

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-204489
(P2001-204489A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 P 19/12		C 1 2 P 19/12	4 B 0 6 4

審査請求 有 請求項の数 2 OL (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-18185(P2000-18185)

(22) 出願日 平成12年1月27日 (2000.1.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年9月21日～9月23日 日本応用糖質学会開催の「日本応用糖質科学会平成11年度大会 (第48回), 糖質関連酵素化学シンポジウム (第7回)」において文書をもって発表

(71) 出願人 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

(72) 発明者 北岡 本光

茨城県つくば市観音台1-34-16ルミナス
観音台壺番館403

(72) 発明者 林 清

茨城県つくば市乙戸南1丁目5-3

(72) 発明者 ラジャシェカーラ・エラナ

茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産
省食品総合研究所内

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘテロオリゴ糖の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 より簡便で、かつ安価にヘテロオリゴ糖を製造すること。

【解決手段】 スクロースと糖類に、リン酸及び/またはグルコース-1-リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼと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ヘテロオリゴ糖の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 スクロースと糖類に、リン酸及び/またはグルコース - 1 - リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼと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ヘテロオリゴ糖の製造方法。

【請求項 2】 糖類が、キシロース、マンノース、2 - デオキシグルコース、6 - デオキシグルコース、グルコサミン、マンノサミン、フコース、アラビノース、アルトロース、グルクロナミド、イソマルトース、ゲンチオピオース及びメリピオースの中から選ばれたものである請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヘテロオリゴ糖の製造方法に関し、詳しくはスクロースと糖類に、リン酸及び/またはグルコース - 1 - リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼと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ヘテロオリゴ糖の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヘテロオリゴ糖は、2 種類以上の糖が結合してできるオリゴ糖であり、種々の生理活性が期待されるものである。ヘテロオリゴ糖の製造方法としては、セロピオースホスホリラーゼの逆反応を利用して、グルコース - 1 - リン酸と糖類から製造する方法が知られている（生化学生物物理紀要(Archives of Biochemistry and Biophysics)、123 巻、240 - 246 頁、1968 年；応用微生物及び生物工学誌(Applied Microbiology and Biotechnology)、34 巻、178 - 182 頁、1990 年；炭水化物研究誌(Carbohydrate Research)、275 巻、67 - 72 頁、1995 年；生化学生物物理研究書簡誌(Biochemistry and Biophysics Research Communications)、214 巻、568 - 575 頁、1995 年、特許第 1806584 号)。セロピオースホスホリラーゼは、本来セロピオースをグルコース - 1 - リン酸とグルコースとに加リン酸分解する酵素であるが、その反応は可逆的である。このうち逆反応においては、アクセプター側の基質特異性が厳密ではないため、このことを利用し、グルコース - 1 - リン酸と種々の糖類から様々な種類のヘテロオリゴ糖が合成されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記したセロピオースホスホリラーゼの逆反応等を利用した従来のヘテロオリゴ糖の製造方法においては、原料または反応中間産物としてグルコース - 1 - リン酸が用いられている。しかしながら、グルコース - 1 - リン酸は高価な原料であるため、これを用いて製造されるヘテロオリゴ糖は必然的に高価になる。また、反応時に等モルのリン酸を副生するため、反応終了後に除去する必要を生じる。この反応中では、グルコース - 1 - リン酸やリン酸のイオン価数が

変化（グルコース - 1 - リン酸 = 2，リン酸 = 3）するため、pH の大幅な低下が見られる。このため、アルカリなどの添加あるいは高濃度の緩衝液を使用することにより反応液の pH を維持する操作等が必要であり、簡便な製造方法とは言い難いものであった。さらに、ヘテロオリゴ糖の収率は約 60% が限界であり、実用化するためには問題である。

【0004】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明の目的は上記の課題を解決し、より簡便で、かつ安価にヘテロオリゴ糖を製造する方法を提供することである。本発明者らは、上記の課題を解決する方法を精力的に検討した結果、本発明を完成するに至った。すなわち、原料として安価で、かつ入手が容易なスクロースを用いることにより、原料コストの問題を解決し、さらに反応時に等モルのリン酸の副生がなく、反応中の pH 変動もさほど大きくないため、反応液の pH 維持の操作も容易であるヘテロオリゴ糖の製造方法を開発した。しかも、本発明の方法によれば、従来法よりも高い収率で目的とするヘテロオリゴ糖が得られることを見出した。

【0005】 請求項 1 記載の本発明は、スクロースと糖類に、リン酸及び/またはグルコース - 1 - リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼと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ヘテロオリゴ糖の製造方法である。請求項 2 記載の本発明は、糖類が、キシロース、マンノース、2 - デオキシグルコース、6 - デオキシグルコース、グルコサミン、マンノサミン、フコース、アラビノース、アルトロース、グルクロナミド、イソマルトース、ゲンチオピオース及びメリピオースの中から選ばれたものである請求項 1 記載の方法である。

【0006】

【発明の実施の形態】 本発明は、ヘテロオリゴ糖を製造するにあたり、スクロースと糖類に、リン酸及び/またはグルコース - 1 - リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼとセロピオースホスホリラーゼを作用させるものである。本発明で原料として使用するスクロースは、その由来に制限はなく、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もよい。具体的には、砂糖、糖蜜、サトウキビの絞り汁やビートの絞り汁など様々な形態のものを単独で、あるいは組み合わせて用いることができる。反応系におけるスクロースの濃度については、特に限定はないが、通常下限は 1 mM、好ましくは 10 mM であり、上限は好ましくは 3 M である。

【0007】 また、一方の原料である糖類についても特に制限はないが、好ましくはキシロース、マンノース、2 - デオキシグルコース、6 - デオキシグルコース、グルコサミン、マンノサミン、フコース、アラビノース、アルトロース、グルクロナミド、イソマルトース、ゲンチオピオースやメリピオースを用いる。これら糖類の濃

度についても、特に限定はない。通常、糖類の濃度の下限は1mM、好ましくは10mMであり、上限は好ましくは3Mである。

【0008】本発明においては、原料として用いる糖類に対応して特定のヘテロオリゴ糖が製造される。糖類として、例えばキシロース、マンノース、2-デオキシグルコース、6-デオキシグルコース、グルコサミン、マンノサミン、フコース、アラビノース、アルトロース、グルクロナミド、イソマルトース、ゲンチオピオース及びメリピオースを用いた場合には、それぞれ1-グルコシル4-キシロース、1-グルコシル4-マンノース、1-グルコシル4-2-デオキシグルコース、1-グルコシル4-6-デオキシグルコース、1-グルコシル4-グルコサミン、1-グルコシル4-マンノサミン、1-グルコシル4-フコース、1-グルコシル4-アラビノース、1-グルコシル4-アルトロース、1-グルコシル4-グルクロナミド、1-グルコシル4-イソマルトース、1-グルコシル4-ゲンチオピオース、1-グルコシル4-メリピオースが製造される。

【0009】本発明の酵素反応において、触媒として反応系に存在させるリン酸とグルコース-1-リン酸は、いずれか一方を用いてもよく、両者を併用してもよいが、好ましくはリン酸を単独で使用する。リン酸としては、任意のものが使用でき、例えばオルトリン酸やリン酸二ナトリウムなどのリン酸塩を単独で、もしくは2種類以上を組み合わせて用いることができる。反応液中のリン酸やグルコース-1-リン酸の濃度は特に限定されるものではないが、0.001mM以上1M以下、好ましくは0.01mM以上500mM以下、より好ましくは0.1mM以上200mM以下である。

【0010】次に、本発明の方法に用いる酵素であるスクロースホスホリラーゼとしては、いかなる起源のものを用いることも可能である。例えば、ロイコノストク・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)、シュードモナス・サッカロフィラ(*Pseudomonas saccharophila*)等の微生物由来のスクロースホスホリラーゼが好適である。スクロースホスホリラーゼの形態は特に限定されるものではなく、精製酵素の他にも、粗酵素、酵素含有菌体、固定化酵素、遺伝子組み換え酵素などいかなる形態のものでも用いることができる。スクロースホスホリラーゼの使用量は特に限定されるものではないが、好ましくは反応液1mlあたり0.0001単位以上1000単位以下であり、より好ましくは反応液1mlあたり0.001単位以上100単位以下である。なお、スクロースホスホリラーゼ1単位とは、37℃、pH7において100mMスクロース、50mMリン酸から毎分1マイクロモルのグルコース-1-リン酸を生成する酵素量と定義する。

【0011】さらに、セロピオースホスホリラーゼにつ

いても、いかなる起源のものを用いることも可能である。例えば、セルビブリオ・ギルバス(*Cellvibrio gilvus*)、クロストリディウム・サーモセラム(*Clostridium thermocellum*)、クロストリディウム・ステロコラリウム(*Clostridium sterocorarium*)、サーモトガ・ネアポリタナ(*Thermotoga neapolitana*)、サーモトガ・マリテイマ(*Thermotoga maritima*)、ルミノコッカス・フラボファシエンス(*Ruminococcus flavofaciens*)、フォメス・アノス(*Fomes annos*)、セルロモナス(*Cellulomonas*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属等の微生物由来の酵素が好適である。

【0012】また、セロピオースホスホリラーゼの形態についても特に限定されず、精製酵素の他に、粗酵素、酵素含有菌体、固定化酵素、遺伝子組み換え酵素などいかなる形態のものでも用いることができる。セロピオースホスホリラーゼの使用量についても、特に限定されるものではないが、好ましくは反応液1mlあたり0.0001単位以上1000単位以下であり、より好ましくは反応液1mlあたり0.001単位以上100単位以下である。なお、セロピオースホスホリラーゼ1単位とは、37℃、pH7において100mMセロピオース、50mMリン酸から毎分1マイクロモルのグルコース-1-リン酸を生成する酵素量と定義する。

【0013】次に、本発明のヘテロオリゴ糖の製造方法について説明する。酵素反応は任意の形態で行うことができるが、通常は純水あるいは緩衝液、例えばトリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、3-(N-モノホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)緩衝液等の水溶液中で実施する。原料、リン酸及び/またはグルコース-1-リン酸及び酵素は、いかなる方法で反応液に添加しても差し支えないが、通常は酵素以外のものを溶解した反応液に酵素を加えることにより、反応を開始する。該反応液を上記酵素が失活しない程度の温度範囲に維持し、酵素反応を行う。反応温度は、著しく酵素活性が低下しない限り特に限定されないが、通常0℃以上100℃以下、好ましくは10℃以上60℃以下である。また、反応液のpHについても酵素活性が失活しない範囲内であればよく、特に反応中に制御する必要はなく、通常pH3~10、好ましくはpH5~9の範囲で行う。

【0014】反応時間についても特に限定されないが、目的とするヘテロオリゴ糖の収率等が最大になったところで終了すればよく、通常は1分~数百時間の範囲で原料となるスクロース等の濃度及び酵素濃度を考慮して適宜決定すればよい。酵素反応終了後、必要に応じてヘテロオリゴ糖を既知の方法により分離することができる。上記した方法では、反応液中に酵素が含まれるため、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ヘテロオリゴ糖を分離する。この際、反応液中に残存しているスクロース等が分離に障害になるならば、あらかじめ適宜の分解酵素を用いて分解

する。例えば、反応液にインペルターゼを加えることにより、未反応のスクロースを分解する。その後、所望により、ゲル濾過クロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー等の精製手段を適用することによりヘテロオリゴ糖を精製することができる。本発明の方法により、安価な原料であるスクロースからヘテロオリゴ糖が一段階、かつpHの制御などを必要としない簡便な方法で製造することができる。

【0015】

【実施例】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1～6

50mM MOPS緩衝液(pH7.0)中に、最終濃度が200mMのスクロース、200mMの糖類(キシロース、2-デオキシグルコース、6-デオキシグルコース、マンノース、グルコサミン、マンノサミン)水溶液、10mMのリン酸二ナトリウム、0.05～0.1単位/mlのスクロースホスホリラーゼ(ロイコノストク・メセンテロイデス由来精製酵素)、0.2～5単位/mlのセロピオースホスホリラーゼ(セルビプリオ・ギルバス由来精製酵素)となるように、それぞれを加えて反応液を調製した。

【0016】該反応液を水浴中で37℃で48～96時間反応し、酵素反応を行った。反応終了後、反応液を適宜希釈してダイオネクスイオンクロマトグラフィーDX-3000(日本ダイオネクス社製)を用いて、ヘテロオリゴ糖の濃度を調べた。反応液の組成、用いた酵素量、反応時間、ヘテロオリゴ糖濃度及び収率を第1表に示す。表中、CBPはセロピオースホスホリラーゼ、SPはスクロースホスホリラーゼを表している。この結果、各糖類に対応したヘテロ二糖類が生成し、また反応中に反応液のpHの著しい低下は起こらず、2種類の酵素の至適pHを維持することができた。そのため、2種類の酵素はそれぞれ最大の活性を発現し、糖類の種類、酵素の使用量や反応時間を変化させたいずれの実施例においても、ヘテロオリゴ糖の収率が81%以上という高い値を示した。

【0017】比較例1

50mM MOPS緩衝液(pH7.0)中に、最終濃度が200mMのグルコース-1-リン酸、200mMのキシロース、0.5単位/mlのセロピオースホスホリラーゼ(セルビプリオ・ギルバス由来精製酵素)となるように、それぞれを加えて反応液を調製した。以後、第1表に示した反応条件以外は、すべて実施例1と同様にして行った。反応液の組成、用いた酵素量、反応時間、ヘテロオリゴ糖濃度及び収率を第1表に示す。表から明らかなように、原料としてスクロースを使用しなかった場合には、反応液は反応中に著しいpHの低下をきたし、ヘテロオリゴ糖の収率は18.7%と低い値を示した。

【0018】比較例2

500mM MOPS緩衝液(pH7.0)中に、最終濃度が200mMのグルコース-1-リン酸、200mMのキシロース、0.5単位/mlのセロピオースホスホリラーゼ(セルビプリオ・ギルバス由来精製酵素)となるように、それぞれを加えて反応液を調製した。以後、第1表に示した反応条件以外は、すべて実施例1と同様にして行った。反応液の組成、用いた酵素量、反応時間、ヘテロオリゴ糖濃度及び収率を第1表に示す。本比較例においては、反応液の反応中のpH低下を抑えるため、濃度の高い緩衝液を使用し、副生したリン酸によるpHの低下の影響を緩和することを試みたが、ヘテロオリゴ糖の収率は実施例1と比較して低かった。

【0019】実施例7

50mM MOPS緩衝液(pH7.0)中に、1Mのスクロース、1Mのキシロース、50mMのリン酸二ナトリウム、0.4単位/mlのスクロースホスホリラーゼ(ロイコノストク・メセンテロイデス由来精製酵素)、2単位/mlのセロピオースホスホリラーゼ(セルビプリオ・ギルバス由来精製酵素)を加えて反応液を調製した。これを、37℃で反応を行った。反応時間、ヘテロオリゴ糖である1-グルコシル-4-キシロースの濃度及びその収率を第1表に示す。

【0020】

【表1】第1表

	糖類	酵素量		反応時間 (時間)	ヘテロオリゴ糖 濃度 (mM)	収率 (%)
		CBP*	SP*			
		(単位/ml)				
実施例1	キシロース	0.5	0.05	60	176.8	88.4
実施例2	2-デオキシ グルコース	0.5	0.1	72	179.4	89.7
実施例3	6-デオキシ グルコース	0.2	0.05	48	182.0	91.0
実施例4	マンノース	0.5	0.05	72	169.6	84.8
実施例5	グルコサミン	0.5	0.1	72	165.2	82.6
実施例6	マンノサミン	5.0	0.1	96	162.4	81.2
比較例1	キシロース	0.5	0	60	37.4	18.7
比較例2	キシロース	0.5	0	60	122.4	61.2
実施例7	キシロース	2.0	0.4	168	804	80.2

*CBP = セロビオースホスホリラーゼ、SP = スクロースホスホリラーゼ

【0021】

【発明の効果】本発明の方法によれば、安価な原料であるスクロースからヘテロオリゴ糖を一段階で製造するこ

とができ、しかも目的とするヘテロオリゴ糖の収率は従来法と比べ高い。さらに、本発明の方法では2種類の酵素を使用しているが、反応工程中において特別な操作を行わなくても、それぞれの酵素に至適なpH等の条件を維持することができるなど簡便性の点でも優れている。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AF04 CA21 CC03 CD01 CD09
CD15 DA01