、フラクトースまたはグルコースの各 1 モルに対し該当酵素をそれぞれ 0.1 単位以上、好ましくは 200 単位以上とするのがよい。これら酵素量を表す単位は、後記調製例に記載する方法により規定されるものである。

また、行程 (1) の処理系に存在させる燐酸としては、前記した本発明の第 1 と同様、通常の無機燐酸の他、燐酸 2 水素ナトリウム、燐酸 2 水素カリウム、燐酸水素 2 ナトリウム、燐酸水素 2 カリウム、燐酸 3 ナトリウム、燐酸 3 カリウムなどの燐酸塩あるいは燐酸緩衝液等各種のものを用いることができる。上記燐酸の使用割合は特に限定的ではないが、通常は原料のシュクロース 1 モルに対して 0.001 モル以上、好ましくは約 0.01 モル以上約 1.5 モル以下とするのがよい。また、行程

(1) の原料であるシュクロースの濃度は 0.1% 以上、好ましくは 1% 以上にするのがよい。

各行程における酵素処理は、各酵素の失活しない温度で行えばよく、通常はいずれも行程の温度も 20 ~ 80 の範囲から選択される。好ましくは、行程 (1) において約 20 ~ 60 の範囲で、行程 (2) においては約 20 ~ 80

6

の範囲で、行程 3 においては約 20 ~ 60 の範囲で行われる。また、各行程の pH についても各酵素が失活しない範囲であれば良い。いずれの行程も好ましくは約 5 ~ 8 の範囲、より好ましくは約 6 ~ 7.5 の範囲にするとよい。各行程の処理時間は特に限定されないが、通常は数時間から数百時間の範囲でセロピオースの生成量が最大となったところで終了すればよい。

本発明の上記方法は、たとえば行程 (1) においてシュクロースを燐酸の存在下にシュクロースホスホリラーゼで処理することにより、フルクトースとグルコース - 1 - 燐酸を得た後、得られたフルクトースとグルコース - 1 - 燐酸を分離回収し、次いで行程 (2) ではこのフルクトースをグルコースイソメラーゼにより処理してグルコースを得る。得られた反応液からグルコースを回収し、行程 (3) として、行程 (2) から得られたグルコースと前記行程 (1) から回収されたグルコース - 1 - 燐酸とをセロピオースホスホリラーゼにより処理しセロピオースと燐酸を得る。最後に、行程 (4) として、行程 (3) で得られたセロピオースの少なくとも一部を本発明の目的物として回収し、行程 (3) から回収された燐酸の少なくとも一部は前記行程 (1) に戻すことにより燐酸は循環使用される。かくすることにより、行程 (1) の燐酸は循環使用されるので効率よくセロピオースを生産することが出来る。

ここで、上記本発明の第 2 における (1) ~ (3) の各行程において、各行程はいずれも他の行程における原料、生産物あるいは酵素により各行程の酵素はその作用に影響がないことが本発明者らにより確認された。すなわち、他の行程における原料、生産物あるいは酵素が共存していても各行程の酵素反応は、その作用に実質的に影響がないのである。それ故、最も好ましい方法は、前記 3 種の酵素を公知の固定化手段、例えばゲル包括性、マイクロカプセル法、担体結合法等により各々別個の固定床にあるいは同じ固定床に固定化して得られる固定化酵素を用いて、上記行程 (1) ~ (3) の酵素反応を連続的に行う方法である。具体的には、前記 3 種の酵素を行程順にシュクロースホスホリラーゼ、グルコースイソメラーゼ、セロピオースホスホリラーゼとなるように同じ固定床に固定化し、この固定床に連続してシュクロースと燐酸を通すことによりセロピオースと燐酸を含む反応液を得る方法である。得られた燐酸の少なくとも一部は原料に循環させることにより再利用され、同時に未反応のシュクロースも循環させれば、さらに収率が向上することとなる。

ところで、この方法では当然のことながら前記 3 種の酵素の反応条件が同一となる。しかしながら、本発明で用いる 3 種の酵素の至適反応温度は必ずしも一致しない。たとえば、行程 (2) の酵素であるグルコースイソメラーゼの反応温度は、他の 2 種の酵素のそれよりもわずかに高くするのがより好ましい。したがって、前記 3

(4)

7

種の酵素をそれぞれ別個の前記行程(1)~(3)に対応する固定床として公知の固定化法により固定化し、各固定床における温度は各酵素の至適温度に一致させることにより連続して反応させる方法、すなわち原料のシュクロースと燐酸を連続的に行程(1)の固定床に流し、次いで行程(1)の反応液を行程(2)の固定床に流すというように、前行程の固定床からの反応液を次行程に流し、循環させる方法が最も好ましい。ここで、行程(3)の固定床から得られるセロピオースと燐酸を含む反応液から少なくとも一部のセロピオースを回収し、また少なくとも一部の燐酸は行程(1)の燐酸として再利用する。具体的には、行程(3)の固定床からの反応液は、そのまま行程(1)の固定床に循環させ、この循環液の一部を連続的あるいは間欠的に取り出し、適宜の方法でセロピオースと燐酸とを分離する。酵素は当然のことながら存在しないので、これを失活する必要はない。この循環液には未反応のシュクロース、フルクトース、グルコースなども含まれるが、これらがセロピオースの分離に障害になるならば、適宜の分離酵素、たとえばシュクロースでは前述したようにインペルターゼにより分離し、その後適宜の分離手段、たとえば活性炭クロマトグラフィーにより分離すれば、セロピオースが得られる。勿論、未反応のシュクロースなどがセロピオースの分離に障害にならないならば、特にこれを分解する必要はない。セロピオースの分離には、前述した溶解度の差を利用する方法も利用できる。セロピオースを分離した残液には燐酸が含まれるので、これは行程(1)に循環すれば良い。かくすることにより、各行程は至適条件でもって運転することが出来、また燐酸が再利用できるため好ましい方法となる。

〔実施例〕

以下、本発明をさらに詳しく説明する実施例をあげる。なお、各実施例に用いた酵素は以下の方法により調製したものである。

調製例 1 (シュクロースホスホリラーゼの調製)

シグマ社より市販のロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 起源のシュクロースホスホリラーゼ10mgを10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した。この酵素活性は17.5単位であった。また、本酵素による反応はセロピオースおよびグルコースの存在によって実質的な影響は受けなかった。

なお、上記シュクロースホスホリラーゼにおける酵素活性の単位は、37 において10mMのシュクロースおよび10mMの燐酸存在下に、pH7.0において1分間に1  $\mu$ molのグルコース - 1 - 燐酸および等モルのフルクトースを生成する酵素量を1単位と定義した。

調製例 2 (グルコースイソメラーゼの調製)

関東化学(株)より市販のナガセ生化学工業(株)製のストレプトマイセス (*Streptomyces*) 起源のグルコー

8

スイソメラーゼ粗製酵素1gを20mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁して超音波破碎処理を行った。該処理液を遠心分離し、上清に対して80%飽和になるまで硫酸を加えた。さらに、該溶液を遠心分離し、沈澱を上記緩衝液5mlに溶解した。この酵素活性は7.5単位であった。また、本酵素による反応はシュクロース、グルコース - 1 - 燐酸、燐酸、セロピオースの存在によって何の影響も受けなかった。なお、上記グルコースイソメラーゼにおける酵素活性の単位は、37 において10mMのフルクトースからpH7.0において1分間に1  $\mu$ molのグルコースを生成する酵素量を1単位と定義した。

調製例 3 (セロピオースホスホリラーゼの調製)

セルビブリオ・ギルプス (*Cellvibrio gilvus*) の培養菌体10g (湿潤重量) を50mlの50mM燐酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁して超音波破碎処理を行った。第処理液を遠心分離し、その上清に対して35%飽和になるまで硫酸を加え、さらに遠心分離を行い上清を得た。該上清に、さらに60%飽和になるまで硫酸を加え、遠心分離を行い、その沈澱を20mlの上記燐酸緩衝液に溶解した。これを同緩衝液で平衡化したDEAE - Toyopearlカラム (直径1.5cm  $\times$  15cm) に通し、吸着させた。同緩衝液でカラムを洗浄後、0.15 - 0.25M NaClのリニアグラジエントにより蛋白を溶出させた。活性画分を集め60%飽和になるまで硫酸を加え、遠心分離により沈澱を集めた。該沈澱を10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、セロピオースホスホリラーゼを得た。この酵素活性は42.5単位であった。また、本酵素による反応はシュクロース、フルクトースの存在によって何の影響も受けなかった。なお、上記セロピオースホスホリラーゼにおける酵素活性の単位は、37 において10mMのグルコース - 1 - 燐酸および10mMのグルコース存在下に、pH7.0において1分間に1  $\mu$ molの燐酸および等モルのセロピオースを生成する酵素量を1単位と定義した。

実施例 1

50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にシュクロース100mM、燐酸緩衝液10mM、シュクロースホスホリラーゼ0.26単位/ml、グルコースイソメラーゼ0.034単位/mlおよびセロピオースホスホリラーゼ0.29単位/mlを溶解し、反応液を調製した。該反応液を37 において反応させ、経時適にセロピオースとシュクロースの濃度を測定した。両者の濃度の経時変化を第1図に示した。

その結果、シュクロースは24時間後に既に50%以上セロピオースに転換され、最終的には70%以上セロピオースに転換した。

実施例 2

10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にシュクロース200mM、燐酸緩衝液20mM、シュクロースホスホリラーゼ0.22単位/ml、グルコースイソメラーゼ0.058単位/mlおよびセロピオースホスホリラーゼ0.21単位/mlを溶解し、反応液を調製した。該反応液を37 において

(5)

9

120時間反応させたところ、シュクロース濃度は20.3mMとなり、セロピオース濃度は147mM（収率73.5%）であった。次いで、該反応液を沸騰水浴中に10分間保持することにより酵素活性を失活させた後、インペルターゼを加え、残存しているシュクロースを分解した。この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い、セロピオース画分を濃縮後、凍結乾燥を行って380mgの白色粉末を得た。この時の収率は55%であった。

#### 実施例 3

3個のカラム（直径0.8cm×2cm）に陰イオン交換樹脂 AMBERLITE IRA400（オルガノ（株）社製）を充填し、さらにそれぞれ20mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液（pH 7.0）で洗浄し、それぞれカラム1,カラム2,カラム3とした。カラム1に調製例1により調製されたシュクロースホスホリラーゼ溶液1mlを通液し、さらに10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液（pH7.0）でカラムを洗浄して固定化シュクロースホスホリラーゼを得た。カラム2に調製例2により調製されたグルコースイソメラーゼ溶液0.1mlを通液し、さらに10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液（pH7.0）でカラムを洗浄して固定化グルコースイソメラーゼを得た。カラム3に調製例3により調製されたセロピオースホスホリラーゼ溶液0.4mlを通液し、さらに10mlの50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液（pH7.0）でカラムを洗浄して固定化セロピオースホスホリラーゼを得た。固定化酵素を含む上記のカラム1,2および

10

3を直列に接続し、カラム1および3は37 に、カラム2は50 に保ち、3連型カラムリアクターを構築した。50mMイミダゾール - 塩酸緩衝液（pH7.0）中にシュクロース100mM, 燐酸緩衝液10mMになるように調製した反応液10mlを前記の3連型カラムリアクターに5ml/時間の流速でカラム1 カラム2 カラム3 カラム1 の順番に循環させて60時間反応させた。その結果、反応液中のシュクロースの73%がセロピオースに転換した。

〔発明の効果〕

10 本発明によれば、異なる3種の酵素反応を組み合わせ使用することによって原料とするシュクロースから高収率で、しかも容易に、かつ安価にセロピオースを収得することができる。本発明によるシュクロースからセロピオースへの転換率（すなわち収率）は実に70%以上であり、これは本発明で用いる各酵素反応につき知られている性質からは全く予期できないものである。

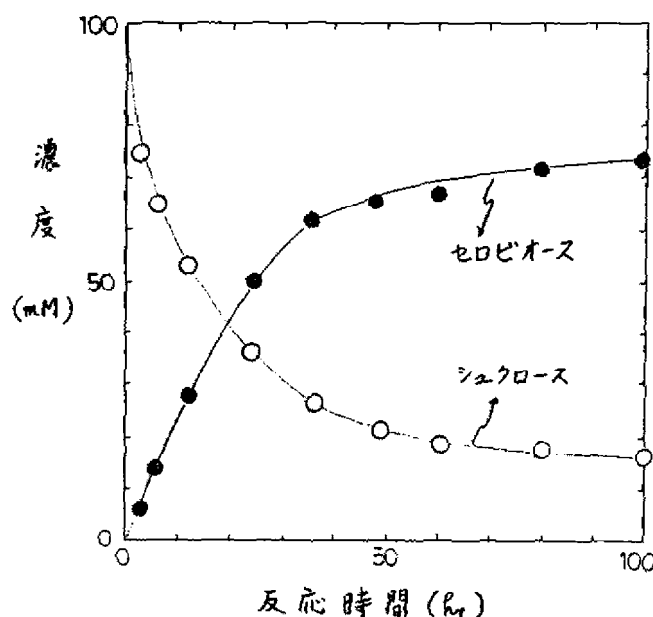
しかも、各酵素を固定化し、これにより連続的に酵素反応を行う場合は、燐酸の再利用も図れる上に、各酵素を至適温度でもって反応させることが容易となり、反応の効率は格段に向上する。

20 本発明により得られるセロピオースは、食品分野において有用なものである。

【図面の簡単な説明】

第1図は実施例におけるセロピオースとシュクロースの濃度の経時的変化を示すグラフである。

【第1図】



(6)

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>6</sup>, DB名)

C12P 19/14

C12P 19/24

C A ( S T N )