(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3630378号
(P3630378)
(45)発行日　平成17年3月16日(2005.3.16)　(24)登録日　平成16年12月24日(2004.12.24)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12P 19/44	C12P 19/44
//(C12P 19/44	C12P 19/44
C12R 1:865)	C12R 1:865

請求項の数 2　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平7-323907
(22)出願日　平成7年11月17日(1995.11.17)
(65)公開番号　特開平9-140393
(43)公開日　平成9年6月3日(1997.6.3)
審査請求日　平成13年3月30日(2001.3.30)

(73)特許権者　000226769
日新製糖株式会社
東京都中央区日本橋小網町１４番１号
(74)代理人　100094802
弁理士　佐伯　健兒
(72)発明者　玉井　智
東京都江東区豊洲４丁目９番１１号　日新製糖株式会社　研究部内
(72)発明者　中村　泰之
東京都江東区豊洲４丁目９番１１号　日新製糖株式会社　研究部内
(72)発明者　小澤　修
東京都江東区豊洲４丁目９番１１号　日新製糖株式会社　研究部内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ガラクトシルグリセロール類の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
グリセロールと一般式（βGal)n-Glc (Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、ｎ=１～３である)で示されるガラクトース化合物の混合物に、サッカロミセス属酵母存在下でβ－ガラクトシダーゼを生産する微生物菌体又はその微生物より調製されたβ－ガラクトシダーゼを作用させることにより、下記式１で示されるガラクトシルグリセロール類を製造する方法。
(βGal)n-Gly （式１）(式中Galはガラクトース残基、Glyはグリセロール、ｎ=１～２を示す。)
【請求項２】
ガラクトース化合物が、ラクトースである請求項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】
本発明は食品、化成品、飼料、医薬品等に利用可能なガラクトシルグリセロール類の製造方法に関する。ガラクトシルグリセロール類は、特に、食品、化成品、飼料分野において甘味料、甘味改善剤、保湿剤としての用途が期待される。さらにガラクトシルグリセロール類は、医薬の分野で利用可能なグリセロ糖脂質合成のための基質となりうる。このグリセロ糖脂質は、動植物から微生物に至るまで広く分布しており、グリセロ糖脂質の生理的役割を解明することは、医薬への応用につながるものである。

【０００２】
【従来の技術】
グリセロールに糖を付加させる反応としては、Ｋａｐｌｕｍ等がオルソエステルと糖のハロゲン誘導体を使って有機的に合成している例がある（Ｂｉｏｏｒｇ．Ｋｈｉｍ．，１（１１），１６７５－６（１９７５））。
しかしながら、有機的な合成は収量が低く、工業的に安価にかつ大量に製造することは困難である。また食品製造においては安全性に問題がある。
また、酵素的にガラクトースをグリセロールに転移させるものとしては、糖供与体として多糖体であるアラビノガラクタンを用いてガラクタナーゼを作用させた例がある。（特開平２－３０８７９８）。
しかしながらこの方法では、多糖体の溶解度が低く大量に使用できない、未反応の多糖体が残存し目的物の精製を困難にする等の問題がある。
またクレビジーラ・プランティコラＧ－１７のβ－ガラクトシダーゼを作用させた例もある（特開平６－３３９３７６）。
しかしながらこの方法では、酵素の温度安定性が低く、収量も数％と低い等の問題があり、ガラクトシルグリセロール類の工業的生産を実用化させる要請に応じていない。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】
本発明の解決しようとする課題は、ラクトースなどのガラクトース化合物とグリセロールから、ガラクトースの転移活性を持つβ－ガラクトシダーゼを生産する微生物又はその微生物から調製されたβ－ガラクトシダーゼとサッカロミセス属酵母とを併用して、食品、化成品、飼料、医薬品等に利用可能なガラクトシルグリセロール類を含量効率よく生産することにある。
【０００４】
【発明の実施の形態】
本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を進めた結果、グリセロールとガラクトース化合物の混合物に、サッカロミセス属酵母存在下でガラクトースの転移活性を持つβ－ガラクトシダーゼを生産する微生物菌体又はその微生物より調製されたβ－ガラクトシダーゼを作用させることにより、グリセロールに効率よくガラクトース残基を転移させることに成功し、ガラクトシルグリセロール類の製造方法を完成するに至った。
【０００５】本発明に使用できるβ－ガラクトシダーゼを生産する微生物としては、β－ガラクトシダーゼを生産する微生物であれば特に制限はないが、例えばクリプトコッカス　ローレンティ　バラエティ　ローレンティ　ＯＫＮ－４　（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｕｒｅｎｔｉｉ　ｖａｒ．ｌａｕｒｅｎｔｉｉ　ＯＫＮ－４；ＦＥＲＭ　Ｐ－７６２９）株等が挙げられる。本菌は、炭素源としてラクトースを用いた培地で培養し、得られた菌体又はポリアクリルアミド、アルギン酸カルシウム、カラギーナン等の通常の固定化法により菌体を固定化したものがガラクトシルグリセロール類の製造方法に使用できる。
【０００６】
本発明に使用できるβ－ガラクトシダーゼは、糖転移作用のあるものであればどのようなβ－ガラクトシダーゼでもよく、β－ガラクトシダーゼを生産する微生物菌体およびそれから一般的に行われる菌体破砕の方法によって調製された粗酵素や精製酵素が使用できる。β－ガラクトシダーゼ（β－ｇａｌａｃｔｏｓｉｄａｓｅ，３．２．１．２３）は、ガラクトースがβ結合したβ－ガラクトサイドを認識切断する酵素であるが、反応条件によっては糖転移反応を示すものである。例えば、クリプトコッカス　ローレンティ　バラエティ　ローレンティ　ＯＫＮ－４　（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｕｒｅｎｔｉｉ　ｖａｒ．ｌａｕｒｅｎｔｉｉ　ＯＫＮ－４；　ＦＥＲＭ　Ｐ－７６２９）　より調製されたβ－ガラクトシダーゼＡ（特公平６－２０５７、特許第１８８２１１１号）、リポマイセスに属する酵母より調製されたβ－ガラクトシダーゼ　（特開平１－１１２９７８）、ロドトルラ・ミヌタ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ　ｍｉｎｕｔａ）　ＩＦＯ８７９より調製

されたβ－ガラクトシダーゼ（特開平２－７２８９０）、バチルス　サーキュランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｉｒｃｕｌａｎｓ）　より調製されたβ－１，４　ガラクトシダーゼＩＩ（大和化成株式会社製）等が特に好適に使用できる。

【０００７】

本発明に使用できるサッカロミセス属酵母としては、反応基質であるガラクトース化合物及びグリセロール並びに目的生成物であるガラクトシルグリセロール類を消費せず、ラクトースの分解あるいはガラクトシルグリセロール類生成時に生ずる単糖類（グルコース、ガラクトース）のみをよく消費するものであればどのようなものでも良い。入手の容易性及び価格の点から、市販のパン酵母が好ましい。

サッカロミセス属酵母は、反応の基質の一つであるラクトースを用いた場合、目的物質であるガラクトシルグリセロール類を消費せず、ラクトースの分解あるいはガラクトシルグリセロール類生成時に生ずる単糖類（グルコース、ガラクトース）のみをよく消費する。このためラクトースのガラクトース残基を転移させる受容体としてはグリセロールと原料のラクトースのみとなる。またこの反応において、この一方の受容体であるラクトースにガラクトース残基が転移することによって生じた４’－ガラクトシルラクトースなどのガラクトース化合物は、この反応においてはグリセロールへのガラクトース転移反応の供与体となりうる。

このためこのサッカロミセス属酵母の併用の結果、従来の方法では達成できなかったガラクトシルグリセロール類の高収率の生産方法が完成できた。

【０００８】

本発明で使用される原料の一であるガラクトース化合物としては、グリセロールにガラクトース残基を供与できるガラクトース化合物であればどのようなものでも良いが、一般式　（βＧａｌ）ｎ－Ｇｌｃ　（Ｇａｌはガラクトース残基、Ｇｌｃはグルコース残基、ｎ＝１～３である）で表されたものが好ましい。例えば、ラクトースや４’－ガラクトシルラクトース等が好適に使用できる。

【０００９】

本発明で用いられる反応系は、本発明で用いるβ－ガラクトシダーゼを失活させず、且つサッカロミセス属酵母が生存できる温度、ｐＨであれば特に制限はない。好ましくは、反応液のｐＨを３～６に調節し、３０～６０℃で反応することが好適である。

【００１０】

また、原料の組成としては、グリセロールとラクトースが１：１０～１０：１（ｗ／ｖ）とすることが好ましい。また、ラクトースの濃度を１％～４０％（ｗ／ｖ）とすることが好適である。

【００１１】

反応は酵素液をそのままバッチ法で使用することもできるが、酵素をリサイクルするために菌体又は酵素を固定化することが望ましい。固定化方法に特別な制限はなく、アルギン酸カルシウムやカラギーナン等に包括固定化したものや、セルロースやアガロース、ポリアクリルアミドゲルなどの担体に、酵素をグルタルアルデヒド等の架橋材で処理したものや、ＤＥＡＥ－セルロースなどのイオン交換担体にイオン結合させたり、キトサンビーズなどに物理的に吸着させる方法が用いられる。

固定化担体をバッチ法に用いて生産するより、カラムに充填して連続生産する方が生産効率上望ましい。

【００１２】

本発明によれば、糖転移反応によりガラクトース残基がグリセロールに転移したガラクトシルグリセロール（Ｇａｌ－Ｇｌｙ、以下Ｇａｌはガラクトース残基、Ｇｌｙはグリセロールを示す）と、反応時間が長くなればガラクトース残基がさらに転移したジガラクトシルグリセロール（Ｇａｌ－Ｇａｌ－Ｇｌｙ）も生成される。本発明においてガラクトシルグリセロール類とはこのガラクトシルグリセロールとジガラクトシルグリセロールを示す。よって、反応終了時点（ガラクトシルグリセロール類の生成率が原料ガラストース化合物に対して３０～９９％）には、ガラクトシルグリセロール類、サッカロミセス属酵母で

完全に消費されずに残った少量のガラクトース、原料であるグリセロール、ラクトース、４’－ガラクトシルラクトースといった糖を含んだ糖液となる。

【００１３】

この糖液を脱色、脱塩、ろ過し、濃縮してシロップとしたり凍結乾燥やスプレードライで粉末として製品とすることができる。また、この糖液を活性炭カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過等で前もって処理することにより、ガラクトシルグリセロール類の含量の多い製品つくることができる。

【００１４】

以下、実施例により、本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【００１５】

【実施例】

実施例１

グリセロール１０％（Ｗ／Ｖ）、ラクトース１％（Ｗ／Ｖ）を水に溶解し１００ｍｌとし、その２ｍｌの混合液に、パン酵母０．１ｇとβ－ガラクトシダーゼ（β－ガラクトシダーゼＡ、『新規β－　ガラクトシダーゼＡ及びその製造方法（特公平６－２０５７、特許第１８８２１１１号）』に従って調製した）を２ｕｎｉｔｓ　添加し、４０℃で６時間作用させた。分析は、高速液体クロマトグラフィー（以下、ＨＰＬＣとする）により行った。ＨＰＬＣのカラムには日立化成工業株式会社製　ＧＬ－Ｃ６１０を用い、分析は、溶媒に水を用い、流速１ｍｌ／ｍｉｎ、カラム温度６０℃の条件で行った。検出にはＲＩ検出器を使用し、Ｄ－２５００　Ｃｈｒｏｍａｔｏ－Ｉｎｔｅｇｒａｔｏｒ（日立製作所）で解析した。

【００１６】

この結果、図１から理解されるように、０時間に見られる、１２．２ｍｉｎの原料であるラクトースのピークが消失し、１３．５ｍｉｎに新しいピーク（以後ピークＡと称する）が出現した。このピークＡはコントロールとして同様に分析したグルコースやガラクトースなどの単糖の溶出時間とも異なる位置に出現しており、グリセロールに糖が転移することにより生成された物質であることが推定された。

【００１７】比較例１

パン酵母を添加せず、β－ガラクトシダーゼのみで実施例１と同様に反応させて分析した。この結果を表１に示す。反応効率はパン酵母を併用することにより飛躍的に向上することが判明した。

【００１８】表１

	ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ	ﾗｸﾄｰｽ	ﾊﾟﾝ酵母	生成率
実施例１	１０％	１％	０．１ｇ	７０％
比較例１	１０％	１％	０．０ｇ	３０％

【００１９】

生成率は、原料ラクトースに対するピークＡの生成量の比率（モル比）を示す。

【００２０】

実施例２

ラクトースとグリセロールをそれぞれ１０％（Ｗ／Ｖ）　になるように水に溶解し１００ｍｌとし、そこにパン酵母５ｇとβ－ガラクトシダーゼＡを２０ｕ添加し、５０℃、２２時間反応させた。反応終了後、アニリン：酢酸＝５：２（ｖ／ｖ）に混合した溶液を１０ｍｌ添加し、８０℃、４　時間反応させ生成した還元糖のアニリン誘導体をエーテル抽出により除去した。この水相区分を活性炭カラムとＢＩＯ－ＧＥＬ　Ｐ－２ゲル濾過カラムに順次アプライし、ピークＡ　３０７ｍｇ（　純度９８．５％）を得た。

【００２１】

上述で得られたピークＡの１％水溶液１ｍｌと２Ｎ塩酸溶液１ｍｌを混合し、１時間煮沸

した。この溶液に$AgCO_3$粉末を炭酸ガスの発生がなくなるまで添加し、反応液を中和し、０．４５μｍのフィルターで濾過した。この水溶液を実施例１のＨＰＬＣで分析したところピークＡのピークが消失し、グリセロールとガラクトースが検出された（図２）。このモル比は１：１　であった。従って、ピークＡの構造はグリセロールにガラクトースが１残基結合している物質であることが判明した。

【００２２】

上述で得られたピークＡの１０ｍＭ水溶液２００μｌに各種グリコシダーゼ１０ｕを添加し、４０℃で５時間反応させた。この反応液を同様にＨＰＬＣで分析した。このようにして得られたクロマトグラムを酵素を添加しないサンプルと標準のグリセロールやガラクトース、グルコース等と比較し、ピークＡの減少とグリセロール、ガラクトースのピークの出現を調べ、分解の有無を確認した。

【００２３】

その結果を表２に示す。この結果、α－ガラクトシダーゼ、α－およびβ－グルコシダーゼは分解せず、３種のβ－ガラクトシダーゼは分解したことから、このピークＡの物質の構造は、ガラクトースがβ結合している下記式１に示されるガラクトシルグリセロールであることが判明した。

（βＧａｌ）ｎ　－Ｇｌｙ　　（式１）

（式中Ｇａｌはガラクト－　ス残基、Ｇｌｙはグリセロール、ｎ＝１～２を示す。）

【００２４】

表２

酵素名（由来）	ピークＡ
α-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ(Moritierella vinacea)	－
β-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ(A.oryzae)	＋
β-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ(E.coli)	＋
β-ｶﾞﾗｸﾄｼﾀﾞｰｾﾞ(K.lactis)	＋
α-ｸﾞﾙｺｼﾀﾞｰｾﾞ (Yeast)	－
β-ｸﾞﾙｺｼﾀﾞｰｾﾞ (Cal.saccharolyticum)	－
ｲｿﾏﾙﾀｰｾﾞ (Yeast)	－

（＋はピークＡが分解する、－はピークＡが分解しないことを示す）

【００２５】

実施例３

グリセロール１０％（Ｗ／Ｖ）、ラクトース１０％（Ｗ／Ｖ）になるように水に溶解し１００ｍｌとし、その混合液１００ｍｌに、パン酵母　２．５ｇ　とアルギン酸カルシウムによる固定化菌体（『ガラクトオリゴ糖の製造法（　特許第１６２８５２１号）』に従って調製した）を２０ｇ（１１ｕｎｉｔｓ　）添加し、４０℃で２２時間反応させた。分析は実施例１と同様にＨＰＬＣにより行った。

【００２６】

この結果、２．３４ｇのガラクトシルグリセロールが得られた。このとき、原料ラクトースに含まれるガラクトースの３１．５％がグリセロールに転移していた。

【００２７】

実施例４

グリセロール１０％（Ｗ／Ｖ）、ラクトース１～１０％（Ｗ／Ｖ）　になるように水に溶解し１００ｍｌとし、その２ｍｌの混合液に実施例１と同様にパン酵母０．１ｇとβ－ガラクトシダーゼを２ｕｎｉｔｓ添加し４０℃で６時間まで作用させた。分析はＨＰＬＣに

より行った。

【００２８】

この結果、原料ラクトースが１％および２％の時には２時間後、原料ラクトースが４％で４時間後、原料ラクトース６％では６時間後にラクトースが消失し、ガラクトシルグリセロールが生成した。この時、原料ラクトース由来のガラクトースの７０％がグリセロールに転移していた。原料ラクトースが８％及び１０％では１％の時の７倍の糖転移生成物が得られた（図３）。この時、原料ラクトースの構成糖であるガラクトースはその約５０％がグリセロールに転移していた。

【００２９】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、ガラクトシルグリセロール類を効率よく大量に提供することができる。本発明によって生産されたガラクトシルグリセロール類は食品、化成品、飼料、医薬品等に利用可能となる。特に食品、化成品、飼料分野では甘味料、甘味改善剤、保湿剤としての用途が期待される。さらに医薬の分野で利用可能なグリセロ糖脂質合成のための基質となりうる。グリセロ糖脂質は、動植物から微生物に至るまで広く分布しており、グリセロ糖脂質の生理的役割を解明することは、医薬への応用につながるものである。

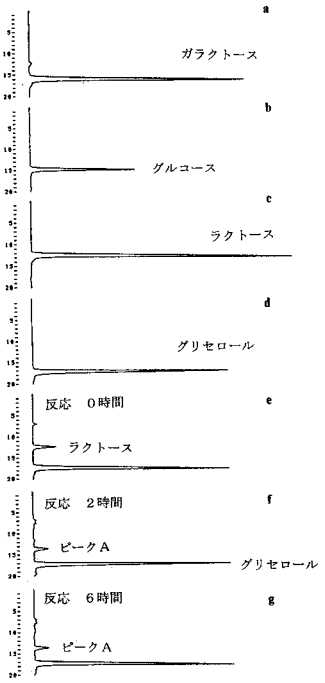
【図面の簡単な説明】

【図１】標準物質及びβ－　ガラクトシダーゼを作用させた溶液をＨＰＬＣで分析した図。図１（ａ）～（ｄ）は標準物質であるガラクトース、グルコース、ラクトース、グリセロールのクロマトグラムである。（ｅ）～（ｇ）はβ－ガラクトシダーゼを併用させた溶液の０時間、２時間、６時間後のクロマトグラムである。

【図２】ピークＡを酸加水分解し、その構成糖の種類と構成比をＨＰＬＣで分析した図。図２（ａ）はピークＡの反応前のサンプルであり、（ｂ）はピークＡの反応後のサンプルである。（ｃ）はコントロールとして、グリセロール：ガラクトース＝１：１（　各１０ｍＭ）　を同様に分析した。

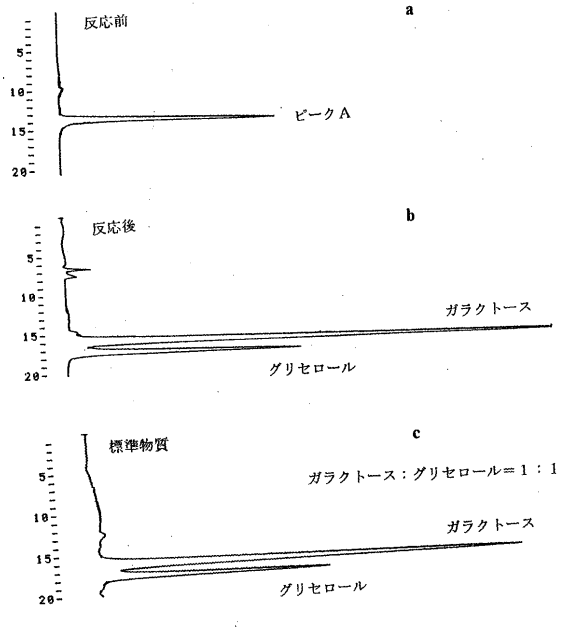
【図３】グリセロール１０％（Ｗ／Ｖ）　、ラクトース１～１０％（Ｗ／Ｖ）　の水溶液に、パン酵母とβ－ガラクトシダーゼを併用して作用させた反応液をＨＰＬＣで分析し、生成されたピークＡ（ガラクトシルグリセロール）を時間毎にプロットした図。

【図１】



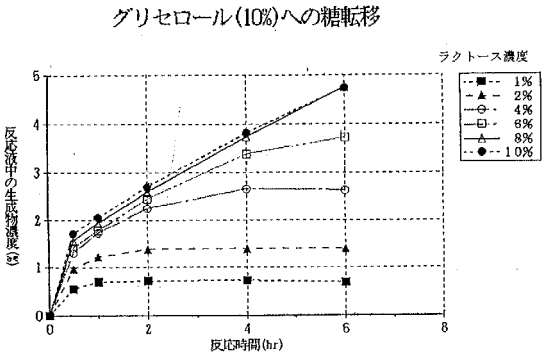
βーガラクトシダーゼＡによるガラクトシルグリセロールの合成

【図２】



酸加水分解物（ピークＡ）の高速液体クロマトグラフィーによる分析

【図３】



βーガラクトシダーゼＡによるガラクトシルグリセロールの合成

フロントページの続き

(72)発明者　出穂　義昭
東京都江東区豊洲４丁目９番１１号　日新製糖株式会社　研究部内

審査官　内藤　伸一

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12P 19/44
CA(STN)
REGISTRY(STN)
BIOSIS(DIALOG)