(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3605153号
(P3605153)
(45)発行日　平成16年12月22日(2004.12.22)　(24)登録日　平成16年10月8日(2004.10.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12P 19/02	C12P 19/02
//(C12P 19/02	C12P 19/02
C12R 1:22)	C12R 1:22

請求項の数 3　(全 5 頁)

(21)出願番号　特願平6-264403
(22)出願日　平成6年10月5日(1994.10.5)
(65)公開番号　特開平8-103285
(43)公開日　平成8年4月23日(1996.4.23)
審査請求日　平成13年10月2日(2001.10.2)

微生物の受託番号　IFO 3317

(73)特許権者　000155908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井１丁目２番３号
(72)発明者　何森　健
香川県木田郡三木町大字下高岡２１６７番地５
(72)発明者　津▲崎▼　桂二
岡山県倉敷市福田町古新田４７２番地

審査官　左海　匡子

(56)参考文献　特開平５－３０８９８４（ＪＰ，Ａ）
特開昭５１－８２７８７（ＪＰ，Ａ）
米国特許第４４６７０３３（ＵＳ，Ａ）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｌ－フラクトースの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
クレブジエラ属に属し、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトース産生能を有する細菌を、Ｌ－ソルビトールを含有する水溶液に接触させてＬ－フラクトースを生成せしめ、これを採取することを特徴とするＬ－フラクトースの製造方法。
【請求項２】
クレブジエラ属に属する細菌が、クレブジエラ　プランティコーラ　ＩＦＯ　３３１７であることを特徴とする請求項１記載のＬ－フラクトースの製造方法。
【請求項３】
クレブジエラ属に属する細菌を、その培養中に、Ｌ－ソルビトールと接触させてＬ－フラクトースを生成せしめることを特徴とする請求項１又は２記載のＬ－フラクトースの製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、Ｌ－フラクトースの製造方法に関するものであり、更に詳細には、クレブジエラ属に属し、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトース産生能を有する細菌を用いて、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトースを製造する方法に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】

Ｌ－フラクトースは、ケトヘキソースに分類される単糖類で、自然界には殆ど存在しない希少糖質である。その製造方法としては、原理的には、有機化学的手法によりＬ－グルコースまたはＬ－マンノースをカセイソーダ、ピリジンなどのアルカリ性薬剤の共存下で異性化させ、Ｌ－フラクトースを製造することが可能である。しかし、実際には、原料となるＬ－グルコースまたはＬ－マンノースを入手することが困難であり、Ｌ－フラクトースを十分量製造する適当な方法は現在まで報告されていない。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

近年、生化学工業が急速に発達し、糖質化学の分野においても、新たな糖質の開発が望まれている。Ｌ－フラクトースは、大量製造方法が確立されていない。従って、未だ、食品工業、医薬品工業、化学工業などの工業原料として使用されるに至っていない。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、Ｌ－フラクトースを生化学的手段により大量、安価に製造することを目的に鋭意研究した。

【０００５】

その結果、クレブジエラ属に属し、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトース産生能を有する細菌が、水溶液中のＬ－ソルビトールを、容易にＬ－フラクトースに変換することを見い出し、これを採取することにより、Ｌ－フラクトースが高収率で製造されることを確認して、本発明を完成した。

【０００６】

すなわち、本発明において、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトースを製造するのに使用される細菌はクレブジエラ属に属し、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトース産生能を有する細菌である。

【０００７】

本発明でいう、クレブジエラ属に属し、Ｌ－ソルビトール　から　Ｌ－フラクトース産生能を有する細菌は、Ｌ－ソルビトールを含有する水溶液に接触し、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトースを産生し得る微生物であればよく、例えば、クレブジエラ　プランティコーラ　ＩＦＯ　３３１７、または、この変異株などの細菌が好適であり、通常、これら細菌を栄養培地で培養し、望ましくは、振盪、通気攪拌などの好気的条件下で培養し、培養中に、または得られた細菌（生菌体）を用いて、水溶液中のＬ－ソルビトールをＬ－フラクトースに変換させて、生成するＬ－フラクトースを採取すればよい。

【０００８】

培養方法としては、クレブジエラ属に属する細菌が必要とする栄養源、例えば、炭素源、窒素源、無機塩などを含有する栄養培地、望ましくは、微酸性乃至微アルカリ性の液体培地に、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトース産生能を有する細菌を植菌し、温度約２０乃至３５℃で、１乃至１０日間好気的条件下で培養すればよい。とりわけ、炭素源として、例えば、キシリトール、Ｄ－タリトール、Ｌ－アラビトール、およびグリセロールなどの１種または２種以上の炭素源とともに他の各種栄養源を含有する液体培地で好気的に培養するのが望ましい。

【０００９】

前述のような培養方法によって得られた細菌（生菌体）を、Ｌ－ソルビトールを含有する水溶液と接触、望ましくは、振盪、通気攪拌、酸素の圧入などの好気的条件下で接触させ、その糖質を、Ｌ－フラクトースに変換させることができる。この変換に際して、反応液中にエチルアルコール、グリセロール、Ｄ－マンニトール等を共存させると、Ｌ－ソルビトールからＬ－フラクトースへの変換速度が速くなり好都合である。

【００１０】

この変換に用いられる細菌は、培養液中のそれを利用することも、また、培養液から分離された生菌体を利用することも随意である。必要ならば、例えば、生菌体を半透膜製のホローファイバーに封入し固定化した細菌、又は、寒天、ゼラチン、アルギン酸塩などで包

括し、ビーズ状、シート状などの各種形状に固定化した細菌などとして、該固定化細菌をＬ－ソルビトールからＬ－フラクトースへの変換反応に、連続して利用することも、また、繰返し利用することも有利に実施できる。

【００１１】

以上述べた各種の方法により生成、蓄積したＬ－フラクトースを含有する水溶液は、適当な分離方法、例えば、遠心分離、濾過などの方法によって細菌など不溶物と分離され、採取される。

【００１２】

得られたＬ－フラクトース水溶液は、必要により、例えば、硫安塩析、水酸化亜鉛吸着などによる除蛋白、活性炭吸着による脱色、Ｈ型、ＯＨ型イオン交換樹脂による脱塩などの方法で精製し、濃縮してシラップ状のＬ－フラクトース製品を採取することができる。更にイオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー、例えば、ダウケミカル社製造の商品名『ダウエックス５０ＷＸ４』、『ダウエックスＷＧＲ』、東京有機化学工業株式会社製造の商品名『アンバーライトＸＴ－１００８』、『アンバーライトＩＲＡ４７』、三菱化成工業株式会社製造の商品名『ダイヤイオンＳＫ１０６』、『ダイヤイオンＷＡ１１』などを用いるカラムクロマトグラフィーで分画、精製、濃縮することにより結晶化することができ、９９％以上の高純度の結晶標品も容易に得ることができる。

【００１３】

このようにして製造されるＬ－フラクトースは、通常、原料のＬ－ソルビトールに対し約７０ｗ／ｗ％以上の高収率で得られ、大量、安価に供給する工業的製造方法として好適である。

【００１４】

従って、Ｌ－フラクトースは、試薬用途のみならず、食品工業、医薬品工業、化学工業などの工業用途にその原料、中間体などとして有利に利用できる。

【００１５】

以下、本発明の実施例を述べる。

【００１６】

【実施例１】

硫酸アンモニウム０．２ｗ／ｖ％、リン酸一カリウム０．２４ｗ／ｖ％、リン酸二カリウム０．５６ｗ／ｖ％、硫酸マグネシウム・７水塩０．０１ｗ／ｖ％、酵母エキス０．５ｗ／ｖ％、キシリトール２ｗ／ｖ％及び脱イオン水からなる培養液１００ｍｌずつを５００ｍｌ容振盪フラスコ２０本にとり、１２０℃２０分間オートクレーブした後、放冷し、これにクレブジエラ　プランティコーラ　ＩＦＯ　３３１７を１白金耳ずつ植菌し、３０℃で２日間振盪培養した。

【００１７】

培養後、遠心分離により集菌し、得られた生菌体約２ｇをＬ－ソルビトール２ｗ／ｖ％を含有する０．０５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）１００ｍｌに加え混合し、これを５００ｍｌ容振盪フラスコにとり、３０℃で２日間振盪し、Ｌ－ソルビトールをＬ－フラクトースに変換させた。次いで遠心分離して細菌を除去した。

【００１８】

得られた上清に２５ｗ／ｖ％硫酸亜鉛を１／１０容加えｐＨ７．６に調整し、遠心分離して上清を採取した。この上清を、常法に従って、活性炭を用いて脱色し、次いで、『ダイヤイオンＳＫ１Ｂ』（Ｈ型、三菱化成工業株式会社製造の商品名）および『ダイヤイオンＷＡ３０』（ＯＨ型、三菱化成工業株式会社製造の商品名）を用いて脱塩し、減圧濃縮して濃度約６０％の透明なシラップを得た。

【００１９】

『ダウエックス５０ＷＸ４』（カルシウム型カチオン交換樹脂、ダウケミカル社製造の商品名）を用いるカラムクロマトグラフィーによりＬ－フラクトース高含有画分を採取し、これを精製、濃縮し、Ｌ－フラクトースを結晶化させ分蜜して結晶Ｌ－フラクトース製品を採取した。

【００２０】
結晶Ｌ－フラクトースの Ｌ－ソルビトールに対する収率は、固形物当り約７０％であった。本品の理化学的性質は、市販されている標準のＬ－フラクトースのそれとよく一致した。
【００２１】
本製品は、試薬用途のみならず、食品工業、医薬品、化学工業などの原料、中間体などとしても有利に利用できる。
【００２２】
【実施例２】
実施例１の培養液のうち、酵母エキスをコーン・スティープ・リカーに置換え、及びキシリトールをグリセロールに置換えた以外は、実施例１と同組成の培養液１５ｌを３０ｌ容ジャーファーメンターにとり、１２０℃、２０分間滅菌した後、３０℃に冷却し、これに同組成の培養液３０℃で１日間振盪培養したクレブジェラ　プランティコーラ　ＩＦＯ　３３１７の種培養液を１ｖ／ｖ％植菌し、３０℃で２日間通気撹拌培養し、次いで遠心分離して、菌体を採取した。このようにして得た生菌体約２ｇをＬ－ソルビトール２ｗ／ｖ％を含有する０．０５Ｍリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．０）１００ｌに加えて混合し、以後、実施例１と同様に、Ｌ－フラクトースに変換せしめ、次いで、常法に従って、活性炭で脱色、イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮して、Ｌ－ソルビトールとＬ－フラクトースとを約１：２４の割合で含有する濃度約７０％の透明なシラップを原料に対して固形物当たり約９０％の収率で得た。
【００２３】
本製品は、食品工業、医薬品工業、化学工業などの原料、中間体などとして有利に利用できる。
【００２４】
【発明の効果】
上記したことから明らかなように、本発明は、従来得ることの極めて困難であったＬ－フラクトースを、生化学的方法により容易に製造する方法を確立するものである。特に、クレブジエラ属に属する微生物を用いて、Ｌ－ソルビトールを原料としてＬ－フラクトースを生産できることを見出だしたことは、Ｌ－フラクトースの製造方法にとって、極めて有利である。すなわち、原料となるＬ－ソルビトールはＤ－タガトースのエピマー化によって得られるＤ－ソルボースを還元することによって容易に入手できる糖アルコールであるためＬ－フラクトースの大量生産が可能となった。
【００２５】
従って、本発明の方法は、Ｌ－フラクトースの工業的製造方法として好適であり、大量、安価な供給を容易にし、希少糖質としての試薬用途のみならず、従来予想すらできなかった食品工業、医薬品工業、化学工業など広範な工業用途への利用の道を拓くものである。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12P 19/00-64
EUROPAT(QUESTEL)
JICSTファイル(JOIS)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed