(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2004-236623
(P2004-236623A)
(43)公開日　平成16年8月26日(2004.8.26)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|
| C12P 19/22 | C12P 19/22 | | 4B047 |
| A23L 1/236 | A23L 1/236 | A | 4B050 |
| C12N 9/92 | C12N 9/92 | | 4B064 |

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 8 頁）

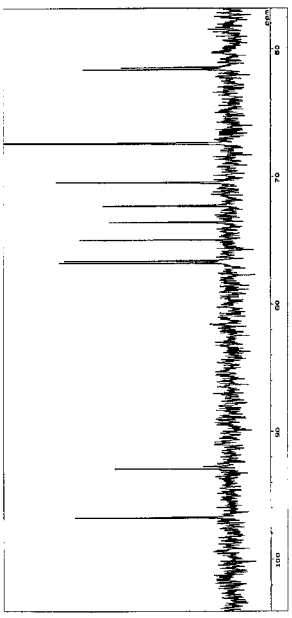
(21)出願番号　特願2003-31340 (P2003-31340)
(22)出願日　平成15年2月7日 (2003.2.7)

(71)出願人　593080401
香川大学長
香川県高松市幸町１番１号
(74)代理人　100102314
弁理士　須藤　阿佐子
(72)発明者　何森　健
香川県木田郡三木町池戸２３９３　香川大学農学部内
(72)発明者　徳田　雅明
香川県木田郡三木町池戸１７５０－１　香川医科大学内

Ｆターム(参考)　4B047 LB08 LE06 LG23 LG57 LP18
4B050 CC10 DD02 LL05
4B064 AF02 CA21 CB28 CD09 CE11
DA10

(54)【発明の名称】Ｌ－グルコースの製造方法

(57)【要約】
【課題】工業的に大量かつ安価に製造することのできるＬ－グルコースの製造方法、Ｌ－グルコースを含有する酵素反応液、及びＤ－アラビノース・イソメラーゼ含有酵素剤を提供すること。
【解決手段】Ｌ－フラクトースに、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトースに、酵素好ましくは固定化酵素を作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法。酵素としてＤ－アラビノース・イソメラーゼを用いる。Ｌ－フラクトースとしてＬ－フラクトース含有溶液を用いる。得られる反応溶液を、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグロマトグラフィーにより分画してＬ－グルコースを高含有画分を得る。Ｌ－グルコースを含有する酵素反応液、及びＤ－アラビノース・イソメラーゼ含有酵素剤。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｌ－フラクトースに酵素を作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法。
【請求項２】
Ｌ－フラクトースとして Ｌ－プシコースあるいは Ｌ－ソルビトールから変換した Ｌ－フラクトースを用いる請求項１の Ｌ－グルコースの製造法。
【請求項３】
酵素として固定化酵素を用いる請求項１または２の Ｌ－グルコースの製造法。
【請求項４】
酵素として Ｄ－アラビノース　イソメラーゼを用いる請求項１、２または３の Ｌ－グルコースの製造法。
【請求項５】
Ｌ－フラクトースとして Ｌ－フラクトース含有溶液を用いる請求項１ないし４のいずれかの Ｌ－グルコースの製造法。
【請求項６】
得られる反応溶液を、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグロマトグラフィーにより分画して Ｌ－グルコースを高含有画分を得る請求項５の Ｌ－グルコースの製造方法。
【請求項７】
Ｌ－グルコースを甘味料として得る請求項１ないし６のいずれかの Ｌ－グルコースの製造方法。
【請求項８】
請求項７の方法で製造された甘味料。
【請求項９】
Ｌ－フルクトースを Ｌ－グルコースに変換する作用を有する Ｄ－アラビノース　イソメラーゼ。
【請求項１０】
Ｌ－フルクトースを Ｌ－グルコースに変換する作用を有する Ｄ－アラビノース　イソメラーゼを含有する酵素剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業の属する技術分野】
本発明は、Ｌ－フラクトースからの Ｌ－グルコースへの変換方法、Ｌ－グルコースを含有する酵素反応液、および Ｄ－アラビノース　イソメラーゼ含有酵素剤に関する。
【０００２】
【従来の技術】
近年、生化学工業が発達し、糖質化学の分野においても、従来、殆ど必要としなかった各種希少糖質の需要が起こりつつあり、これらの糖質の安定な製造方法の確立が望まれている。酵素反応による各種単糖類の製造方法は、例えば、本発明者らが先に特許出願した、特許文献１に Ｄ－アラビノースイソメラーゼ、特許文献２に Ｌ－リボースイソメラーゼ等のアルドースイソメラーゼ、特許文献３、や特許文献４にケトース３－エピメラーゼ等を用いる酵素反応による製造方法が記載されており、比較的容易に製造することが可能となった。
【０００３】
一方、アルドヘキソースに分類される単糖類で、自然界にはほとんど存在しない希少糖である Ｌ－グルコースは、各種の用途が期待されていたにもかかわらず、それらの供給量が少なく、高価値たることから、未だ工業的に広く利用されるには至っていない。Ｌ－グルコースの製造方法については、有機化学反応による製造方法の報告はあるものの、ほとんど研究されていないのが実情である。唯一酵素反応としてキャンディダ　ユチリス（Ｃａ

ｎｄｉｄａ ｕｔｉｌｉｓ）の生産するＤ－キシロース イソメラーゼがＬ－フラクトースからＬ－グルコースを生産することは確認されている（特許文献５）。しかし、Ｄ－アラビノース イソメラーゼがＬ－フラクトースからＬ－グルコースを生産する報告は未だ存在しない。

【０００４】

【特許文献１】

特開平６－１１３８７５号公報

【特許文献２】

特願平８－１４４８３１号

【特許文献３】

特開平６－１２５７７６号公報

【特許文献４】

特開平８－１５４６９６号公報

【特許文献５】

米国特許第４，４６３，００９３号明細書

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、工業的に大量かつ安価に製造することのできるＬ－グルコースの製造方法、Ｌ－グルコースを含有する酵素反応液、及びＤ－アラビノース イソメラーゼ含有酵素剤を提供することを課題とする発明である。

【０００６】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、前記課題を解決することを目的として、Ｌ－グルコースを生化学的手法により、大量かつ安価に製造し得る方法について鋭意研究した。その結果、Ｄ－アラビノース イソメラーゼ（ＥＣ ５．３．１．３）をＬ－フラクトースに作用させたとき、意外にも、Ｌ－フラクトースからＬ－グルコースが生成することを新規に見出し、本発明を完成するに至った。

【０００７】

本発明は、Ｌ－フラクトースに酵素を作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【０００８】

Ｌ－フラクトースとしてＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトースを用いており、その場合、本発明は、Ｌ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトースに酵素を作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【０００９】

酵素として固定化酵素を用いており、その場合、本発明は、Ｌ－フラクトースに、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトースに、固定化酵素を作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【００１０】

酵素としてＤ－アラビノース イソメラーゼを用いており、その場合、本発明は、Ｌ－フラクトースに、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトースに、Ｄ－アラビノース イソメラーゼ、好ましくは固定化Ｄ－アラビノース イソメラーゼを作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【００１１】

Ｌ－フラクトースとしてＬ－フラクトース含有溶液を用いており、その場合、本発明は、Ｌ－フラクトース含有溶液に、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトース含有溶液に、Ｄ－アラビノース イソメラーゼ、好ましくは固

定化Ｄ－アラビノース　イソメラーゼを作用させてＬ－グルコースに変換することを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【００１２】

得られる反応溶液を、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグロマトグラフィーにより分画してＬ－グルコースを高含有画分を得ており、その場合、本発明は、Ｌ－フラクトース含有溶液に、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトース含有溶液に、Ｄ－アラビノースイソメラーゼ、好ましくは固定化Ｄ－アラビノース　イソメラーゼを作用させてＬ－グルコースに変換し、得られる反応溶液を、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグロマトグラフィーにより分画してＬ－グルコースを高含有画分を得ることを特徴とするＬ－グルコースの製造法を要旨とする。

【００１３】

Ｌ－グルコースを甘味料として得ており、その場合、本発明は、Ｌ－フラクトース、必要に応じＬ－プシコースあるいはＬ－ソルビトールから変換したＬ－フラクトース、好ましくはＬ－フラクトース含有溶液に、酵素、好ましくは固定化酵素、より具体的にはＤ－アラビノース　イソメラーゼ、好ましくは固定化Ｄ－アラビノース　イソメラーゼを作用させてＬ－グルコースに変換し、必要に応じ得られる反応溶液を、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグロマトグラフィーにより分画してＬ－グルコースを高含有画分を得ることを特徴とする甘味料の製造法、ならびに、該方法で製造された甘味料を要旨とする。

【００１４】

また、本発明は、Ｌ－フルクトースをＬ－グルコースに変換する作用を有するＤ－アラビノース　イソメラーゼを要旨とする。

【００１５】

さらにまた、本発明は、Ｌ－フルクトースをＬ－グルコースに変換する作用を有するＤ－アラビノース　イソメラーゼを含有する酵素剤を要旨とする。

【００１６】

【発明の実施の形態】

本発明のＬ－グルコースの製造方法は、原料としてＬ－フラクトースを用いることを特徴としている。本発明の製造方法で用いるＬ－フラクトースは、生物化学的手法によって生産できることがすでに明らかとなっている。「ジャーナル　オブ　ファーメンテーション　ビオエンジニアリング」第８１巻、３５１乃至３５３頁（１９９６年）に記載された、Ｌ－プシコースからＤ－タガトース３－エピメラーゼを作用させて得られるＬ－フラクトースを例示することができる。また、特開平８－１０３２８６号公報に記載された、Ｌ－プシコースあるいは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（クレブジエラ　プランティコーラ　ＩＦＯ　３３１７）を接触させて生成されるＬ－フラクトースを例示することができる。

【００１７】

本発明に用いる酵素は、Ｌ－フラクトースからＬ－グルコースを生成する限り、その由来、起源を問わず、天然であろうと遺伝子組換え型であろうと、何れの酵素も利用でき、Ｄ－アラビノース　イソメラーゼが好ましいものとして例示される。

Ｄ－アラビノース　イソメラーゼは国際的な酵素番号「ＥＣ５．３．１．３」のペントース　イソメラーゼとしては最も古くから研究されている酵素であり、例えば、メソッズ　イン　エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ）　第４１巻４６２－４６５頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ、１９７５年）に記載されている酵素である。Ｄ－アラビノースおよびリブロースの異性化を触媒する酵素であり、Ｄ－アラビノースおよびフコースが主な基質である。したがって、本発明に用いるＤ－アラビノース　イソメラーゼは、Ｌ－フラクトースからグルコースを生成する限り、その由来、起源を問わず、天然であろうと遺伝子組換え型であろうと、何れのＤ－アラビノース　イソメラーゼをも利用できる。

【００１８】
Ｄ－アラビノース　イソメラーゼは各種の微生物から容易に入手が可能である。Ｄ－アラビノースが存在する培養条件の時に、誘導的に生産される。通常、Ｄ－アラビノース　イソメラーゼ産生能を有する微生物を培養して得ることができる。例えば、Ｄ－アラビノース　イソメラーゼは各種の微生物をＤ－アラビノースを炭素源として培養すると、Ｄ－アラビノースが誘導剤となって菌体内に生産される。アエロバクター　アエロゲネス（Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）　ＰＲＬ－Ｒ３〔「ジャーナル　オブ　バクテリオロジー」第８８巻、８３８－８４４（１９６４）〕などＤ－アラビノースに生育する各種微生物で酵素活性を得ることが容易に可能である。クレブシェラ　ニューモニアエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）　ＩＦＯ　３３１８も同じようにＤ－アラビノース培地で培養する（栄養源、例えば、窒素源、無機塩および炭素源としてＤ－アラビノースあるいはＬ－フコースを含む培地、望ましくは、微酸性ないし微アルカリ性の液体培地に植菌し、温度約２０℃～３５℃で、１～１０日間好気的条件下で培養する）ことで、菌体内にＤ－アラビノース　イソメラーゼを誘導的に生産する。実施例１の４０ｂ株は、クレブシェラ　ニューモニアエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）　ＩＦＯ　３３１８　を用いている。該微生物は、独立行政法人製品評価基盤機構・生物遺伝資源センター（ＮＢＲＣ）から入手可能である。
酵素を大量に構成的に産生する変異株を用いることは、Ｄ－アラビノース、あるいはＬ－フコースなどの高価な炭素源を必要としないので特に有利である。
【００１９】
通常、得られた培養菌体からＤ－アラビノース　イソメラーゼを抽出し、そのまま、あるいは固定化して反応に用いるが、それらに限定されない。つまり、用いる酵素の形態については、▲１▼菌体から酵素を取り出してから固定化する方法、▲２▼菌体を有機溶媒などで処理し菌体膜の透過性をよくし、処理菌体を酵素として用いる方法などいろいろが用いられる。実施例として記載しているものは、▲２▼の菌体をトルエン処理して菌体を死滅させるが菌体内の酵素は活性を保つ方法を用いた結果を記載している。
すなわち、Ｄ－アラビノース　イソメラーゼは、使用目的に応じて、必ずしも高純度に精製されたものでなくてもよく、粗酵素であっても用いることができる。粗酵素の具体的例としては、例えば、当該酵素産生能を有する微生物自体を、又、その培養物や部分精製した培養物を用いることができる。
【００２０】
これらの酵素は、公知の手法により固定化して繰り返し用いることもできる。固定化法としては、イオン交換樹脂にイオン結合する方法や酵素と酵素を結合させる架橋法、酵素を包み込む方法の包括法が例示される。
固定化微生物及び固定化Ｄ－アラビノース　イソメラーゼは、Ｌ－フラクトースから Ｌ－グルコースを連続的に製造する酵素反応に用いることができる。
【００２１】
本発明のＤ－アラビノース　イソメラーゼを用いる酵素反応は、通常、下記の条件で行われる。
▲１▼基質としてのＬ－フラクトースを含有する溶液として、通常、水溶液を用い、その基質濃度は、Ｌ－フラクトースの含有重量で約０．１％乃至８０Ｗ／ｖ％、望ましくは、約１乃至６０ｖＷ／Ｖ％、更に望ましくは、約１乃至５０Ｗ／Ｖ％の範囲から適宜選ばれる。
▲２▼酵素反応温度は、使用するＤ－アラビノース　イソメラーゼの由来や性状により変動するが、通常、約１乃至８０℃、望ましくは、約１０乃至８０℃、より望ましくは約３０乃至７０℃の範囲から選ばれる。
▲３▼同様に、酵素反応ｐＨも使用するＤ－アラビノース　イソメラーゼの由来、性状により変動するが、通常、約３乃至１１、望ましくは、約５乃至１０、更に望ましくは、約７乃至１０の範囲から選ばれる。
▲３▼本発明の酵素反応に用いるＤ－アラビノース　イソメラーゼの使用量は、全基質重

量グラム当たり約０．１単位以上望ましくは、約１単位以上、更に望ましくは、約１０乃至５，０００単位の範囲から選ばれる。
▲４▼反応時間は、使用する基質量、酵素量、温度、ｐＨ条件等により変動するが、通常、バッチ式の場合、経済性を考慮して、約３乃至１００時間、望ましくは約５乃至５０時間の範囲で行う。
【００２２】
このようにして得られる酵素反応液は、未反応のＬ－フラクトースと、新たに生成したＬ－グルコースを含有しており、この酵素反応液をそのまま利用することができる。または、未反応のＬ－フラクトースを除去し、新たに生成したＬ－グルコースのみを分取して利用することができる。
いずれにせよ通常、前記酵素反応溶液は、定法にしたがって、活性炭を用いて脱色し、Ｈ型、ＯＨ型イオン交換樹脂を用いて脱塩し、精製し、濃縮してシラップ状製品とする。
さらに必要ならば、このシラップ状製品を、例えば、アルカリ金属型又はアルカリ土類金属型酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、Ｌ－グルコース高含有画分と、未反応のＬ－フラクトース高含有画分に分画し、さらには、必要に応じて濃縮してシラップ状のＬ－グルコース高含有物とすることも随意である。
この際、Ｌ－フラクトース高含有画分は、次のＤ－アラビノース　イソメラーゼ酵素反応の基質として利用すれば、Ｌ－グルコースの製造コストをより低減させることができる。
【００２３】
いずれの段階の酵素反応液は、食品、化粧品、医薬品、農薬、化学工業等の分野に有利に用いることができる。
その代表的な用途としては、甘味剤、保湿剤、結晶析出防止剤、照り付与剤、腑形剤等として用いることができる。
【００２４】
【作用】
各種の用途が期待されていたにもかかわらず、それらの供給量が少なく、高価値たることから、未だ工業的に広く利用されるには至っていないＬ－グルコースについて、Ｌ－フラクトースを原料として酵素、特にＤ－アラビノース　イソメラーゼを作用させてることにより工業的に大量かつ安価に製造することのできる製造方法を確立することができた。併せてＬ－グルコースを含有する酵素反応液、及びＤ－アラビノース　イソメラーゼ含有酵素剤を提供することができた。
従って、本発明の製造方法は、Ｌ－グルコ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、甘味剤、保湿剤、結晶析出防止剤、照り付与剤、腑形剤等の用途のみならず、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。
【００２５】
【実施例】
本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。
【００２６】
実施例１
Ｄ－アラビノース　イソメラーゼの調製
Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ　４０ｂ株〔「ジャーナル　オブ　ファーメンテーション　アンド　ビオエンジニアリング」第７９巻６２１乃至６２２頁（１９９５）〕を０．５％Ｄ－アラビノースを含む０．５％ペプトン、０．５％酵母エキス、０．５％塩化ナトリウム（ｐＨ７．０）、塩化マンガンを終濃度１ｍＭの２Ｌの液体培地を用いて、２．５Ｌ容量の培養装置中で通気量１．８Ｌ／ｍｉｎ、撹拌速度５００ｒｐｍの最適培養条件で２４時間培養して増殖させた。
菌体を９０００×ｇ、４℃で１０分間遠心して細胞を回収し、５０ｍＭグリシン緩衝液（ｐＨ９）で洗浄した細胞を１０％トルエン溶液に懸濁後、室温、撹拌速度１８０ｒｐｍで

１５分間処理した。処理後同緩衝液で２回洗浄し、Ｄ－アラビノース　イソメラーゼ活性のあるトルエン処理細胞を得た。これをＤ－アラビノース　イソメラーゼとして用いた。

【００２７】

酵素反応

２ｇのＬ－フルクトースを含む２００ｍｌのグリシン緩衝液（ｐＨ９）に上記のトルエン処理細胞を添加し、最適条件で反応させたところ、３５％の収率で生産物が得られ平衡に達した。

活性炭処理、除たんぱく質（２５％$MgSO_4$）、脱イオン（ダイアイオンＳＫ１Ｂ　$H^+$、アンバーライトＩＲＡ－４１１$CO_3^{2+}$）後、２５％までロータリーエバポレータで減圧濃縮後、アンバーライトＣＲ－１２２０$Ca^{2+}$を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーで生産物を精製した。

Ｌ－グルコース画分を集め、約８０％まで濃縮し、Ｌ－グルコースの結晶を核として加えて４℃で結晶化させた。この、一連の操作により最終的に２ｇのＬ－フルクトースから０．７ｇの結晶Ｌ－グルコースを得た。

【００２８】

実験

本実施例で得た精製Ｌ－グルコース標品（純度９９％）についてその同定試験を行った。当該標品の核磁気共鳴（$^{13}$Ｃ－ＮＭＲ）の測定は、ジオキサンを内部標準とする『ＪＮＭ－Ａ４００型』核磁気共鳴分光器（日本電子株式会社製）を用いて行った。当該標品の高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＣ）分析は、以下に示す条件下で行った。その結果を下記に示す。

【００２９】

（１）$^{13}$Ｃ－ＮＭＲスペクトル

本実施例の方法で得た精製Ｌ－グルコース標品の$^{13}$Ｃ－ＮＭＲスペクトルを図１に示す。このスペクトルは、これとは別に測定した比較物質として試薬Ｄ－グルコース（シグマ社製）の図２とよく一致した。なお、Ｄ－グルコースとＬ－グルコースは同じ$^{13}$Ｃ－ＮＭＲスペクトルを示すことは分かっている。

（２）ＨＰＬＣ

本実施例の方法で得た精製Ｌ－グルコース標品をＨＰＬＣ（装置及び条件：ＨＰＬＣ装置は、『８８０－ＰＵ』（日本分光化学株式会社製）；カラムは、『ＧＬ＝Ｃ６１１カラム』（日立製作所製）；溶離液は、$10^{-4}$Ｍ水酸化ナトリウム水溶液；カラム内温度は、６０℃；流速は、１ｍｌ／　分；検出器は、『ＩＲＤ－６Ａ』（島津製作所製）で分析したところ、その溶出液位置は、比較物質としてのＤ－グルコース（シグマ社製）と同じ１６分であった。

【００３０】

本実施例の方法で得た精製Ｌ－グルコース標品は、上記の結果等から、Ｌ－グルコースであると同定した。

【００３１】

本実施例で得られた製品中に含まれるＬ－グルコースは、従来のＬ－グルコースと同様、甘味料、保湿剤、結晶析出防止剤、照り付与剤、腑形剤等として、飲食物、飼料、餌料、歯磨きなどの用途に、又、発酵用炭素源、試薬、化学品、化粧品、医薬品、及びそえらの製造原料や中間体としても有利に用いることができる。

【００３２】

【発明の効果】

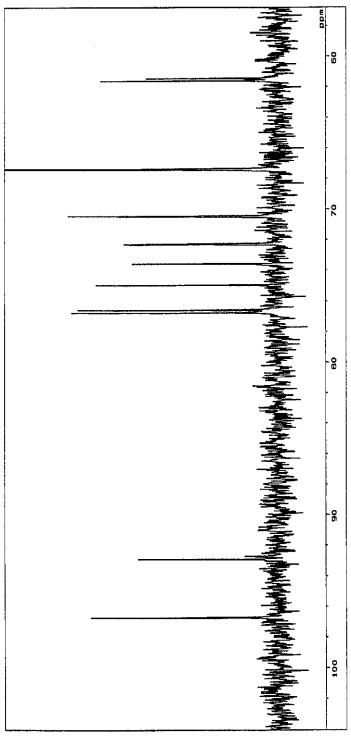
このように、本発明は、比較的簡単な酵素反応のみにより、当業界において求められていた希少糖であるＬ－グルコースを工業的に製造する方法を確立した点において、斯界に与える影響は極めて大きいと言える。

【図面の簡単な説明】

【図１】実施例１の方法で得たＬ－グルコースの$^{13}$Ｃ－ＮＭＲスペクトルを示す図である。

【図２】比較物質のＤ－グルコースの$^{13}$Ｃ－ＮＭＲスペクトルを示す図である。

【図１】




【図２】

