

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6501306号  
(P6501306)

(45) 発行日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(24) 登録日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 P</b>	<b>19/44</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 19/44
<b>C 1 2 N</b>	<b>9/26</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 9/26 Z
<b>C 1 2 N</b>	<b>9/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 9/24

請求項の数 3 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2015-530848 (P2015-530848)	(73) 特許権者	304027279
(86) (22) 出願日	平成26年7月31日 (2014.7.31)		国立大学法人 新潟大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/070210		新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
(87) 国際公開番号	W02015/019939	(74) 代理人	100080089
(87) 国際公開日	平成27年2月12日 (2015.2.12)		弁理士 牛木 護
審査請求日	平成29年5月17日 (2017.5.17)	(74) 代理人	100161665
(31) 優先権主張番号	特願2013-163801 (P2013-163801)		弁理士 高橋 知之
(32) 優先日	平成25年8月7日 (2013.8.7)	(74) 代理人	100121153
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 守屋 嘉高
		(74) 代理人	100178445
			弁理士 田中 淳二
		(74) 代理人	100133639
			弁理士 矢野 卓哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-グルコシドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン酸、 $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、

(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し  $\alpha$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに

(ii)  $\alpha$ -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して  $\alpha$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させることを特徴とする、 $\alpha$ -グルコシドの製造方法。

【請求項2】

(i) の糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し  $\alpha$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せが、スクロースとスクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) との組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) との組合せ、セロピオースとセロピオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.49) 及びセロピオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリピオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) 及び/若しくは  $\alpha$ -1,3オリゴグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.30) との組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは  $\alpha$ -1,2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、並びにトレハロースとトレハロースホスホリラーゼ (EC

10

20

2.4.1.231)との組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(ii)の - グルコシドを可逆的に加リン酸分解して - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せが、ニゲロスホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロースとの組合せ、コージビオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル - 1, 2 - グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN - アセチルグルコサミンとの組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、請求項1に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素法を用いて - グルコシドを選択的に製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

日本の伝統食品である清酒や味噌、味醂に微量に含まれるニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖は、免疫賦活作用・腸内細菌叢改善作用・抗う蝕作用などヒトの健康保持に有益な機能性を有することが報告されており、食品や医薬品素材としての利用が期待されている。このように近年栄養面からだけでなく、オリゴ糖の機能性が注目されているが、その高純度調製の困難さ・高コストが当該オリゴ糖の産業応用を妨げている。そこで現在、食品・医薬品産業界での利用が高く見込まれる機能性ニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖を含む各種 - グルコシドを選択的かつ低コストで大量製造する方法の確立が強く望まれている。

20

【0003】

ニゲロオリゴ糖やコージオリゴ糖などの - グルコシドの選択的な製造方法として、 - グルコシドを可逆的に加リン酸分解する酵素の逆反応触媒活性を利用し、 - グルコース - 1 - リン酸と糖アクセプターを原料とした - グルコシドの選択的合成が可能であると示唆されているが(非特許文献1~4)、 - グルコース - 1 - リン酸が高価であるため、コストの問題から実用性を欠いていた。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Belocopitow E. and Marechal L.R., (1970) Biochim. Biophys. Acta, 198, pp. 151 - 154

【非特許文献2】Chaen H. et al., (1999) J. Appl. Glycosci., 46, pp. 423 - 429

40

【非特許文献3】Nihira T. et al., (2012) Appl. Microbiol. Biotechnol., 93, pp. 1513 - 1522

【非特許文献4】Fitting C. and Doudoroff M., (1952) J. Biol. Chem., 199, pp. 153 - 163

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、安価でかつ選択的に - グルコシドを製造する汎用的方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

## 【0006】

本発明者らは、上記課題を達成するため鋭意検討した結果、酵素法により安価な糖質原料から選択的に  $\beta$ -グルコシドを生産する汎用的製造法を完成させた。

## 【0007】

すなわち、本発明は以下を包含する。

## 【0008】

(1) リン酸、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、  
 (i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し  $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに  
 (ii)  $\beta$ -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して  $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させることを特徴とする、 $\beta$ -グルコシドの製造方法。

10

## 【0009】

(2) (i) の糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し  $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素の組合せが、スクロースとスクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) との組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) との組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.49) 及びセロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) との組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) 及び/若しくは  $\beta$ -1,3オリゴグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.30) との組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは  $\beta$ -1,2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、並びにトレハロースとトレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.231) との組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、上記(1)に記載の方法。

20

## 【0010】

(3) (ii) の  $\beta$ -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して  $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せが、ニゲロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロースとの組合せ、コージビオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル- $\beta$ -1,2-グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN-アセチルグルコサミンとの組合せ、よりなる群から選択される1つ以上の組合せである、上記(1)に記載の方法。

30

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明によれば、安価でかつ選択的に  $\beta$ -グルコシドを製造する汎用的方法が提供される。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0012】

【図1】デンプンからのニゲロースの製造の概略図である。

【図2】デンプンからのグルコシル- $\beta$ -1,3-ガラクトースの製造の概略図である。

【図3】デンプンからのコージビオースの製造の概略図である。

【図4】デンプンからのトレハロースの製造の概略図である。

【図5】デンプンからのグルコシル- $\beta$ -1,1-ガラクトースの製造の概略図である。

【図6】デンプンからのグルコシル- $\beta$ -1,1-キシロースの製造の概略図である。

【図7】デンプンからのグルコシル- $\beta$ -1,1-L-アラビノースの製造の概略図であ

50

る。

【図 8】デンプンからのグルコシル - 1, 1 - L - フコースの製造の概略図である。

【図 9】デンプンからのマルトースの製造の概略図である。

【図 10】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - マンノースの製造の概略図である。

【図 11】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - キシロースの製造の概略図である。

【図 12】デンプンからのグルコシル - 1, 4 - L - フコースの製造の概略図である。

【図 13】スクロースからのニゲロースの製造の概略図である。

【図 14】セロビオースからのニゲロースの製造の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、酵素法による、 $\alpha$ -グルコシドの製造方法に関する。

【0014】

本発明の $\alpha$ -グルコシドの製造方法は、リン酸、 $\alpha$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2)、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.6) 及びそれらの補因子の存在下で、(i) 糖質原料、及び該糖質原料を可逆的に加リン酸分解し $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素の組合せ；並びに(ii)  $\alpha$ -グルコシドを可逆的に加リン酸分解して $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素及びその逆反応において糖アクセプターとして作用する物質の組合せを作用させるものである。

【0015】

本発明の酵素法は、主に以下の3つの酵素反応からなる：(A) 糖質原料の加リン酸分解反応；(B)  $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸の $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸への変換反応、(C) 糖アクセプターからの $\alpha$ -グルコシドの合成反応。

【0016】

(A) の糖質原料の加リン酸分解反応は、糖質原料と該糖質原料を加リン酸分解して $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素 (G1P生成酵素) との組合せが、リン酸の存在下で反応して、 $\alpha$ -グルコース - 1 - リン酸及び還元末糖が生じる反応である。

【0017】

糖質原料とG1P生成酵素の組合せは、これに限定されるものではないが、スクロースとスクロースホスホリラーゼとの組合せ、デンプン若しくはデキストリンとホスホリラーゼとの組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼとの組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼとの組合せ、ラミナリオリゴ糖とラミナリビオースホスホリラーゼ及び/若しくは $\alpha$ -1, 3オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、ソホロオリゴ糖とソホロースホスホリラーゼ及び/若しくは $\alpha$ -1, 2オリゴグルカンホスホリラーゼとの組合せ、トレハロースとトレハロースホスホリラーゼとの組合せ、のいずれか一つ、あるいはそれらの組合せを含む。より好ましい組合せは、スクロースとスクロースホスホリラーゼとの組合せ、セロビオースとセロビオースホスホリラーゼとの組合せ、セロデキストリンとセロデキストリンホスホリラーゼ及びセロビオースホスホリラーゼとの組合せ、デンプン又はデキストリンとホスホリラーゼとの組合せ、のいずれ一つ、あるいはそれらの組合せである。

【0018】

糖質原料の使用濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは1 ~ 1000 g/Lであり、より好ましくは10 ~ 1000 g/Lである。

【0019】

G1P生成酵素は、いかなる起源の酵素を用いることも可能であり、その使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料1gあたり0.1 ~ 1000 mgのG1P生成酵素を使用することができる。

【0020】

また、この反応に関わるリン酸は、いかなる起源のものであっても良い。反応系に加えるリン酸濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは0.1 ~ 1000 mM、より

10

20

30

40

50

好ましくは1～100 mMである。

【0021】

上記(B)の - グルコース - 1 - リン酸の - グルコース - 1 - リン酸への変換反応は、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ及びそれらの補因子の組合せによって、上記(1)の糖質原料の加リン酸分解反応で生じた - グルコース - 1 - リン酸をグルコース6 - リン酸に、グルコース - 6 - リン酸を - グルコース - 1 - リン酸へ変換する反応である。

【0022】

これらの酵素は、特定のものに限定されるものではなく、いかなる起源の酵素を用いることも可能である。これらの酵素の使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料1 gあたり0.1～1000 mgの酵素を使用することができる。また、補因子としては、塩化マグネシウム、グルコース - 1, 6 - ビスリン酸などが用いられる。補因子の使用濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.001～100 mM、より好ましくは0.01～100 mMである。

10

【0023】

上記(C)の糖アクセプターからの - グルコシドの合成反応は、 - グルコシドを可逆的に加リン酸分解して - グルコース - 1 - リン酸を生じる酵素( - グルコシドホスホリラーゼ)の存在下で、糖アクセプターを出発原料として、上記(B)の - グルコース - 1 - リン酸の - グルコース - 1 - リン酸への変換反応によって生じた - グルコース - 1 - リン酸から - グルコシドを合成する反応である。

20

【0024】

- グルコシドホスホリラーゼと糖アクセプターの組合せは、これに限定されるものではないが、ニゲロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロースとの組合せ、コージビオースホスホリラーゼとグルコースとの組合せ、トレハロースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはガラクトース及び/若しくはキシロース及び/若しくはアラビノース及び/若しくはフコースとの組合せ、グルコシル - 1, 2 - グリセロールホスホリラーゼとグリセロールとの組合せ、マルトースホスホリラーゼとグルコース及び/若しくはマンノース及び/若しくはキシロース及び/若しくはフコース及び/若しくはグルコサミン及び/若しくはN - アセチルグルコサミンとの組合せ、のいずれか一つ、あるいはそれらの組合せである。

30

【0025】

- グルコシドホスホリラーゼは、いかなる起源の酵素を用いることも可能であり、その使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。その使用量も特に限定されないが、例えば糖質原料1 gあたり0.1～1000 mgの - グルコシドホスホリラーゼを使用することができる。

【0026】

糖アクセプターの濃度は、特に限定されないが、好ましくは10 mM～2 M、より好ましくは100 mM～1 Mである。

【0027】

上述した本発明において用いられる酵素は、任意の起源のものでよく、例えば細菌等の原核生物、酵母、菌類、動物等の真核生物由来のものであってもよく、組換え酵素であってもよい。また、上述した酵素は、市販のものを使用することができるほか、当業者に周知の方法、例えば天然からの精製や遺伝子組換え法によって取得することができる。

40

【0028】

例えば、上述した酵素は、文献に記載されている該酵素遺伝子の塩基配列、若しくは公知の核酸又はタンパク質配列データベースに登録されている該酵素遺伝子の塩基配列を基に作製したプライマーを用いたPCRによって、適当なライブラリー中の該酵素遺伝子に対応するmRNAから作製したcDNAを増幅した後に、該cDNAを市販の遺伝子発現ベクターに組み込み、該発現ベクターで大腸菌等の菌体を形質転換することによって、菌体

50

中で生成される。生成された酵素は、硫酸分画等の粗分画又は各種のカラムクロマトグラフィーなど、当業者に周知のタンパク質精製法によって精製できる。また、酵素を GST や His-tag との融合タンパク質として発現させることにより、その後の精製を容易にすることができる。

【0029】

また、上述した酵素は、上記の原核生物細胞又は真核生物細胞から直接精製してもよい。細胞破壊液を調製し、遠心分離、硫酸分画、透析、各種クロマトグラフィー（例えばゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなど）、電気泳動、限外ろ過、結晶化などの酵素精製のための一般的な技術を適宜組合せて、目的の酵素を精製することができる。本発明において使用可能な酵素の形態は、精製酵素の他に、粗製酵素（例えば菌体抽出液、凍結乾燥体など）でもよい。粗製酵素を使用する場合には、上記反応を妨害する因子を含むべきではない。

10

【0030】

反応形態は、特に限定されるものではないが、通常は水溶液又は緩衝液中で行われる。反応液の pH は、好ましくは 5 ~ 9 である。反応温度は、特に限定されるものではないが、好ましくは 5 ~ 80、より好ましくは 20 ~ 80 である。また、反応時間は、特に限定されるものではないが、0.1 ~ 3000 時間であることが好ましい。

【0031】

本発明の一つの利点は、上記全ての酵素反応を、一容器中で又はバイオリアクターを用いて簡便かつ容易に実施できる点にある。

20

【0032】

本発明により得られる - グルコシドは、任意の方法で精製することができる。例えば、本発明により得られる - グルコシドは、カラムクロマトグラフィーや結晶化により単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーとしては、これに限定されるものではないが、サイズ排除クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離が含まれる。結晶化方法としては、これに限定されるものではないが、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトンなど）が含まれる。

【0033】

なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の思想を逸脱しない範囲で種々の変形実施が可能である。

30

【0034】

次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【実施例 1】

【0035】

デンブンを糖質原料としてニゲロース（グルコシル - 1, 3 - グルコース）への変換反応を行った。反応液量は 1 mL とし、終濃度 100 mg/mL デンブンを、0.5 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、75 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液（pH 7.0）、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で 216 時間反応を行った。反応を 0.15 mL の 6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液の pH を 7.0 に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンブンを分解した。反応液を TOYOPEARL HW-40S カラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品 27 mg を得た。（図 1）

40

【実施例 2】

50

## 【0036】

デンプンを糖質原料としてグルコシル - 1, 3 - ガラクトースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度100 mg/mL デンプン、0.5 M ガラクトース、10 mM 塩化マグネシウム、50 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.02 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で168時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品33 mgを得た。(図2)

10

## 【実施例3】

## 【0037】

デンプンを糖質原料としてコージピオース(グルコシル - 1, 2 - グルコース)への変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、1 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、25 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、コージピオースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.27 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で240時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりコージピオース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりコージピオース標品12 mgを得た。(図3)

20

## 【実施例4】

## 【0038】

デンプンを糖質原料としてトレハロース(グルコシル - 1, 1 - グルコース)への変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、1 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で240時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりトレハロース標品18 mgを得た。(図4)

30

40

## 【実施例5】

## 【0039】

デンプンを糖質原料としてグルコシル - 1, 1 - ガラクトースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M ガラクトース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸 - ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース - 1, 6 - ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、 - ホスホグルコムターゼ、 - ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で264時間反応を行った。反

50

応を 0.15 mL の 6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液の pH を 7.0 に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液を TOYOPEARL HW-40S カラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1, 1-ガラクトース標品 34 mg を得た。(図 5)

【実施例 6】

【0040】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1, 1-キシロースへの変換反応を行った。反応液量は 1 mL とし、終濃度 50 mg/mL デンプン、0.5 M キシロース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース-1, 6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で 216 時間反応を行った。反応を 0.15 mL の 6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液の pH を 7.0 に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液を TOYOPEARL HW-40S カラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1, 1-キシロース標品 37 mg を得た。(図 6)

【実施例 7】

【0041】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1, 1-L-アラビノースへの変換反応を行った。反応液量は 1 mL とし、終濃度 50 mg/mL デンプン、0.5 M L-アラビノース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース-1, 6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で 120 時間反応を行った。反応を 0.15 mL の 6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液の pH を 7.0 に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液を TOYOPEARL HW-40S カラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1, 1-L-アラビノース標品 38 mg を得た。(図 7)

【実施例 8】

【0042】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1, 1-L-フコースへの変換反応を行った。反応液量は 1 mL とし、終濃度 50 mg/mL デンプン、0.5 M L-フコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、59 μM グルコース-1, 6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを 1 ミリリットル当たり 0.96 mg、0.21 mg、0.0085 mg、0.208 mg、0.33 μg 加え、30 で 72 時間反応を行った。反応を 0.15 mL の 6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液の pH を 7.0 に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液を TOYOPEARL HW-40S カラムに供し、ゲル濾過によりトレハロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1, 1-L-フコース標品 21 mg を得た。(図 8)

【実施例 9】

【0043】

デンプンを糖質原料としてマルトース (グルコシル-1, 4-グルコース) への変

10

20

30

40

50



換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、1 M グルコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で240時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりマルトース標品9 mgを得た。(図9)

10

## 【実施例10】

## 【0044】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,4-マンノースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M マンノース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で216時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,4-マンノース標品4.4 mgを得た。(図10)

20

## 【実施例11】

## 【0045】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,4-キシロースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M キシロース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で72時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、有機溶媒沈殿および遠心分離処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコシル-1,4-キシロース標品2.3 mgを得た。(図11)

30

## 【実施例12】

## 【0046】

デンプンを糖質原料としてグルコシル-1,4-L-フコースへの変換反応を行った。反応液量は1 mLとし、終濃度50 mg/mL デンプン、0.5 M L-フコース、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM リン酸-ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、59 μM グルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、-ホスホグルコムターゼ、-ホスホグルコムターゼ、イソアミラーゼを1ミリリットル当たり0.96 mg、0.13 mg、0.0085 mg、0.21 mg、0.33 μg 加え、30 で24時間反応を行った。反応を0.15 mLの6 N 塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを7.0に調整後、グルコアミラーゼ処理を行うことにより残存デンプンを除去した。反応液をTOYOP

40

50

EARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりマルトース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりグルコース-1,4-L-フコース標品11mgを得た。(図12)

【実施例13】

【0047】

スクロースを糖質原料としてニゲロースへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度0.5Mスクロース、10mM塩化マグネシウム、25mMリン酸-ナトリウム緩衝液(pH7.0)、59μMグルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにスクロースホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、  
-ホスホグルコムターゼ、  
-ホスホグルコムターゼ、キシロースイソメラーゼを1ミリリットル当たり0.033mg、0.02mg、0.0085mg、0.21mg、0.33mg加え、30℃で216時間反応を行った。反応を0.15mLの6N塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを4.5に調整後、インペルターゼ処理を行うことにより残存スクロースを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品79mgを得た。(図13)

10

【実施例14】

【0048】

セロピオースを糖質原料としてニゲロースへの変換反応を行った。反応液量は1mLとし、終濃度0.25Mセロピオース、10mM塩化マグネシウム、25mMリン酸-ナトリウム緩衝液(pH7.0)、59μMグルコース-1,6-ビスリン酸からなる基質溶液を調製し、そこにセロピオースホスホリラーゼ、ニゲロースホスホリラーゼ、  
-ホスホグルコムターゼ、  
-ホスホグルコムターゼを1ミリリットル当たり2.3mg、0.02mg、0.0085mg、0.21mg加え、30℃で216時間反応を行った。反応を0.15mLの6N塩酸を添加することで反応を停止し、反応液のpHを5.0に調整後、  
-グルコシダーゼ処理を行うことにより残存セロピオースを分解した。反応液をTOYOPEARL HW-40Sカラムに供し、ゲル濾過によりニゲロース画分を単離、回収した。回収した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥によりニゲロース標品26mgを得た。(図14)

20

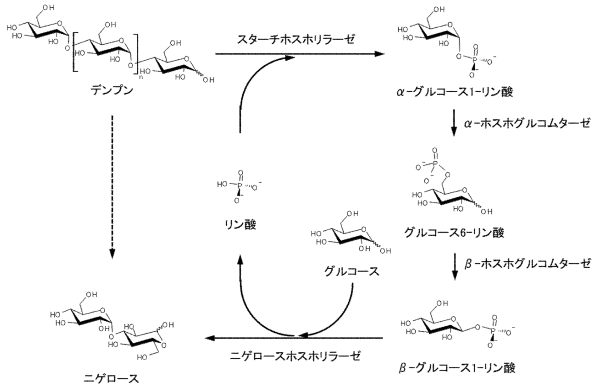
【産業上の利用可能性】

30

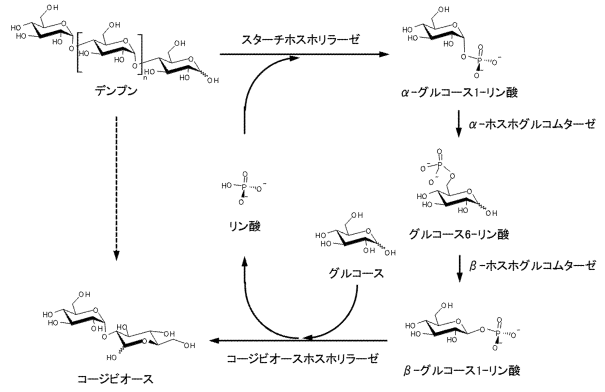
【0049】

本発明は、食品・医薬品・研究試薬産業で利用できる。

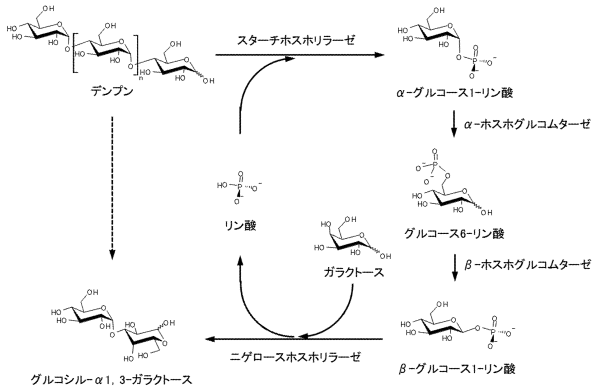
【図1】



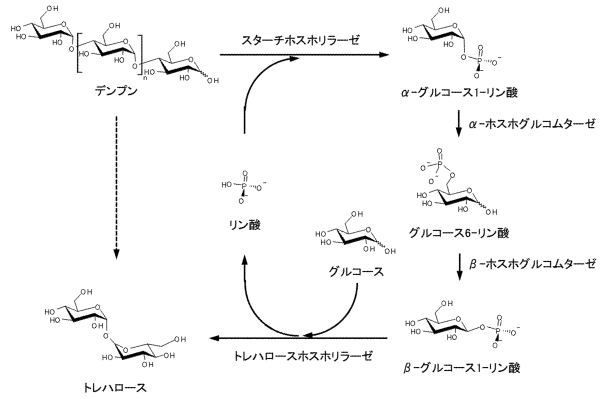
【図3】



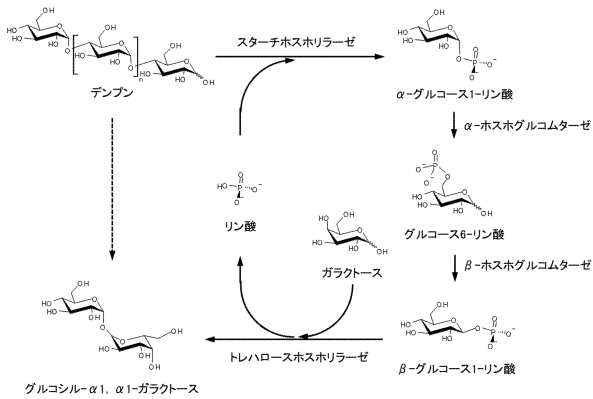
【図2】



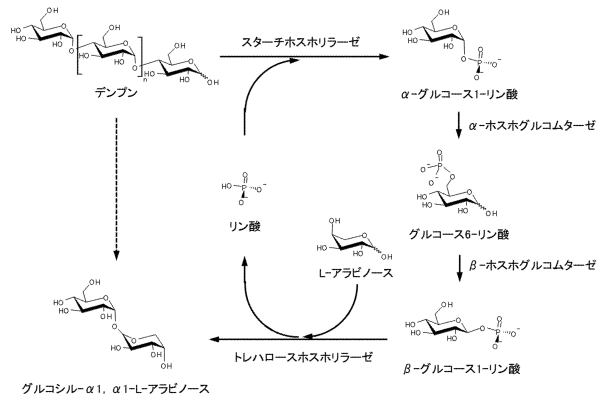
【図4】



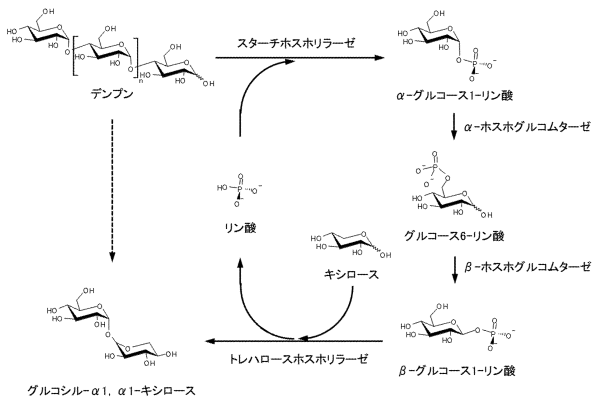
【図5】



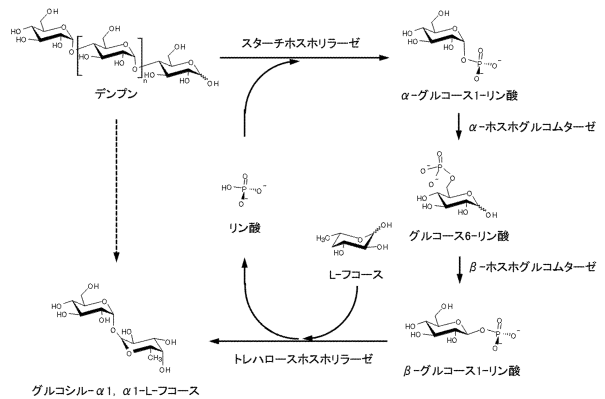
【図7】



【図6】



【図8】





## フロントページの続き

- (74)代理人 100188994  
弁理士 加藤 裕介
- (72)発明者 中井 博之  
新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内
- (72)発明者 仁平 高則  
新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内
- (72)発明者 斉藤 由華  
新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学大学院自然科学研究科内
- (72)発明者 宮嶋 双葉  
新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 特開2010-148502(JP,A)  
日本農芸化学会大会講演要旨集, 2013年 3月 5日, 2C16P01  
BIO INDUSTRY, 2013年 5月12日, Vol. 30, No. 5, p. 47-54  
CLIN. CHEM., 1992年, Vol. 38, No. 4, p. 512-515

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 19/00 - 19/64  
C12N 9/00 - 9/99  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
WPIDS/WPIX(STN)  
FSTA(STN)