



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 19/20, 19/22	A1	(11) 国際公開番号 WO 93/10256 (43) 国際公開日 1993年5月27日 (27.05.1993)									
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/01498 (22) 国際出願日 1992年11月17日 (17. 11. 92) (30) 優先権データ <table border="0"> <tr> <td>特願平3/331212</td> <td>1991年11月19日 (19. 11. 91)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平4/32569</td> <td>1992年1月22日 (22. 01. 92)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平4/266639</td> <td>1992年9月8日 (08. 09. 92)</td> <td>JP</td> </tr> </table> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP] 〒601 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 丸尾重昭 (MARUO, Shigeaki) [JP/JP] 〒567 大阪府茨木市南安威2-2 13-104 Osaka, (JP) 太刀掛則之 (TACHIKAKE, Noriyuki) [JP/JP] 〒607 京都府京都市山科区大宅坂ノ辻町39 音羽寮 Kyoto, (JP) 江連洋治 (EZURE, Yohji) [JP/JP] 〒520-21 滋賀県大津市野郷原2-21-22 Shiga, (JP) (74) 代理人 弁理士 安富康男 (YASUTOMI, Yasuo) 〒601 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新薬株式会社内 Kyoto, (JP)		特願平3/331212	1991年11月19日 (19. 11. 91)	JP	特願平4/32569	1992年1月22日 (22. 01. 92)	JP	特願平4/266639	1992年9月8日 (08. 09. 92)	JP	(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), BR, CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), HU, IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), NO, RU, SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。
特願平3/331212	1991年11月19日 (19. 11. 91)	JP									
特願平4/32569	1992年1月22日 (22. 01. 92)	JP									
特願平4/266639	1992年9月8日 (08. 09. 92)	JP									

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING SACCHARIDE

(54) 発明の名称 糖類の製造法

(57) Abstract

A process for producing a high-purity saccharide having a specified chain length as a single substance by modifying the reducing end of a saccharide having an arbitrary chain length or a mixture thereof without using any saccharide transferase and treating the resultant saccharide or mixture thereof with an enzyme which attacks the end of a saccharide chain to yield a lower saccharide having specified chain length.

(57) 要約

本発明は、特定の鎖長を有する糖類を単品でしかも高純度で取得することを目的とする。本発明は、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物に対して、糖転移酵素を使用することなくその糖類の還元末端を修飾したのち、このものに特定の長さの糖鎖をエキソ型に切り出す酵素を作用させることによって、目的とする特定の鎖長の糖類を単離するという一連の操作により構成される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェッコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェッコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ヴェトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

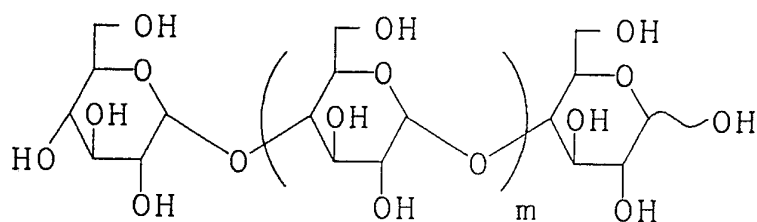
明 細 書

糖類の製造法

技 術 分 野

本発明は、グルコース、マルトース、マルトオリゴ糖、又はイソマルトオリゴ糖等の特定の鎖長の糖類を、単品でしかも高純度に得る製造法に関する。

本発明の製造法によって取得することができる特定の鎖長の糖類のうち分枝のないものの代表的な例として、グルコース及び下記のものを挙げることができる。



m は整数を表す。 m は、好ましくは、0～5の整数を表す。

上記のうち、マルトース ($m=0$)、マルトトリオース ($m=1$)、マルトテトラオース ($m=2$)、マルトペンタオース ($m=3$)、マルトヘキサオース ($m=4$) 等は、医薬品、食品、診断薬等の原料として用いることができる。

背 景 技 術

特定の鎖長の糖類を単品で高純度に得る方法としては、これまで、澱粉等に代表される、任意の鎖長を有する糖類を単独又は2種以上の適当なアミラーゼ類で分解し、これを公知の様々なカラムクロマ

トグラフィー等によって他の目的としないオリゴ糖や単糖から分離するか（澱粉科学ハンドブック，p452，1987ほか）、又はそれを更に結晶に導いて他の混在している目的としないオリゴ糖や単糖から分離する方法（澱粉科学ハンドブック，p456，1987）等が知られている。

上記いずれの方法もグルコースや未切断のデキストリン、その他の目的としないオリゴ糖の副生を回避することができず、本質的な欠点を有していた。

マルトースに関しては、地上澱粉を利用した高純度の製造法の提示等があるが（特開平4-158795号公報）、澱粉の高濃度仕込みができず、工業的に満足のできるものではなかった。

これらの問題点を解決するため、PCT/JP91/00984号（国際公開W0 92/01805）特許出願に係る発明がなされた。これは目的とする特定の鎖長の糖類に対し実質的に分離可能な物質（以下「分離可能物質」という）に、糖転移酵素により直接又は中間体を介して他の糖鎖供給源から糖鎖を転移させ、得られたオリゴ糖に、オリゴ糖に対して特定の鎖長の糖鎖をエキソ型に切り出す酵素（以下「エキソ型切断酵素」という）を作用させて目的とする特定の鎖長の糖類を単離するものであった。

また、これに関連しては、アミロースにエキソ型切断酵素を作用させる方法に関しては、ナカキくら（T. NAKAKIKU, K. AZUMA, K. KAINUMA, Carbohydrate Research, 128 (1984) 297-310）があり、過ヨウ素酸酸化の応用等についてはマーシャルら（J. J. MARSHALL, W. J. WHELAN Anal., Biochem., 43(1971) 316-321）があるが、こ

れらは本発明の技術全体に直接関係するものではない。

この方法は上記課題を解決する斬新な技術ではあったが、以下の欠点を有していた。

- ①糖転移酵素を必須の構成要素とするため、糖鎖供給源からの糖鎖の供給をしなければならず、この点で収率が良くなかった。
- ②糖転移酵素を作用させるため、分離可能物質は、糖転移酵素の受容体となることができる構造を有している必要があった（例えば、2、3、4位の水酸基の配位がグルコース型の配位を有する物質、又はアスコルビン酸等）。
- ③エキソ型切断酵素を作用させて目的とする特定の鎖長の糖類を生成させた後、これを単離する操作が必須であり収率をあげるのに限界があった。

発 明 の 開 示

本発明の目的は、上記の技術的欠点を克服することにあった。

本発明者らは、上記欠点を解決するため種々研究を重ねたところ

- ①糖転移酵素を使用することなく目的を達することができること、
- ②そのため、グルコース型の配位を有する分離可能物質を使用する必要がなくなったこと、
- ③その上で、イオン交換樹脂の上でエキソ型切断酵素を作用させることにより、その後の目的物単離が格段に改善させること、等の新しい事実を見出し、本発明を完成した。

本発明の要旨は、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物に対してその糖類の還元末端を修飾したのち、このものに特定の鎖長の糖鎖をエキソ型に切り出す酵素を作用させ、目的とする特定の鎖長の

糖類を生成させ、その後その目的とする特定の鎖長の糖類を取得するという一連の操作そのものにある。本発明においては、糖転移酵素を使用することがない。

本発明のいま一つの要旨は、上記一連の操作を実行するにあたって、原料である任意の鎖長を有する糖類を修飾しイオン交換樹脂に吸着させた後にエキソ型切断酵素を作用させるという、操作限定を施したことにある。

ここに修飾とは、還元末端に化学的処理を加えて、例えばイオン交換樹脂処理、溶媒抽出、濾過又は遠心分離等の簡単な分離操作によって分離することができる化合物（例えば後述する化合物 A、B、C、D 又は E）に誘導することをいう。この修飾の中には、外部から化学反応により還元末端に特定の官能基が導入させる場合も含まれるし、また還元末端の部分構造が官能基に変化する場合も含まれる。

本明細書においては、還元末端とは、任意の鎖長を有する糖類等の糖類の末端に位置する単糖における 1 位のアノメリック炭素 (anomeric carbon) 位をいうものとする。一般には、このようなアノメリック炭素位を有する単糖をも還元末端と称することがあり、本明細書においても還元末端を有する単糖をも還元末端ということがある。

本発明によれば、上に説明した従来技術（国際公開 W092/01805）にいう分離可能物質に相当するものを、糖類の還元末端を修飾する機能を有する化合物（以下「還元末端修飾剤」という。）を使用することにより得ることができる。

本発明においてはまた、糖類の還元末端を、例えば酸化することにより、又は置換若しくは無置換のアミノ基を導入することにより還元末端の修飾を実施することができる。

このような置換アミノ基の置換基としては、置換又は無置換のアルキル、置換又は無置換のアリール (aryl) 等を挙げることができる。

本発明においては、本発明に係る効果を挙げるために、イオン交換樹脂を効果的に適用させることができる。

この場合には、本発明において還元末端を修飾した後にその糖類をイオン交換樹脂に吸着させることができる。このようにした後、公知の方法で洗浄することにより、本発明に係る還元末端を修飾された糖類のみをイオン結合によりイオン交換樹脂内に止めることができる。その後ここに本発明に係るエキソ型切断酵素を反応させることができる。しかる後、イオン交換樹脂内で生成した目的とする特定の鎖長の糖類を、洗浄又は溶出という単純な操作を施すことにより取得することができる。

本発明に係る上記一連の操作を施すことにより、本発明に係る目的物生成後の単離操作は極めて簡単に実施することができるようになった。また、取得する目的物の純度を極めて高いものとすることができるようになった。

本発明を以下に更に詳述する。

本発明においては、原料として任意の鎖長を有する糖類を使用する。

このような糖類の好ましい例としては、例えば、地上澱粉、地下

澱粉、化工澱粉等の澱粉を挙げることができる。

化工澱粉とは、酸処理澱粉、酸化澱粉、架橋澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル、グラフト共重合等の化学的変性を起こした澱粉、湿熱処理澱粉、 α -澱粉等の物理的変性を起こした澱粉、デキストリン、アミロース、高含アミロース等の酸素変性を起こした澱粉等を意味する。

このような糖類の重要なものの一つとして、グルコース鎖の結合形式が α -1,4-結合である糖類を挙げることができる。また α -1,6-結合を有する糖類であっても、適用することができる。更に、 β -1,4-結合であってもよい。

本発明においては、例えば、澱粉等の α -1,4-結合を有する糖類に β -アミラーゼ等の後述するエキソ型切断酵素を作用させることにより、最終的に目的物であるマルトオリゴ糖を取得することができる。

本発明においては、例えば、澱粉等の α -1,4-結合を有する糖類にグルコアミラーゼ等の後述するエキソ型切断酵素を作用させることにより、最終的に目的物であるグルコースを取得することができる。

本発明においては、例えば、デキストラン等の α -1,6-結合を有する糖類にイソマルトデキストラナーゼ等のエキソ型切断酵素を作用させて、最終的に目的物であるイソマルトース等のイソマルトオリゴ糖を取得することができる。

本発明においては、例えば、セルロース等の β -1,4-結合を有する糖類にセルラーゼ等のエキソ型切断酵素を作用させて、最終的に

目的物であるセロビオース等のセロオリゴ糖を取得することができる。

本発明によって取得する目的物は、後述するエキソ型切断酵素を適宜選択することにより、選択することができる。

上記した本発明の原料となる任意の鎖長を有する糖類は、直鎖状であっても分枝していても良い。また、これらの混合物であってもよい。

このような糖類としては、例えば、地上澱粉、地下澱粉、化工澱粉、デキストリン、及びこれらの混合物等を挙げることができる。

上記の澱粉類を更に、 α -アミラーゼ等で液化したもの、液化後にプルラナーゼ、イソアミラーゼ等の枝切り酵素で処理したもの、又は水あめ等も、このような糖類の例として挙げることができる。このような液化は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、水酸化バリウム、炭酸バリウム、塩化バリウム、水酸化アルミニウム、塩化アルミニウム等の一価又は多価金属の水酸化物、塩類等を添加することにより行うことができる。

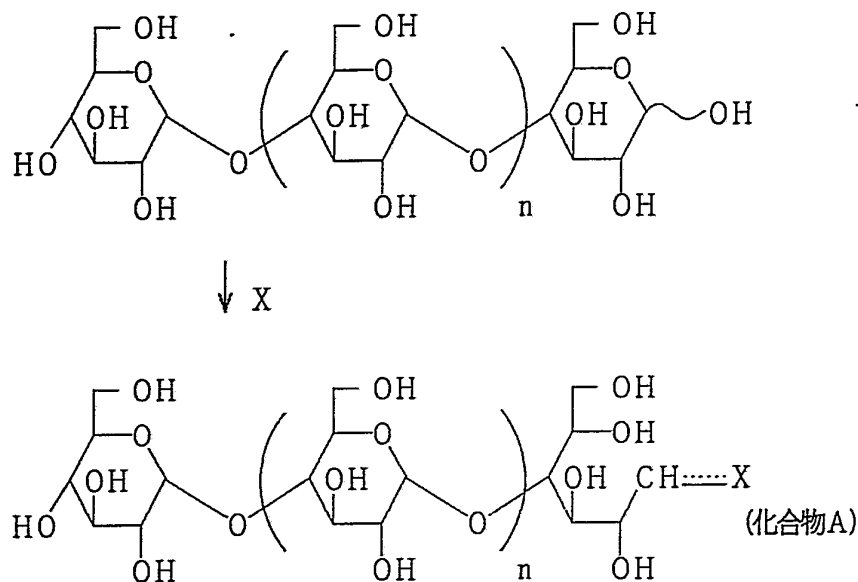
このような糖類としては、また、アミロース、マルトペンタオース、その他のマルトオリゴ糖及びそれらの混合物等も適当なものとして推奨することができる。本発明においては、これらの混合物をも使用することができる。

ここに掲げた化工澱粉の一種である酸化澱粉は、本発明の原料として用いることができるが、本発明に係る還元末端修飾法の一つで

ある酸化処理を施した後の糖類を意味するものではない（二国二郎監修「澱粉科学ハンドブック」 501頁、朝倉書店(1987)、中村道徳、貝沼圭二編「澱粉関連糖質実験法」 298頁、朝倉書店(1989)、加藤博通ら「新農産物利用学」 35頁、朝倉書店(1987)）。

上記の任意の鎖長を有する糖類を原料として使用して行う本発明の製造法を、以下にその還元末端修飾方法の類型ごとに分けて説明するが、本発明はこれらの類型のみに限定されるものではない。

〔還元末端修飾の類型 I - (1) 〕



注) ----- は単結合または二重結合を表す。

n は m よりも大きい整数を表す。

本発明においては、まず糖類に還元末端修飾剤 X を結合させることができる。

本発明の還元末端修飾剤としては、本発明に係る糖類の還元末端と反応する化合物であれば、いかなるものであっても適用することができる。このようなものの具体例は後述するが、例えば、本発明

に係る糖類の還元末端と反応する化合物であって、塩基性又は酸性の極性官能基を有する化合物等を挙げることができる。

本発明においては、これらの還元末端修飾剤によって、例えば、イオン交換樹脂等に吸着する性質を有する化合物 A を製造することができる。

このような還元末端修飾剤としては、アミノ基を有する化合物を挙げることができる。代表的な例としては、例えば、フェニルヒドラジン、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン等の置換基を有するフェニルヒドラジン、セミカルバゾン、ヒドロキシルアミン、置換基を有してもよいアルキルアミン等のアミン類、置換基を有してもよいフェニルを有するアルキルアミン又はアミン類等を挙げることができる。

上記のほか、本発明の還元末端修飾剤としては、例えば、2-アミノピリジン等のヘテロ環を有しかつアルデヒドとの反応性官能基を有する化合物等を挙げることができるし、また、他の形でアミン類を供与することができる化合物、例えば、酢酸アンモニウム等を用いることができる。

以上の反応においては、通常、いわゆるシッフのベースとしてよく知られている化合物が生成されるが、反応中に、ソジウムボロハイドレート、ソジウムシアノボロハイドレート等を添加して反応させ、シッフのベースの二重結合を一重結合としてより安定な化合物を生成させることができる。また、シッフのベースを生成した後、ラネーニッケル、パラジウムカーボン等の適当な触媒を用いて水添により還元することもできる。

〔還元末端修飾の種類 I-(2)、I-(3)〕

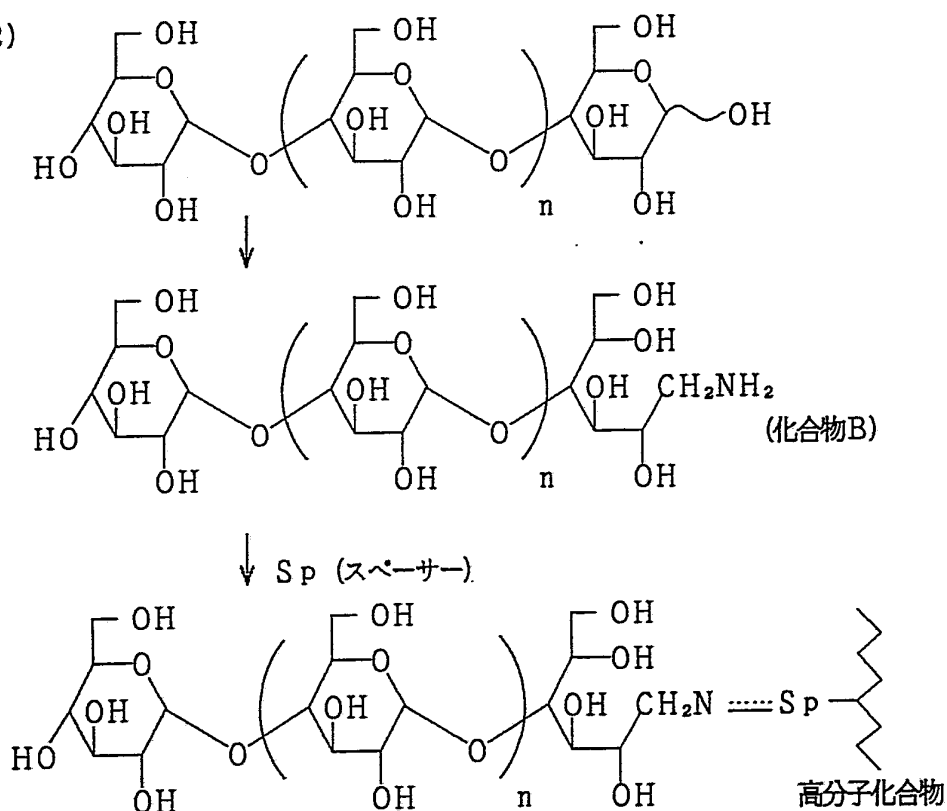
類型 I-(1) において、還元末端修飾剤が高分子の場合には、以下のようにして本発明を実施することができる。この場合には、例えば、濾過等の簡単な処理によって、後の分離操作を容易にすることができる。

本発明においては、糖類に、例えばシアノボロハイドレート、酢酸アンモニウム等の還元末端修飾剤を反応させて、塩基性を有する化合物 B に誘導することができる。

その後、例えば、いわゆる二反応性官能基を有するスペーサー、例えば、グルタルアルデヒド、1,4-ブタンジオール ジグリシル

エーテル等を用いて、高分子化合物（例えば、弱塩基性イオン交換樹脂等）に化学的に結合させることができる（類型 I-(2)）。

I-(2)
の一例

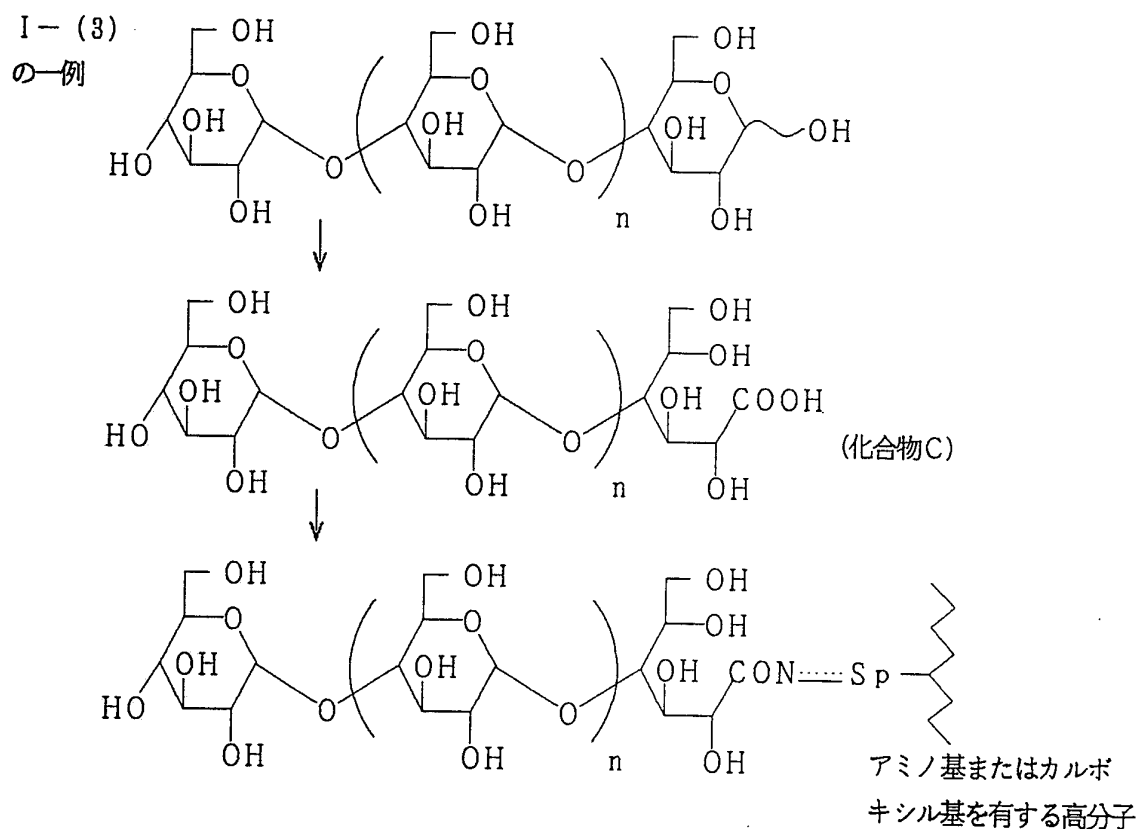


本発明においては、糖類に、例えば、臭素、塩素、臭素水、次亜ヨウ素酸、次亜塩素酸、さらし粉、過酸化水素等の還元末端修飾剤を反応させて、酸性を有する化合物Cに誘導することができる。

この場合の酸化は、後述する類型ⅠⅠⅠの箇所で詳しく説明する酸化と同様の酸化方法により同様に行うことができる。

その後、このCを、例えばω-アミノアルキルアミンアガロース等のアミノ基を有する高分子化合物に、水溶性カルボジイミドを縮合剤として化学的に結合させることができる（類型Ⅰ-(3)）。

このようにして高分子化合物と結合させた後、エキソ型酵素を反応させれば、濾過により目的物質を単離することができる。



この場合において糖類を高分子化合物に化学的に結合させるにあたって、高分子化合物を予め活性化した後（例、エポキシアクティベーター アクリルアミド、エポキシアクティベーター セファローズ等とした後）、反応させることもできる。

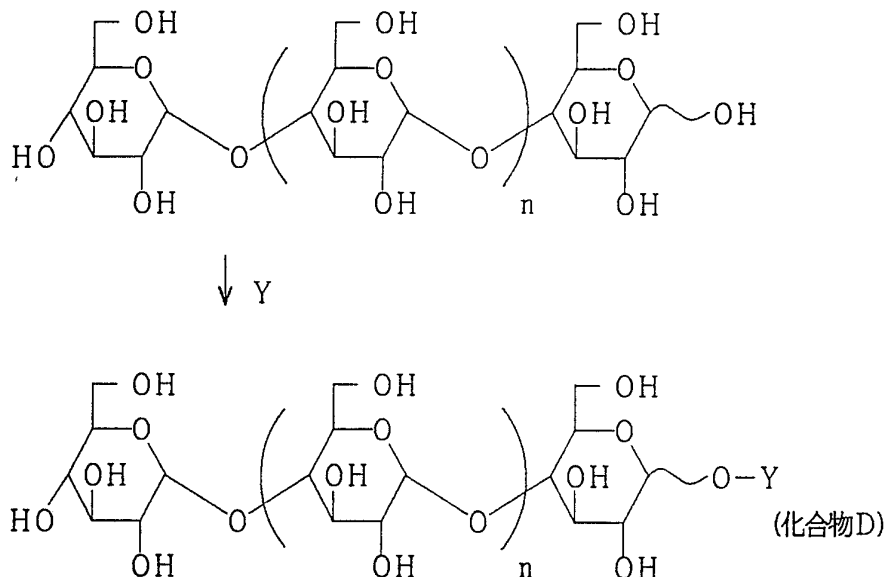
これらの高分子化合物は、水等に不溶の化合物でもよいが、例えば、分子量数千～数万以上で、水等に溶ける化合物であってもよい。その場合には、限外濾過によって目的を達成することができる。高分子化合物が有する官能基は、そのすべてをスペーサー等と反応させる必要はない。一部の極性官能基を残してあれば、特に高分子が水等に溶ける場合には、これらの極性官能基を利用して、例えば、イオン交換樹脂等によって分離するのに好都合となる。

糖類の還元末端を修飾する方法としては、更に以下の場合を挙げることができる。

糖類の還元末端のアルデヒドを、シアンヒドリン等のニトリルを有する化合物へと導き、これを還元してアミノ基を有する化合物へと導いた後、本発明の目的を達成することもできる。また、亜硫酸水素塩等を用いたアルデヒドの亜硫酸水素塩付加物への誘導反応によって取得される亜硫酸水素塩付加物、又は、例えば、それらにより誘導されるスルホン酸基を有する化合物として本発明の目的を達成することもできる。

（以下次頁）

〔還元末端修飾の種類 I I〕



本発明においては、他の類型を挙げることができる。このようなものとして、還元末端修飾剤として、例えば、置換されていてもよい低級アルキルアルコール又はフェノール誘導体を使用する場合を挙げることができる。

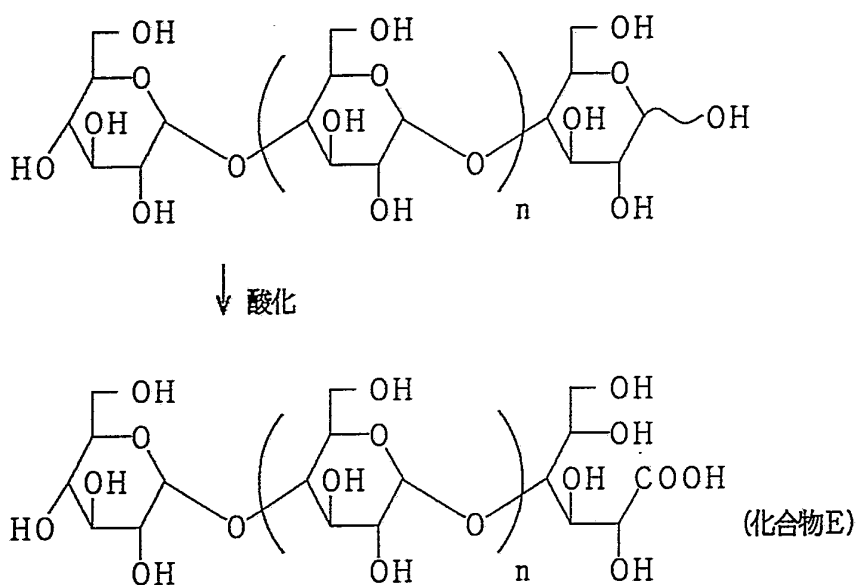
そのような置換されていてもよい低級アルキルアルコール又はフェノール誘導体は、アミノ基等の塩基性官能基又はスルホン酸、カルボン酸等の酸性官能基（これらは適当に保護されていてもよい）を有する必要がある。

これらは、還元末端修飾剤としてアノメリック炭素位の水酸基に作用させれば目的とする化合物Dを取得することができる。この反応には、例えば、鉍酸、ルイス酸、陽イオン交換樹脂等を酸触媒として使用することができる。保護基を有した還元末端修飾剤を用いたときは、脱保護すれば化合物Dを取得することができる。

他の例は、酸又は塩基触媒と酸無水物、又は酸ハロゲン化物との反応による還元末端のアシル化反応である。即ち、酸無水物等が例えば適当に保護されたアミノ基を有する場合、アシル化した後、脱保護をすれば化合物Dを取得することができる。

本発明の糖類と還元末端修飾剤との反応は、通常の化学反応の形態によって提出される反応方法を適用することができる。反応温度、反応時間等は、適合する反応に至適のものを自由を選択して適用させることができる。反応生成物を取得するためには、pHの調整、遠心分離、析出、濾過等の一般的手法を適宜適用することができる。

〔還元末端修飾の種類 I I I〕



本発明においては、糖類の還元末端を酸化して糖類のアノメリック炭素位をカルボン酸に変換して化合物Eを取得することができる。このような酸化は、例えば、次亜ヨウ素酸、次亜塩素酸、次亜臭素酸等の次亜ハロゲン酸、次亜ヨウ素酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、次亜臭素酸ナトリウム、次亜ヨウ素酸カリウム、次亜塩素酸カリウム、次亜臭素酸カリウム等の次亜ハロゲン酸の金属塩、臭

素、塩素、ヨウ素、さらし粉、過酸化水素等の酸化剤を反応させることにより、することができる。その中でも、臭素、塩素、次亜ヨウ素酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、次亜臭素酸ナトリウム等の次亜ハロゲン酸の金属塩が好ましい。

酸化はまた、反応液に塩素を吹き込むことによっても行うことができ、この場合には、反応液の pH は特に限定されないが、澱粉等の原料糖類の安定性及び塩素の効率的反応性等を考慮するとカセイソーダ、カセイカリ、水酸化カルシウム、水酸化バリウム等で反応液をアルカリ性に保ちながら塩素を吹き込むのが好ましい。

本発明に係る上記酸化は、またパラジウムカーボン等の触媒を用いた空気酸化等によりすることができる。

このような酸化にあたっては、例えば、炭酸バリウム等の緩衝剤を適宜共存させることができる。

また上記の酸化は、電解酸化、アルドースデヒドロゲナーゼ活性を有する微生物、又はアルドースデヒドロゲナーゼを用いる生物学的酸化によっても、することができる。

過ヨウ素酸による酸化は、還元末端以外の部分も同時に酸化する傾向が強いので、本発明には適していない。

また、以上の酸化反応においては、酸化反応の条件によっては、例えば、アルカリ性溶液中での次亜塩素酸ナトリウムを用いる反応では、酸化反応の過程で原料である糖のごく僅かの糖の還元末端が異性化して非還元糖であるケトースとなる場合もあるが、これらのケトースも酸化反応中に酸化され結果として、還元末端にカルボン酸等を有する酸性糖になり、従って、このような条件下においても、

本発明にとって問題とならないのは自明のことである。

〔還元末端修飾の類型 I V〕

上述した類型のいずれにも属さない本発明の類型を挙げることができる。

本発明においては、還元末端の1位をO-アセチル化した後、ハロゲン化水素で処理して1個がハロゲンによって置換されたハライドとし、この化合物を用いることにより、例えばリン酸エステル等の本発明に係る分離可能な極性基を有する物質に導くことができる。

また、糖の還元末端をグリカルに誘導し、これより本発明に係る分離可能な極性基を有する物質に導くことができる。これらのものは、本発明の類型として掲げたA、B、C、D又はEの範疇には入らない物質である。

上に例示したI～IVの類型によって本発明に係る還元末端修飾反応を実施することができる。

本発明においては、上記の還元末端修飾反応を終えたのち直ちにエキソ型切断酵素を作用させることができる。このような場合としては、例えば、最終的に多少の目的とはしない糖類若しくは還元末端修飾反応に供されることがなかった原料糖類が混入していても差支えない場合、本発明の反応条件が良く精製処理を行うことなく本発明の目的を達成することができる場合等が考えられる。

本発明においては、上記の還元末端修飾反応を終えたのち、エキソ型切断酵素を作用させる前に、極性官能基に注目した分離操作を適用することができる。

例えば、上記の化合物A、D又はEにおいては、必要に応じて有

機溶媒等で過剰の未反応試薬を取り除き又は透析等の手段で除去し、

上記還元末端修飾反応タイプの I - (1) 等において必要があるときには、イオン交換樹脂によってこれらの処置を施すことができる。このようなイオン交換樹脂としては後述するものを挙げるることができる。

上記から明らかなように、本発明においては、還元末端修飾反応を終えたのち、上記措置（極性官能基に注目した分離操作）を施すか又は施さずにエキソ型切断酵素を作用させることとなる。

本発明においてエキソ型切断酵素を作用させる場合には、エキソ型切断酵素に適した pH においてすることができる。

作用させるエキソ型切断酵素の種類は、取得しようとする特定の鎖長の糖類の種類によって適宜選択することができる。

エキソ型切断酵素の添加量は、用いるエキソ型切断酵素の種類等により適宜選択することができる。

また、反応温度及び反応時間は、使用する酵素の種類及び量に応じて適宜変化させることができる。

エキソ型切断酵素を作用させる場合においては、同時にプルラーゼ、イソアミラーゼ、 α -アミラーゼ等の他の酵素を共存させた状態でエキソ型切断酵素を作用させることができる。

本発明に係るエキソ型切断酵素としては、代表的なものとして例えば、グルコアミラーゼ、 β -アミラーゼ、マルトオリゴ糖生成酵素等を挙げるることができる。

このようなエキソ型切断酵素として更に詳しくは、マルトトリオース生成酵素としては、例えば、ストレプトミセス グリセウス N

A-468 (FERM-2227)、澱粉科学25巻、155-161頁(1978)記載の酵素等を挙げることができる。

マルトテトラオース生成酵素としては、例えば、シュードモナススタツテリイ Arch. Biochem. Biophys. 145巻、105-114頁(1971)記載の酵素、シュードモナスサッカロフィラ IAM1504、「日本農芸化学会」昭和60年大会要旨集 370頁記載の酵素等を挙げることができる。

マルトペンタオース生成酵素としては、例えば、シュードモナス KO-8940 (FERM P-7456)、「日本農芸化学会」昭和59年大会要旨集 181頁記載の酵素等を挙げることができる。

イソマルトース生成酵素としては、例えば、イソマルトデキストラナーゼ等を挙げることができる。セロビオース生成酵素としては、例えば、セルラーゼ等を挙げることができる。

例えば、マルトースを製造する場合、 β -アミラーゼを用いることができるが、用いる β -アミラーゼに適した pH 4~10、好ましくは、pH 7.6に反応液を調整し、 β -アミラーゼを反応液に入れ、反応温度25~65℃の間で数時間~2日間反応させるのが適当である。また例えば、マルトテトラオース生成酵素の場合には、マルトテトラオース生成酵素に適した pH 4~10、好ましくは、pH 8.0で温度25~55℃、数時間~2日間で反応させ目的を達成することができる。

エキソ型切断酵素は、回収することにより再利用することもできる。

エキソ型切断酵素は、溶液状で用いることもできるが、汎用されている公知の固定化酵素を製造する方法で調製した固定化酵素の型

で反応させることもできる。特に、粗酵素を用いる場合には、固定化酵素を用いることは夾雑物を少なくすることができ、精製工程上有利である。

本発明においては、エキソ型切断酵素を作用させた後、例えば、イオン交換樹脂又は電気透析等により処理することによって、実質的に目的とする特定の鎖長の糖類のみを単離することができる。

本発明においてエキソ型切断酵素を作用させた後目的物を単離する目的でイオン交換樹脂を用いるときには、反応混合物をイオン交換樹脂に負荷 (charge) させた後、このものを十分に洗浄することにより洗浄液中から目的物を取得することができる。脱塩処理等は、イオン交換樹脂の処理で兼用することもできる。

本発明において使用するイオン交換樹脂としては、必要に応じて酸性イオン交換樹脂又は塩基性イオン交換樹脂を使用することができる。このような樹脂としては、例えば、ダウエックス 50W×2 (登録商標)、ダウエックス 1×2 (登録商標)、ダウエックス SBR (登録商標)、ダウエックス 66 (登録商標)、ダイヤイオンSK-104 (登録商標)、ダイヤイオンSA-11A (登録商標)、ダイヤイオンWK-204 (登録商標)、ダイヤイオンWA-20 (登録商標)、ダイヤイオンCR-10 (登録商標)、ダイヤイオンPA-306 (登録商標)、ダイヤイオンPA-406 (登録商標)、アンバーライトIR-120 (登録商標)、アンバーライトHFS-471X (登録商標) 等を挙げることができる。これらのイオン交換樹脂の量は、適宜増減することができる。

更に、本発明において、本発明の一実施態様である糖類の還元末端を、例えば、カルボン酸にする方法においては、例えば、出発原

料として澱粉を用い、エキソ型酵素を作用させた反応液中には、デキストリン等の高分子化合物、目的とする特定の鎖長の糖、エキソ型酵素反応後切断された形で残存する還元末端がカルボン酸となった糖類、無機物などが存在する。このような場合において、これらの反応液中の不純物をアルカリ金属型またはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂を用いて効率的に除去し、そのことにより高純度の特定の鎖長の糖を製造することができる。

この方法は、上記一連の本発明に係わる工程を研究するうち、これらの反応液中の不純物をアルカリ金属型またはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂を用いて効率的に除去できることを、見いだしたことにより確立されたものである。

本発明の一実施態様であるこの方法は、上に説明した①原料糖類の還元末端修飾反応、②エキソ型切断酵素による反応、③精製、と云う一連の工程のうち、③をアルカリ金属型またはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂を用いて行なおうとするものである。

この方法においては、上に説明したエキソ型酵素反応を施したのちの反応液を、必要に応じて活性炭処理、濾過、濃縮等をしたのち、アルカリ金属型またはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂のカラムを通過させたのち、水等で展開し、目的とする特定の鎖長の糖を含有する画分を集めることによりすることができる。

この方法は、エキソ型酵素反応後切断された形で残存する還元末端がカルボン酸となった糖類が、アルカリ金属型またはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂のカラムを用いると、目的とする特定の鎖長の糖より速やかに溶出することを見いだしたことにより可

能となったのである。このことは、この方法の驚くべき効果の一つである。

この方法によれば、澱粉工業で用いられている既存の設備（例えば、アルカリ金属型あるいはアルカリ土類金属型強酸性イオン交換樹脂の疑似移動層型カラムまたは通常のイオン交換樹脂カラム等）を用いることができ、しかもイオン交換樹脂の再生回数を著しく減らすことができる。

本発明においては、上記一連の工程中において、エキソ型切断酵素を作用させる工程を、還元末端を修飾された糖類をイオン交換樹脂に吸着させた状態で実施することができる。

この方法は、上記一連の本発明に係る工程を研究するうち、エキソ型切断酵素による反応がイオン交換樹脂内においても見事に進行する事実を見いだしたことにより確立されたものである。

本発明の一実施態様であるこの方法は、上に説明した①原料糖類の還元末端修飾反応、②精製、③エキソ型切断酵素による反応、④精製、という一連の工程のうち、②と④を省略し、③をイオン交換樹脂内において行おうとするものである。

この方法によれば、上記に説明した還元末端修飾反応を施したのち、還元末端を修飾された糖類をイオン交換樹脂に吸着させることができる。このようなイオン交換樹脂としては、前記したものを挙げることができる。

しかる後、このものを、水等で洗浄することができる。

この方法においては、この過程において、還元末端修飾反応が不十分である等の理由により混合している未修飾の糖類は、イオン交

換樹脂に吸着せずに分離して溶出するから、極めて簡単に原料の精製をも完了させることができる。このことは、この方法の驚くべき効果の一つである。

この方法においては、その後イオン交換樹脂内に前記のエキシ型切断酵素を通過させることにより酵素反応を進行させることができる。

この方法においては、エキソ型切断酵素反応時においても目的とする物質は中性物質であるためイオン交換樹脂により分離することができるが、より好ましくは、エキソ型切断酵素反応の終了後に水で洗浄して十分に目的物を集めることができる。

この方法によれば、本発明における全体の工程が単純化することができる。また、生成する目的物の純度を高めることができる。

この方法をも含め、本明細書に開示した本発明に係るすべての製法において、その工程中で実施される精製は、公知の方法を組み合わせることができる。

例えば、還元末端修飾反応を終了させた後において直ちにエキソ型切断酵素を作用させた場合においては、エキソ型切断酵素を作用させた後に、濾過、活性炭処理、限外濾過、脱塩等を適用することができる。

またエキソ型切断酵素を作用させた後、切断された形で残存する還元末端修飾済の糖類等を除去するためには、電気透析器、イオン交換樹脂処理、濃縮、再結晶、乾燥等を処理を適宜組み合わせて適用することができる。

また、例えば、澱粉に還元末端修飾反応を終了させた後、エキソ

型切断酵素を作用させる前に、濾過、イオン交換樹脂処理等によって、極性官能基に注目した分離操作を行った場合には、分離操作後に得られた反応混合物にエキソ型切断酵素を作用させた後、反応液を、電気透析器、イオン交換樹脂等により、エキソ型切断酵素作用後に切断された形で残存する還元末端の修飾された糖類等を除去した後、必要に応じて活性炭処理、濾過、濃縮、再結晶又は乾燥等の処理を適宜組み合わせて適用することができる。

これらの精製操作において、例えば、糖類の還元末端を修飾して酸性物質に誘導した場合には、その後の処理に必要なイオン交換樹脂等の必要量を減少させるために、又は電気透析器の処理を有利に導くために、反応液に水酸化カルシウム、水酸化バリウム等を加えて濃縮し、大多数の、エキソ型切断酵素作用後に切断された形で残存する還元末端の修飾された糖類等を沈殿させ除去する等の手段を組み入れることができる。

これらの精製操作において、例えば、糖類の還元末端修飾反応において、次亜塩素酸ソーダ等の酸化剤を用いた場合は、必要に応じて亜硫酸ナトリウム等の還元剤を用いて過剰の酸化剤を不活化した後、上記の精製手段を実施することもできる。

また還元末端修飾反応に疎水性化合物を用いた場合等には、有機溶媒抽出等の手段を組み入れることもできる。

本発明によれば、特定の鎖長の糖類のみが得られるという利点だけでなく、従来法と比較して製造工程が非常に簡易となり、経費、労力等を大幅に節減することができ、収率も充分に高めることができる。

24

本発明の製造法で得られる糖類、例えば、マルトース ($m = 0$ の場合) は、特に高純度が要求される医薬用に有用であり、その形態としては、点滴剤等を挙げることができる。

また、当然に食品用としても用いることができる。マルトースは食品用としても非常に利用価値の高いものであるし、高純度が要求される点においても医薬用と同様であって、本発明の製造法を有効に適用することができる典型的な応用分野である。

本発明の製造法によって取得することができる糖類のうち、マルトトリオース ($m = 1$)、マルトテトラオース ($m = 2$)、マルトペンタオース ($m = 3$)、マルトヘキサオース ($m = 4$) 等は、診断薬等の原料として用いることができる。

更に、マルトースを還元して製造される甘味剤のマルチトールの結晶化は、原料のマルトースが純粋なものほど良好であるので、本発明の製造法で製造されるマルトースは、この点に対しても非常に有効である。

マルトテトラオース、マルトペンタオース等は経腸栄養剤としても有用である (食品工業 1990年 8月30日号、52頁)。

本発明に係る糖類を医薬用として適用する例としては、例えば、輸液等を挙げることができる。輸液に適用する場合に、例えばマルトースはその10%溶液が等張であり、等量のグルコースの2倍のエネルギー価を有すること等から、グルコース等よりも有益であることが知られており (「麻酔と蘇生」20巻 3号 163頁。1984年)、同様に等張のマルトトリオース15%溶液はグルコースの3倍のエネルギー価を有して有効性が更に高い。

本発明に係る糖類を医薬用に適用する場合には、例えば、後に輸液組成例として掲げる組成のものを適用することができるが、一般的には、糖（マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース等）を単独で、又はグルコース若しくはマルトースと同時に含有させ、適宜塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム等の無機塩を含有させることができる。

本発明において、前記した還元末端修飾反応を実施するに際して適用する酸化剤の反応は、通常は、50℃以下の温度において行われるが、50℃以上の温度、必要なら90～100℃以上の温度で短時間で反応を行うことができる。

高温では、酸化剤の分解も早いですが反応も早いので、工業的規模で本発明を実施する場合、例えば、連続式液化装置、連続糖化装置のようなパイプライン中で本発明に係る澱粉等の乳液、液化液を高温で流しながら処理する過程において、酸化剤を加えてパイプライン中で連続的に反応を行うことができるようになる。

また、例えば、次亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸カルシウム等の酸化剤を用いた場合には、反応缶の材質は、その酸化作用等のために制限を受け、通常、澱粉工業等で使用されている材質の反応缶では、不適切な場合があるが、パイプライン中で反応した反応液を連続的に、枝切り酵素反応、糖化反応等の次の反応を行う反応缶に流加する場合、パイプライン中で反応が終了していれば、ほとんどの酸化剤等は、パイプライン通過中で消費してしまい、次の反応は、通常の反応缶で行うことができるようになる。このとき反応温度にみあった適切なパイプラインの長さを選択すれば、広い反応温度範

囲でパイプライン中での反応が可能となる。また、そのパイプラインの部材を適当なものとすれば、酸化剤によるパイプラインの浸食も防止することができ、設備経費、維持経費等の面で有利となる。

本発明により、以下の効果をあげることができるようになった。

- (1) 糖転移酵素を用いることがないので、極めて良い収率で目的物を取得することができた。
- (2) 地上澱粉、地下澱粉、化工澱粉、デキストリン、各種オリゴ糖、及びそれらの混合物等の各種の糖類を、原料として幅広く活用することができた。
- (3) 液化、糖化反応だけでは従来法では製造することができなかった高純度の目的物を取得することができ、またその収量をあげることができた。
- (4) 精製工程が簡単になった。
- (5) 還元末端修飾後の澱粉は低粘性を有するから、工業上高い濃度で澱粉を反応させることができるようになり、生産性が向上するとともにコストダウンが可能となった。
- (6) コーンスターチ等は特に高濃度においては著しい白濁が見られるが、これを原料として適用するときに、還元末端修飾後には白濁が減少し溶解度が増大して、後の精製工程を簡略化することができた。
- (7) 酸化によって還元末端を修飾する場合において、例えば次亜塩素酸ソーダ等の食品添加物を使用することも可能となり、食品用の目的物を取得しようとするときには、極めて合目的的となった。

発明を実施するための最良の形態

本発明の実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明する。以下の実施例7、8、11、13、14、15、16、17において、マルトースおよびマルトテトラオースの純度は、HPLCにより測定された値で、それらはマルトオリゴ糖中におけるマルトースおよびマルトテトラオースの純度を意味する。

実施例1

マルトペンタオース 200mg（生化学工業社製、純度98%以上）を20mlの蒸留水に溶解させ、これにフェニルヒドラジン溶液（フェニルヒドラジン：酢酸：水=2:1:1 体積比として混合したもの）を4ml加え、90分間沸騰水浴中で煮沸した。放冷後 1M の炭酸ナトリウムを16.5ml添加してpHを弱アルカリ（pH 8.65）にし、等量の酢酸エチルで3回抽出後、水層を旭化成社製卓上脱塩装置マイクロアシライザー G1（アシプレックスカートリッジ AC-220-10）を用いて脱塩した。（処理後の試料液量 21.3ml）。このマルトペンタオースーオサゾンの生成、及び原料であるマルトペンタオースの消滅は、シリカゲル 60 F₂₄₅ プレート（メルク社製、展開溶媒 1-プロパノール：アンモニア：水=6:1:2 体積比）により確認した。以下の薄層クロマトグラフィー（TLC）はすべてこの方法を用いた。

このマルトペンタオースーオサゾン溶液（液量 21.3 ml、pH 9.2）に、 β -アミラーゼ（EC 3.2.1.2. シグマ社製、スイートポテト由来）を 6658.5 ユニット（蛋白量として 6.9mg）添加し、40℃で60分間インキュベートした。マルトースの生成をTLCで確認した後、氷冷下で沈澱する物質を析出させて遠心分離（14250G×15分）によ

28

り除去した。この上清に液量が 100ml となるように蒸留水を加えたもの (pH 7.08) を強酸性イオン交換樹脂 (Dowex 50W ×2、H⁺ 型) 100ml を充填した 25mmφ × 50cm カラムにのせた。非吸着画分を通過画分とし、水洗を行い、各 100ml ずつ分画した。各分画を減圧乾固し蒸留水 1 ml に溶解後、TLC 分析により目的とするマルトースが通過画分及び最初の洗浄画分 100ml に溶出されていることを確認した。これら両画分を混合し 5.0ml にしたものに対して、メタノール 1.2ml と活性炭 (Darco G-60 和光純薬社製) 40mg を加え 30 分、50℃ でインキュベートした。14250G × 15 分で遠心分離を行い、活性炭を除去後、上清を減圧乾固した結果、53.4mg のマルトースを取得した。収率 66.8 %。このものは、TLC 分析にて単一のスポットを与えた。

実施例 2

アミロース A 200mg (ナカライテスク社製、コーンスターチ由来、平均分子量約 2900) を 20ml の蒸留水に加熱溶解させ、これにフェニルヒドラジン溶液 (フェニルヒドラジン : 酢酸 : 水 = 2:1:1 体積比として混合したもの) を 4ml 加え、90 分間沸騰水浴中で煮沸した。放冷後 1 M の炭酸ナトリウムを 13.0ml 添加して pH を 9.25 とし、等量の酢酸エチルで 3 回抽出した後、水層を旭化成社製卓上脱塩装置マイクロアシライザー G1 (アシプレックスカートリッジ AC-220-10) を用いて脱塩した。(処理後の試料液量 29.8ml)。このアミロース A - オサゾン溶液 (pH 7.57) に、β - アミラーゼ (EC 3.2.1.2. シグマ社製、スイートポテト由来) を 6658.5 ユニット (蛋白量として 6.9mg) 添加し、40℃ で 60 分間インキュベートした。マルトー

スの生成をTLCで確認した後、氷冷下で沈殿する物質を析出させて遠心分離（14250G×15分）により除去した。この上清に液量が100mlとなるように蒸留水を加えたもの（pH 6.96）を強酸性イオン交換樹脂（Dowex 50W ×2、H⁺型）100mlを充填した25mmφ×50cmカラムにのせた。非吸着画分を通過画分とし、水洗を行い、各100mlずつ分画した。各分画を上述のマイクロアシライザーで処理し、減圧乾固した後、蒸留水1mlに溶解させ、TLC分析により目的とするマルトースが通過画分及び最初の洗浄画分100mlに溶出されていることを確認した。これら両画分を混合し、5.0mlにしたものに対して、メタノール1.2mlと活性炭（Darco G-60 和光純薬社製）40mgを加え30分、50℃でインキュベートした。14250G×15分で遠心分離を行い、活性炭を除去後、上清を減圧乾固した結果、123.5mgのマルトースを取得した。収率69.5%。このものは、TLC分析にて単一のスポットを与えた。

実施例3

マルトペンタオース 300mg（生化学工業社製、純度98%以上）を30mlの蒸留水に溶解し、0℃に冷却後、臭素0.3mlを加え、遮光下室温にて17時間攪拌した。TLC（展開溶媒；n-ブタノール：エタノール：水＝5：3：2）にてマルトペンタオースの消失を確認後、反応液に空気を吹き込み、過剰の臭素を除去し更に亜硫酸ナトリウムを300mg加えた。2N-水酸化ナトリウムにてpHを6.17とし、 β -アミラーゼ（EC3.2.1.2.シグマ社製 スイートポテト由来）を6658.5ユニット（蛋白量として6.9mg）加え、40℃にて2時間反応させた。TLCにてマルトースの生成を確認後、反応液を旭化成社製卓上

脱塩装置マイクロアシライザー G1 (アシプレックスカートリッジ AC-230-10) にて処理した。マルトースの生成量をHPLCにて定量し、80.3mgの生成を認めた。このものは、TLC分析にて単一のスポットを与えた。

実施例 4

メタノール溶液(メタノール:蒸留水=9:1 体積比)10ml にマルトペンタオース(林原生物化学研究所製、純度98%以上) 0.25mmol (207.18mg)、酢酸アンモニウム 20mmol(1.54g)及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム10mmol(630mg)を溶解させ常温で40時間反応した。6N塩酸を6.5ml 添加後、旭化成社製卓上脱塩装置マイクロアシライザーG1(アシプレックスカートリッジ AC-220-10)を用いて脱塩した。試料溶液を蒸留水で 50ml に調節後、強酸性イオン交換樹脂(Dowex 50W ×2 H⁺ 型) 50mlを充填した20mmφ×30cmカラムにのせた。300ml 蒸留水で洗浄後、アンモニア300ml にて溶出する画分を集め減圧濃縮した。この溶液(6ml、pH9.05)にβ-アミラーゼ(E C 3.2.1.2 シグマ社製、スイートポテト由来)を6658.5ユニット(蛋白量として 6.9mg)添加し、40℃で120 分間インキュベートした。マルトースの生成をTLC で確認後、試料溶液を蒸留水で50mlに調節し再度上記の条件にて樹脂処理を行った。非吸着画分を通過画分とし、水洗を行い、各々100ml ずつ分画した。各画分を上述のマイクロアシライザーで処理し減圧乾固した後、蒸留水1ml に溶解させ、TLC 分析により目的とするマルトースが通過画分及び最初の洗浄画分100ml に溶出されていることを確認した。これら両画分を混合し減圧乾固した結果、66.1mgのマルトースを取得した。収率78.4

%。このものは、TLC 分析にて単一のスポットを与えた。

実施例 5

アミロースA 3g (ナカライテスク社製、コーンスターチ由来、平均分子量2900) を100ml の蒸留水に加熱溶解し、冷却後臭素1ml を加え、遮光下室温にて2 日間攪拌した。空気を吹き込み過剰の臭素を除去し、さらに溶液の色が消えるまで攪拌した。これを強塩基性イオン交換樹脂 (DIAION SA-10A, OH⁻ 型) 200ml に供し、水洗200mlを行った後、0.5N-HCl 2000ml によるカルボン酸誘導体の溶出を行った。溶出液は、KOH にて中和後、旭化成社製卓上脱塩装置マイクロアシライザー G3 (アシプレックスカートリッジ AC-220-400) を用いて脱塩した。これを減圧濃縮後、濃縮液を凍結乾燥し、1.40g の粉末を得た。この粉末から200mg を秤量し、20mM Acetate buffer(pH4.8) 10mlに加熱溶解し、冷却後 β -アミラーゼ (シグマ社製、スイートポテト由来) を2219.5ユニット (蛋白量として2.3mg) 加え、40℃で3 時間インキュベートした。反応液を遠心分離して不溶物を除去し、上清をマイクロアシライザー G1 (アシプレックスカートリッジAC-230-10) を用いて脱塩及び β -アミラーゼ切断残渣の除去を行った後に、HPLCによるマルトースの定量を行い、137mg の生成を認めた。

輸液組成例

マルトトリオース 15g、塩化カリウム 0.03g、塩化カルシウム 0.02g、塩化ナトリウム 0.6g、乳酸ナトリウム 0.31g を混合し、輸液 100mlの組成とする。

参考例 1 マルトトリオース生成酵素の調製

3 2

ストレプトミセス グリセウス NA-468 株をデキストリン 3%、大豆粉 2%、酵母エキス 0.1%、ポリペプトン 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、 CaCl_2 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、(pH 7.0) からなる組成の培地に植菌して、27°C、4 日間振盪培養した。培養液の遠沈上清の 40-60% 飽和の硫酸沈澱画分をとり 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.8) に対して透析し、その遠沈上清をマルトトリオース生成酵素とした。

参考例 2 マルトテトラオース生成酵素の調製

シュウドモナス スタッテリ IFO-3773 株をバクトカジトン 1.0%、酵母エキス 0.5%、 KH_2PO_4 0.28%、 K_2HPO_4 0.1% (pH 7.0) の組成でなる培地に植菌して 30°C で 18 時間培養した。硫酸沈澱、透析により部分精製したものをマルトテトラオース生成酵素とした。

参考例 3 5%パラジウム-カーボン触媒の調製

PdCl_2 (320 mg) を濃塩酸 (5 ml) に溶解後、蒸留水 (30ml) と活性炭 (白鷺 Z; 3.8g) を加えた。10 N-水酸化ナトリウム溶液で pH 5.0 に調製後、 NaBH_4 (341 mg) を蒸留水 (10 ml) に溶解した水溶液を速やかに加えた。これを濾過、水洗して 5% パラジウム-カーボン触媒とした。

実施例 6

馬鈴薯澱粉を α -アミラーゼおよびプルラーナーゼで処理した溶液 (198 mg/20 ml) にフェニルヒドラジン溶液 (フェニルヒドラジン : 酢酸 : 水 = 2 : 1 : 1 体積比として混合したもの) を 4 ml 加えて 90 分間沸騰水浴中で加温した。放冷後、1M の炭酸ナトリウム溶液

を 17ml 添加して pH を弱アルカリにし等量の酢酸エチルで 3 回抽出後、水層を旭化成卓上脱塩装置マイクロアシライザー G 1 (アシプレクスカートリッジ AC-220-10) を用いて脱塩した。この澱粉-オサゾン溶液 (pH 7.6) に β -アミラーゼ (シグマ社製、スイートポテト由来) を 6660 ユニット (蛋白量として 6.9 mg) 添加して、40℃で 60 分間インキュベートした。マルトースの生成を TLC で確認したのち、氷冷下で析出する沈澱を遠心で除去した。この上清液を強酸性陽イオン交換樹脂 (Dowex 50 W x 2) 100ml を充填したカラムにかけ非吸着画分と洗浄画分の初流部分にマルトースが溶出されていたので集めた。分析の結果 TLC にて単一スポットの 75.7mg のマルトースを得た。収率 38.2% であった。

実施例 7

蒸留水 70 ml にコーンスターチ 30g を溶解させ、1M 塩化カルシウム 1ml を加えた。さらに α -アミラーゼ (シグマ社製、バチルス リッケニフォルミス由来) を 2400 ユニット (蛋白量として 2.4mg) を加え、85℃で 50 分間反応した。オートクレーブで反応を停止させたのち、プルラナーゼ (林原社製、クレブシラ ニューモニアエ由来) を蛋白量として 3.5mg 添加して 50℃で 20 時間インキュベートした。この澱粉液化液の 8ml に臭素 160 μ l を加え、遮光下室温で 70 時間攪拌した。空気を吹き込み臭素を除去後、水酸化ナトリウム溶液で pH 6.0 に調整して、 β -アミラーゼ (シグマ社製、スイートポテト由来) を 48 ユニット (蛋白量として 50 μ g) 添加して 40℃で 24 時間反応させた。HPLC での純度は 96% であり収率は 61% であった。

実施例 8

馬鈴薯澱粉 15gを蒸留水 135mlに懸濁し、 α -アミラーゼ（シグマ社製、バチルス リッケニフォルミス由来） $2.5\mu\text{l}$ （蛋白質質量 $75\mu\text{g}$ ，75ユニット）を加え、 85°C で 20 分間激しく攪拌した。その後オートクレーブして反応を止め冷却後、プルラナーゼ溶液（林原社製）1 ml（蛋白質質量 4.1 mg）を加え 50°C で 4時間反応させた。冷却後、臭素を 2ml加え、遮光後室温で 2日間攪拌した。空気吹き込みにより臭素を除去して水酸化ナトリウムで中和後、旭化成卓上脱塩装置マイクロアシライザー G 3（アシプレクスカートリッジ AC-220-400）を用いて 24.4 mg/ml の酸化液化澱粉液を得た。この溶液の 10ml をとり β -アミラーゼ（長瀬産業社製、大豆由来） $20\mu\text{l}$ （蛋白質質量 $185\mu\text{g}$ ）を加え、 40°C で 22 時間反応させた。旭化成卓上脱塩装置マイクロアシライザー S 1（アシプレクスカートリッジ AC-220-10）及び活性炭処理を行った後、HPLCによるマルトースの定量を行い 113mg のマルトースの生成を認めた。収率 46.3% 、純度 98.7% であった。

実施例 9

蒸留水 4mlにフジオリゴ 6・7（日本食品加工社製）200mg を溶解させ 2-アミノピリジン 3.6g，酢酸 1.6ml、メタノール 14.4mlを添加した。溶液が均一になった後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム 1.4g を加えて 75°C で75時間反応した。6N塩酸を 8ml添加後、旭化成卓上脱塩装置マイクロアシライザー G 1（アシプレクスカートリッジ AC-220-10）を用いて脱塩した。その後、強酸性陽イオン交換樹脂（Dowex 50W $\times 2$ 、 H^{+} 型）25ml のカラム

にかけ水洗後、1Nアンモニア 150ml で溶出する画分を集めて濃縮乾固させ、5ml の水に再溶解させて pH を 6.0に合わせた。参考例 1 にて示した方法で調製したマルトトリオース生成酵素を 53 ユニット（蛋白量として1.2mg）添加して40℃で 4時間インキュベートした。マルトトリオースの生成をTLCで確認後、再度上記と同様のイオン交換樹脂処理を行った。非吸着画分と洗浄画分初流を集めて再度脱塩処理を行い20mgのマルトトリオースを得た。TLC的に単一スポットでHPLC純度は89%であった。

実施例 10

蒸留水 1mlにサンオリゴ 5・6（参松工業社製）227mg を溶解させて次に 2N-水酸化ナトリウム 100 μ l、酢酸アンモニウム 1.5g を添加した。溶液が均一になったところでメタノールを加え、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 630mgを加えて室温で 62 時間反応した。6N塩酸で中和後、旭化成社製卓上脱塩装置マイクロアシライザー G 1（アシプレクスカートリッジ AC-220-10）で脱塩した。その後、強酸性陽イオン交換樹脂（Dowex 50W $\times$ 2、H⁺型）50ml に吸着させ水洗後、1Nアンモニア 300mlにて溶出する画分を集めて濃縮乾固した。これを5ml の水に再溶解させてpHを 6.0に合わせて参考例 1 にて示した方法により調製したマルトトリオース生成酵素を 53 ユニット（蛋白質量にして 1.2mg）添加して 40℃で2時間インキュベートした。マルトトリオースの生成を確認してから反応液を上記の条件と同様に樹脂処理して非吸着画分と洗浄画分初流を合わせた。これを再度脱塩処理して 55.7mg のマルトトリオースを得た。HPLCで97%の純度であった。

実施例 1 1

馬鈴薯を原料として実施例 8 に記載されているのと同様の方法で得られた還元末端酸化液化澱粉を 720mg とり 9.3ml の蒸留水に溶かし、0.5M 酢酸緩衝液 (pH 6.0、0.1M CaCl_2 を含有) 500 μl 及び参考例 2 に示した方法で調製したマルトテトラオース生成酵素 (53 ユニット/ml) 250 μl を添加して 30°C で反応させた。HPLC 分析の結果、純度は 84.8% であり収率は 45.6% であった。

実施例 1 2

サンオリゴ 5・6 (参松工業社製) 10g を蒸留水 190ml に溶解させて参考例 3 で記載の方法で調製した 5% パラジウム-カーボン触媒全量を加えて、50°C、pH は 9-10 に 10N 水酸化ナトリウムで保ちながら空気を 4l/min で吹き込みながら 13 時間攪拌した。この反応液を濾過、水洗した後、濾液を 200ml に濃縮した。pH 4.0 に調整して β -アミラーゼ (長瀬産業社製、大豆由来、500 μl 、1670 ユニット) を加え、40°C、7 時間反応させた。反応液を旭化成卓上脱塩装置マイクロアシライザー G 3 (アシプレクスカートリッジ AC-220-400) で脱塩と β -アミラーゼ切断残渣の除去を行った。HPLC 分析により 2.4g のマルトースの生成を認めた。純度は 92.5% であった。一方酸化を行わないサンオリゴ 5・6 に β -アミラーゼを作用させるとマルトースの純度は 70% であった。

実施例 1 3

臭素 88mg を 0.2N NaOH 10ml に溶解させ 10N-NaOH で pH を 13 に調整後、マルトペンタオース (生化学工業社製) 0.46g を

添加して共栓をして室温で一夜攪拌した。この反応液を電気透析（旭化成工業社製、マイクロアシライザー S 1，アシプレクスカートリッジ AC-110-10）にかけ脱塩後、0.2M酢酸緩衝液（pH 5.0）0.5ml及び実施例 12 で使用したのと同じ β -アミラーゼ 0.5ml を添加し、40℃で一夜反応した。これを HPLC により分析した結果、マルトースの純度 97.1%、生成率 36.9%（理論値 43.5%）であった。

実施例 14

コーンスターチ 4.5kg を蒸留水 10.35 リットル、1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 150ml に懸濁させ 30%（W/W）スターチミルクとし、さらに α -アミラーゼ 12ml（シグマ社製、バチルス リッケニフォルミス由来、コーンスターチ 1g 当り 80 ユニットを添加）を加え 90℃で 50 分間液化した。（この液は D. E. 値が 3.7 であった。）その後、121℃、10 分間オートクレーブ処理して α -アミラーゼを失活させた。続いて、プルラナーゼ「DE-250」天野製薬社製）320ml（コーンスターチ 1g 当り 17.78 ユニット）を加え、50-55℃で 16 時間反応させた。（この時の D. E. 値は 8.2 であった。）この反応液の 5ml をとり、さらに水 5ml を加え pH 11.1 に調整した有効塩素濃度、約 8.5-13.5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液（アンチフォルミン、半井化学社製）1.25ml を水で 2 倍に希釈して、1N NaOH 溶液で pH を 11.05-11.25、液温を 40℃に保ちながら加えた。その後、40℃で 2 時間反応させた後、亜硫酸ナトリウム 200mg を加え、5 分間攪拌した後、3N 塩酸で pH を 6.54 に調整した。この液を電気透析器（旭化成工業社製、マイクロアシライザ

ーS 1, アシプレクスカートリッジAC- 110-10) にかけた後、pHを5から6に調整して、実施例12で使したのと同じβ-アミラーゼ 0.5ml を添加して40℃で18時間反応させた。反応液中の沈澱を遠心分離で除去後、限外濾過(ミリポア社製、ウルトラフリーC3LCC) にかけるその濾液をHPLCにて分析した結果、生成したマルトースの純度95.6%、収率は67.8%であった。

実施例15

実施例14で得られた30%(W/W)のコーンスターチ液化反応液(D.E. 値は8.2)の20mlをとり、10N NaOH 0.1mlを加えpHを11.5に調整した。液温26℃、3N NaOHでpHを11.1-11.6に保ちながら有効塩素8.5-13.5%の次亜塩素酸ソーダ(アンチフォルミン、半井化学社製)4mlを除々に滴下した。その後、26℃で5時間反応させた。実施例14と同じようにβ-アミラーゼを反応させてマルトース純度99.1%の反応液を得た。収率は37.8%であった。

実施例16

実施例14で得られた30%(W/W)のコーンスターチ液化反応液(D.E. 値は8.2)の20mlをとり、10N NaOH 0.1mlを加えpHを10.7に調整した。液温40℃、10N NaOHでpHを10.7-11.4に保ちながら有効塩素8.5-13.5%の次亜塩素酸ソーダ(アンチフォルミン、半井化学社製)4mlを除々に滴下した。その後、40℃で3時間反応させた。反応後、濃塩酸でpHを5.8に合わせ実施例12で使したのと同じβ-アミラーゼ1.2mlを添加して40℃、18時間反応させマルトース純度99.3%の反応液を

得た。収率は55.7%であった。

実施例 17

実施例 14 で得られた30% (W/W) のコーンスターチ液化反応液 (D. E. 値は8.2) の20 ml をとり、10N NaOH 0.1ml を加えpHを10.7に調整した。液温40℃、10N NaOHでpHを10.7-11.4に保ちながら有効塩素8.5-13.5%の次亜塩素酸ソーダ (アンチフォルミン、半井化学社製) 4ml を除々に滴下した。その後、40℃で3時間反応させた。反応後、濃塩酸でpHを5.8に合わせ実施例 12 で使用したのと同じβ-アミラーゼ 1.2ml と実施例 12 で使用したプルラーゼ 0.1ml を同時に添加して55℃、3時間反応させマルトース純度99.0%の反応液を得た。収率は71.9%であった。

実施例 18

実施例 8 で得られた酸化液化澱粉液を凍結乾燥したものの2g をとり、適当な水溶液として陰イオン交換樹脂 (Dowex 1×2, OH⁻型) 3g に吸着させ、水で充分洗浄した。樹脂1mlあたり251mgの酸化液化澱粉が吸着された。この樹脂の1.3 mlを外とう管つきのカラム (φ9mm×12cm) につめ、5mlの水と実施例 12 で使用したのと同じβ-アミラーゼを8μl加えて40℃で5時間循環させながら反応した。反応液を採取し、HPLC分析により純度100.0%のマルトースが108mg (収率43%) 得られた。

実施例 19

実施例 17 と同様にして5%の次亜塩素酸ソーダで酸化したコーンスターチ液化物を電気透析器 (旭化成工業社製、マイクロアシラ

40

イザー S1 アシブレックスカートリッジ AC-110-10) につけ、更にイオン交換樹脂 (Dowex 1 × 2, OH⁻ 型) に充分に吸着させ、樹脂 1 ml あたり 112 mg の上記酸化物が吸着したものを得た。このものの 1 ml を、実施例 18 と同様に外とう管付のカラムにつめ、β-アミラーゼでマルトースを生産させたところ、99.6% のマルトースを 25 mg 得た。

実施例 20

実施例 8 と同様にして得られた馬鈴薯澱粉の液化酸化物を (Dowex-1 × 2, OH⁻ 型) に充分吸着させ、樹脂 1 ml あたり 233 mg の上記酸化物が吸着したものを得た。この 1 ml をとり、実施例 18 と同様に外とう管付のカラムにつめ、グルコアミラーゼ (生化学工業社製、リゾプスニベウス由来、39.4 u/mg) 1.3 mg を加え 40℃ で 16 時間循環させながら反応した。反応液を採取し、HPLC 分析により、純度 100.0% のグルコース 55 mg を得た。

実施例 21

実施例 15 で得られた高純度マルトース含有反応液 10 ml を遠心分離して得られた上澄液の 1 ml を強酸性イオン交換樹脂ダウエックス 50W × 2 (Na⁺ 型、50-100 メッシュ) のカラム (直径 1.5 cm、長さ 23.5 cm) を通過させ、続いて水で溶出した。デキストリン等の高分子化合物、β-アミラーゼ反応後切断された形で残存する還元末端の酸化された糖類および無機物は、先に溶出しマルトースと容易に分離できた。マルトース画分を減圧下に濃縮乾固し固型物中のマルトース純度が 99.3% である高純度マルトース 58 mg を得た。

請 求 の 範 囲

1. 任意の鎖長を有する糖類又はその混合物に対して、糖転移酵素を使用することなくその糖類の還元末端を修飾したのち、このものに特定の鎖長の糖鎖をエキソ型に切り出す酵素を作用させて目的とする特定の鎖長の糖類を生成させ、その後その目的とする特定の鎖長の糖類を取得することを特徴とする糖類の製造法。
2. 任意の鎖長を有する糖類が、澱粉、化工澱粉又はこれらの加水分解物である請求項1記載の糖類の製造法。
3. その糖類の還元末端を修飾する方法が、その糖類の還元末端を修飾する機能を有する化合物を作用させることである、請求項1記載の糖類の製造法。
4. その糖類の還元末端を修飾する方法が、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物の還元末端を酸化することである、請求項1記載の糖類の製造法。
5. その糖類の還元末端を修飾する方法が、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物の還元末端に置換又は無置換のアミノ基を導入することである、請求項1記載の糖類の製造法。
6. 任意の鎖長を有する糖類又はその混合物に対して、糖転移酵素を使用することなくその糖類の還元末端を修飾したのち、このものをイオン交換樹脂に吸着させ、しかる後に特定の鎖長の糖鎖をエキソ型に切り出す酵素を作用させて目的とする特定の鎖長の糖類を生成させ、その後生成した目的とする特定の鎖長の糖類をイオン交換樹脂から分離することを特徴とする糖類の製造法。
7. 任意の鎖長を有する糖類が、澱粉、化工澱粉又はこれらの加水

分解物である請求項 6 記載の糖類の製造法。

8. その糖類の還元末端を修飾する方法が、その糖類の還元末端を修飾する機能を有する化合物を作用させることである、請求項 6 記載の糖類の製造法。

9. その糖類の還元末端を修飾する方法が、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物の還元末端を酸化することである、請求項 6 記載の糖類の製造法。

10. その糖類の還元末端を修飾する方法が、任意の鎖長を有する糖類又はその混合物の還元末端に置換又は無置換のアミノ基を導入することである、請求項 6 記載の糖類の製造法。

11. その目的とする特定の鎖長の糖類を取得することが、イオン交換樹脂、電気透析器、又はこれらの組合せによってその目的とする特定の鎖長の糖類以外の糖類を除去することである、請求項 1 の糖類の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12P19/20, C12P19/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12P19/20, C12P19/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 57-48997 (Imperial Chemical Industries Ltd.), March 20, 1982 (20. 03. 82), & EP, A, 44622 & NO, A, 8102358 & BR, A, 8104434 & ZA, A, 8104472 & CA, A, 1192541 & SU, A, 1318171 & US, A, 4713118 & US, A, 4787939	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 22, 1993 (22. 02. 93)

Date of mailing of the international search report

March 23, 1993 (23. 03. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12P19/20, C12P19/22		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12P19/20, C12P19/22		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 57-48997 (インペリアル・ケミカル・イン ダストリーズ・リミテッド), 20. 3月, 1982 (20. 03. 82) &EP, A, 44622&NO, A, 8102358 &BR, A, 8104434&ZA, A, 8104472 &CA, A, 1192541&SU, A, 1318171 &US, A, 4713118&US, A, 4787939	1-11
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
22. 02. 93	23.03.93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 谷口 博 ㊟	4 B 7 4 3 2
電話番号 03-3581-1101 内線		3448