

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 特 許 公 報（B 2）

(11)特許番号

第2955590号

(45)発行日 平成11年(1999)10月4日

(24)登録日 平成11年(1999)7月23日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 19/14

C 1 2 P 19/14

Z

// C 0 7 H 3/06

C 0 7 H 3/06

請求項の数2 (全 3 頁)

(21)出願番号 特願平2-175259

(22)出願日 平成2年(1990)7月4日

(65)公開番号 特開平4-66092

(43)公開日 平成4年(1992)3月2日

審査請求日 平成8年(1996)8月6日

(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

(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

(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3-553

(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】 ラミナリオリゴ糖の製造方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルコース - 1 - リン酸とグルコースを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により処理してラミナリオリゴ糖を製造するにあたり、前記グルコースの初濃度が1mM以上2M未満であり、グルコース - 1 - リン酸の使用量がグルコース1モルに対して0.1モル以上、かつ初濃度が10mM以上2M未満であり、反応時間が100時間以下であり、グルコースとグルコース - 1 - リン酸の初濃度比を変えることにより、2以上20以下の範囲の所定の平均重合度のラミナリオリゴ糖を得ることを特徴とするラミナリオリゴ糖の製造方法。

【請求項2】 酵素がミドリムシ目（Euglenida）に属する生物由来のものである請求項1記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

2

〔産業上の利用分野〕

本発明はラミナリオリゴ糖の新規な製造方法に関する。ラミナリオリゴ糖はグルコースが2個以上 - 1,3結合してできる少糖類である。 - 1,3結合のポリマー（ - 1,3グルカン）の中には制癌活性のあるものが知られており、その構成単位であるラミナリオリゴ糖にも種々の生理活性が期待される。

〔従来の技術〕

ラミナリオリゴ糖の製造方法としては、 - 1,3グルカンの酸部分加水分解による方法しか知られていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来法によるラミナリオリゴ糖の製造方法においては、原料として - 1,3グルカンが使用される。しかしながら、 - 1,3グルカンを安価に供給する方法はなく、そのため製造されるラミナリオリゴ糖は大変高価な

(2)

3

ものになることが避けられなかった。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らはこの課題を解決するために鋭意研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、グルコース - 1 - リン酸とグルコースを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処理してラミナリオリゴ糖を製造するにあたり、前記グルコースの初濃度が1mM以上2M未満であり、グルコース - 1 - リン酸の使用量がグルコース 1 モルに対して0.1モル以上、かつ初濃度が10mM以上2M未満であり、反応時間が100時間以下であり、グルコースとグルコース - 1 - リン酸の初濃度比を変えることにより、2 以上20以下の範囲の所定の平均重合度のラミナリオリゴ糖を得ることを特徴とするラミナリオリゴ糖の製造方法に関する。

本発明においてラミナリオリゴ糖は、グルコース - 1 - リン酸とグルコースを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処理することによって製造される。

ここで、これら 2 種類の酵素は国際生化学連合酵素委員会報告によりラミナリピオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.31) , - 1,3 - オリゴグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.30) と異なった酵素番号が与えられているが、これらの酵素はすべてラミナリオリゴ糖を加リン酸分解し、グルコース - 1 - リン酸と重合度の 1 つ少ないラミナリオリゴ糖を生成する本質的に同一の反応を触媒する。

本発明者らは、これらの酵素の触媒する反応が逆方向にも進行することに注目した。すなわち、グルコースを出発とし、グルコース - 1 - リン酸によりこれらの酵素の作用によって - 1,3結合を生成することによりラミナリオリゴ糖を合成することに成功した。

本発明による酵素反応は、通常トリスー塩酸緩衝液、イミダゾール塩酸緩衝液等の適当な液溶中で行われる。

本発明において、グルコースの初濃度は通常1mM以上2M未満に設定する。グルコースの初濃度が1mM未満の場合は、本反応速度が非常に遅くなる。一方、2Mを超える場合は、溶解度の問題で反応が困難になる。また、他方の原料であるグルコース - 1 - リン酸の使用量は、グルコース 1 モルに対して0.1モル以上、かつ初濃度10mM以上2M未満に設定する。グルコース - 1 - リン酸の使用量がグルコース 1 モルに対して0.1モル未満の場合は、反応速度が遅くなるとともに、反応系に原料であるグルコースが大量に残存する問題が生じる。また、初濃度が10mM未満では、製造されるラミナリオリゴ糖の濃度が薄く実用的でない。一方、初濃度が2Mを超える場合は、溶解度の問題がありやはり実用的でない。

反応時間は通常100時間以内で行われる。反応時間が100時間を超える場合は、原料のグルコース - 1 - リン酸が比較的不安定なため、その一部が分解し、反応の収率

4

が低くなる。

ここで、グルコースとグルコース - 1 - リン酸の初濃度の比を変えることによって、製造されるラミナリオリゴ糖の重合度を変化させることが可能である。すなわち、グルコースの利用量を減少させるほど、より重合度の大きいラミナリオリゴ糖が製造される。

酵素処理の反応温度は酵素が失活しない範囲であればよく、通常20 ~ 60 の範囲で行われる。さらに、反応系のpHは用いる酵素の最適pH付近で行い、通常 5 ~ 8 の範囲である。

ここで用いられる酵素は如何なる生物起源のものでも差し支えないが、両酵素を菌体内に含有していることが知られているミドリムシ目 (Euglenida) の生物起源のものをを用いることが好ましい。また、これらの酵素は精製品、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菌体等いずれの状態でも差し支えない。

酵素反応終了後、適宜の方法により反応液からラミナリオリゴ糖を分離する。例えば、反応液にエタノールを加えてラミナリオリゴ糖を沈澱させることにより分離することが可能である。また、もし重合度が一定のラミナリオリゴ糖が必要であれば、活性炭カラムクロマトあるいはゲル濾過等の方法によりこれらを得ることが可能である。

〔実施例〕

以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。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 (酵素液の調製)

ユーグレナ・グラチリス・z 株 (Euglena gracilis z) の培養菌体2g (湿潤重量) を8mlの50mMトリスー塩酸緩衝液 (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、その上清を酵素液とした。酵素活性は1.11単位/mlであった。

なお、酵素活性の単位は、37 °C, pH7.0において10mMグルコース, 10mMグルコース - 1 - リン酸から 1 分間に 1 μMのリン酸及び等モルのラミナリピオースを生成する酵素量として定義した。

実施例 1 ~ 5

50mMトリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸100mM, グルコース 5 ~ 100mM, 酵素0.089単位/mlになるよう反応液を調製し、37 °Cにおいて48時間反応を行った。反応後のラミナリオリゴ糖は高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。その結果、表 1 に示したようなラミナリオリゴ糖が製造された。なお、表 1 における収率は、グルコース - 1 - リン酸に対する収率を表すものである。

比較例 1

50mMトリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸100mM, グルコース0.5mM, 酵素0.089単位/mlに

(3)

5

なるよう反応液を調製し、37 において48時間反応を行った。その結果、ラミナリオリゴ糖の生成を高速液体クロマトグラフィーでは検出できなかった。

比較例 2

50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸 1M, グルコース 2.5M, 酵素 0.089 単位/ml になるような反応液の調製を試みたが、溶解度の問題で反応液を調製することができなかった。

比較例 3

50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸 10mM, グルコース 200mM, 酵素 0.089 単位/ml になるよう反応液を調製し、37 において48時間反応を行った。その結果、平均重合度 2.1 のラミナリオリゴ糖を収率 75% で得た。しかしながら、反応液中の残存グルコース量が生成したラミナリオリゴ糖の 10 倍以上であった。

6

比較例 4

50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸 8mM, グルコース 20mM, 酵素 0.089 単位/ml になるよう反応液を調製し、37 において48時間反応を行った。その結果、ラミナリオリゴ糖の生成を高速液体クロマトグラフィーでは検出できなかった。

比較例 5

50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.0) 中にグルコース - 1 - リン酸 2M, グルコース 1M, 酵素 0.089 単位/ml になるような反応液の調製を試みたが、溶解度の問題で反応液を調製することができなかった。

比較例 6

実施例 1 の条件において150時間反応を行った。その結果、平均重合度 2.7 のラミナリオリゴ糖が収率約 55% え得られた。したがって、この場合は実施例 1 の結果と比較して収率が低下していた。

表 1

実施例	グルコース 初濃度 (mM)	ラミナリオリゴ糖	
		平均重合度	収率 (%)
1	1 0 0 mM	2. 8 4	7 1
2	5 0 mM	3. 3 0	7 1
3	2 5 mM	4. 3 7	6 0
4	1 0 mM	6. 6 4	4 9
5	5 mM	8. 3 6	3 9

〔発明の効果〕

本発明によれば、容易にラミナリオリゴ糖を製造することが可能である。これは使用した酵素につき知られている性質からは予想し難いことである。しかも、原料の

初濃度比を変化させることによって各種の重合度のラミナリオリゴ糖を製造することが可能である。

本発明において得られるラミナリオリゴ糖は、医薬品原料あるいは食品分野等において有用なものである。

フロントページの続き

(56) 参考文献 監修 丸尾文治等「酵素ハンドブック」朝倉書店 1982年12月1日発行 第274頁

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁶, D B 名)

C12P 19/00

C12P 19/04

C12P 19/14

C A (S T N)