

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2817746号

(45) 発行日 平成10年(1998)10月30日

(24) 登録日 平成10年(1998) 8月21日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 19/14
19/24

C 1 2 P 19/14
19/24

Z

請求項の数 1 (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平3-171873

(22) 出願日

平成 3 年 (1991) 6 月 18 日

(65) 公開番号

特開平4-370099

(43) 公開日

平成 4 年 (1992) 12 月 22 日

審査請求日

平成 8 年 (1996) 8 月 6 日

(73) 特許権者 591031360

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

(73) 特許権者 000231682

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

(72) 発明者

谷口 肇

茨城県牛久市刈谷町 2 丁目 194 - 4

(72) 発明者

佐々木 堯

茨城県つくば市並木 3 丁目 553

(72) 発明者

北岡 本光

茨城県つくば市千現 1 丁目 14 - 10 コー

ポニユー 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】 ラミナリピオースの製造方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シュクロースを、リン酸の存在下に

(1) シュクロースホスホリラーゼ、(2) グルコース
イソメラーゼ並びに(3) ラミナリピオースホスホリラ
ーゼ及び/又は - 1, 3オリゴグルカンホスホリラ
ーゼで処理することを特徴とするラミナリピオースの製造
方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ラミナリピオースの製
造方法に関する。ラミナリピオースは、グルコース 2 分
子が - 1, 3 結合した二糖類であり、ラミナラン、カ
ードラン、パキマン等の - 1, 3 グルカンの最低構成
単位として知られている。これら - 1, 3 グルカンの
中には、制癌活性のあるものも知られており、その最低

2

構成単位であるラミナリピオースにも生理活性物質とし
ての用途が期待される。

【0002】

【従来の技術】 ラミナリピオースの製造方法としては、
- 1, 3 グルカンの限定酸加水分解による方法 [Whelan,
M.J.: Methods in Carbohydrate Chemistry, 1, 330 (196
2)] が知られており、また本発明者らは、ラミナリピオ
ースホスホリラーゼ及び/又は - 1, 3オリゴグルカ
ンホスホリラーゼによりグルコース - 1 - リン酸とグル
コースからラミナリピオースを製造する方法を確立し、
特許出願した (特願平 2 - 175259)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、前者の方法で
は、原料の - 1, 3 グルカンが比較的高価であり、し
かも反応自体の収率が良くない、副産物として各種重合

(2)

3

度のオリゴ糖が生成する等の欠点がある。また、反応を行うにあたり酸を用いるため、製造されるラミナリビオースの用途に著しい制限を受けることになる。一方、後者の方法においても、原料のグルコース - 1 - リン酸が比較的高価である上に、やはり副産物として各種重合度のオリゴ糖が生成するという欠点がある。

【0004】このような理由から、ラミナリビオースを低コストで、しかも大量に製造する方法が確立していないのが現状である。したがって、本発明の目的は、上記のような欠点がなく、安価に、かつ高収率で大量にラミナリビオースを製造する新規な方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、ラミナリビオースの製造における原料コストの低減と収率の向上を図るために、シュクロースを原料とし、リン酸の存在下にシュクロースホスホリラーゼとグルコースイソメラーゼ並びにラミナリビオースホスホリラーゼ及び/又は - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼの3種あるいは4種の酵素を組合せて作用させることにより容易に、かつ高収率でラミナリビオースを製造できることを見出し、かかる知見に基づいて本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明はシュクロースを、リン酸の存在下に(1)シュクロースホスホリラーゼ、(2)グルコースイソメラーゼ並びに(3)ラミナリビオースホスホリラーゼ及び/又は - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼで処理することを特徴とするラミナリビオースの製造方法を提供するものである。

【0007】本発明に使用する酵素としては、シュクロースホスホリラーゼとグルコースイソメラーゼの2種の酵素を併用し、これに加えてさらにラミナリビオースホスホリラーゼ、 - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼ又はこれらの混合物を組合せ、3種あるいは4種の酵素を原料のシュクロースに作用させる。

【0008】本発明で原料として使用するシュクロースは、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、如何なる起源のものでも用いることができる。また、本発明ではシュクロースとして糖蜜をそのまま使用することもできる。

【0009】本発明では、上記したように、リン酸の存在下でシュクロースに3種あるいは4種の酵素を作用させてラミナリビオースを製造するが、この酵素処理は、例えばイミダゾール塩酸緩衝液、リン酸緩衝液等の適当な水溶液中で行うことが望ましい。

【0010】本発明で使用する上記酵素は、いずれも公知のものであり、市販品を用いる他、これら酵素を生産する微生物等を培養して得たものを使用してもよい。また、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体

4

等いずれの形態のものでも差し支えない。

【0011】ところで、ラミナリビオースホスホリラーゼと - 1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼは、国際生化学連合酵素委員会報告により、それぞれEC2.4.1.31及びEC2.4.1.30と異なった酵素番号が与えられているが、両酵素とも本質的にラミナリオリゴ糖を加里ン酸分解して重合度の1つ少ないラミナリオリゴ糖とグルコース - 1 - リン酸を生成する可逆反応を触媒するものである。また、両酵素ともラミナリビオースにも作用し、リン酸の存在下に可逆的にグルコースとグルコース - 1 - リン酸を生成する。このように、両酵素は触媒する反応が同一であるため、本発明においてはいずれか一方の酵素が存在すればよいが、勿論両方が存在してもよい。後者の場合、両者の配合割合は任意である。よって、本明細書では特に断わらない限り、ラミナリビオースホスホリラーゼの記載は両酵素を含むものとする。

【0012】次に、本発明で用いる上記3種あるいは4種の酵素の使用量については、特に制限されず、使用目的等を考慮して適宜決定すればよいが、通常は原料のシュクロース1モルに対してそれぞれ0.1単位以上、好ましくは200単位以上とするのがよい。なお、これら酵素量を表す単位は、後記する製造例に記載の方法によって規定されるものである。

【0013】また、本発明に用いるリン酸は、通常の無機リン酸の他、リン酸2水素ナトリウム、リン酸2水素カリウム、リン酸3カリウム等のリン酸塩の形態で反応系に供給することができる。さらに、リン酸緩衝液としてのリン酸など各種のものを使用でき、要するにリン酸を解離する限りいずれの形態のものでも用いることができる。

【0014】リン酸の使用割合については、特に限定されないが、通常は原料のシュクロース1モルに対してリン酸換算で0.001モル以上、好ましくは0.01モル以上1.5モル以下とするのがよい。

【0015】また、シュクロースの濃度は、反応系において0.1%以上、好ましくは1%以上とする。シュクロースの濃度の上限は特に限定されず、シュクロースの溶解度以下であればよい。

【0016】次に、酵素処理のための反応温度については、酵素が失活しない温度範囲であればよく、通常は約20~60の範囲が適当である。反応系のpHについては、用いる各酵素がいずれも失活しない範囲であればよく、通常は約5~8の範囲、好ましくは約6~7.5の範囲とすればよい。反応温度やpHの範囲が上記範囲を外れると、酵素の失活等が起こり、好ましくない。

【0017】本発明の酵素反応の時間については、特に制限はないが、通常は数時間から数百時間の範囲でラミナリビオースの生成量が最大となったところで反応を終了させればよい。酵素反応終了後、既知の方法により適宜反応液からラミナリビオースを分離、精製する。

(3)

5

【0018】

【実施例】以下に本発明の実施例を示して詳しく説明するが、各実施例において用いた酵素は下記の方法により製造したものである。

【0019】製造例 1

シ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*) 起源のシクロースホスホリラーゼ 15 mg を 10 ml の 50 mM イミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。このときの酵素活性は 23.5 単位であった。なお、シ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 10 mM シクロース, 10 mM リン酸存在下 pH 7.0 において 1 分間に 1 μ mol のグルコース - 1 - リン酸及び等モルのフルクトースを生成する酵素量を 1 単位として定義した。

【0020】製造例 2

グルコースイソメラーゼの調製

関東化学(株)より市販の長瀬生化学工業(株)製のストレプトマイセス(*Streptomyces*)起源のグルコースイソメラーゼ粗製酵素 1 g を 20 ml の 50 mM イミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH 7.0) 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 5 ml に溶解した。このときの酵素活性は 1.8 単位であった。なお、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 10 mM フルクトースから pH 7.0 において 1 分間に 1 μ mol のグルコースを生成する酵素量を 1 単位として定義した。

【0021】製造例 3

ラミネナリビオースホスホリラーゼの調製

ユーグレナ・グラチリス・z (*Euglena gracilis* z) 株の培養菌体 10 g を 20 ml の 50 mM イミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH 7.0) 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 30% 飽和になるまで硫酸を加えた後、さらに遠心分離を行い上清を得た。該上清を、20% 飽和濃度硫酸を含んだ同緩衝液で平衡化したブチル - トヨパールカラム (ゲル体積 5 ml) に通して酵素を吸着させた。同カラムを 20% 飽和濃度硫酸を含んだ同緩衝液で洗浄した後、10% 飽和濃度硫酸を含んだ同緩衝液で酵素を溶出させ活性画分を集めた。このときの酵素活性は 1.8 単位であった。なお、ラミネナリビ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 10 mM グルコース, 10 mM グ

6

ルコース - 1 - リン酸存在下 pH 7.0 において 1 分間に 1 μ mol のリン酸及び等モルのラミネナリビオースを生成する酵素量を 1 単位として定義した。

【0022】実施例 1

2 ml の 50 mM イミダゾール - 塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中にシクロース 200 mM, リン酸水素 2 ナトリウム 20 mM, シクロースホスホリラーゼ 0.47 単位/ml, グルコースイソメラーゼ 0.072 単位/ml, ラミネナリビオースホスホリラーゼ 0.37 単位/ml になるように反応液を調製し、37 において経時的にシクロースとラミネナリビオース及び重合度 3 以上のラミネナリオリゴ糖の濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。結果を図 1 に示す。

【0023】図から明らかなように、シクロースは反応時間約 48 時間において殆ど観測されなくなり、収率約 55% でラミネナリビオースに変換された。また、このときの副生成物であるラミネナリオリゴ糖は重合度 3 のものが約 17% の収率で生成する他は重合度 4 のものが僅かに確認されるのみであり、高収率かつ高選択率でラミネナリビオースが生成していることが判る。

【0024】実施例 2

実施例 1 において、リン酸水素 2 ナトリウムの濃度を 10 mM に代えたこと以外は実施例 1 と同様に行った。その結果、反応時間 48 時間でシクロースは約 6% しか残存せず、収率約 55% でラミネナリビオースに変換された。また、このときの副生成物であるラミネナリオリゴ糖は重合度 3 のものが約 13% の収率で生成する他は重合度 4 のものが僅かに確認されるのみであり、高収率かつ高選択率でラミネナリビオースが生成していることが判明した。

【0025】比較例 1

2 ml の 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸 100 mM, グルコース 100 mM, ラミネナリビオースホスホリラーゼ 0.1 単位/ml になるように反応液を調製し、37 において 2 時間反応を行った。その結果、生成したラミネナリビオースの収率は僅か 21% であり、副生成物として重合度 3 ~ 8 のラミネナリオリゴ糖がそれぞれ収率 13%, 8.5%, 5.2%, 3.1%, 1.7%, 0.5% で生成した。

【0026】

【発明の効果】本発明によれば、重合度 3 以上のラミネナリオリゴ糖の副生が少なく、選択的に高収率で目的とするラミネナリビオースを製造することができる。したがって、反応物からのラミネナリビオースの単離も容易である。

(4)

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12P 19/14

C12P 19/24

C A (S T N)