(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5993674号
(P5993674)
(45)発行日　平成28年9月14日(2016.9.14)　(24)登録日　平成28年8月26日(2016.8.26)

(51)Int.Cl.			F I		
C12P	19/18	(2006.01)	C12P	19/18	ZNA
C07H	3/04	(2006.01)	C07H	3/04	CSP
C12N	9/24	(2006.01)	C12N	9/24	
C12N	9/10	(2006.01)	C12N	9/10	
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 4　(全 45 頁)

(21)出願番号　特願2012-200243(P2012-200243)
(22)出願日　平成24年9月12日(2012.9.12)
(65)公開番号　特開2014-54209(P2014-54209A)
(43)公開日　平成26年3月27日(2014.3.27)
審査請求日　平成27年9月11日(2015.9.11)

(73)特許権者　397077760
株式会社林原
岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１
(72)発明者　渋谷　孝
岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１　株式会社林原内

審査官　福間　信子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】α，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
液化澱粉に、澱粉枝切酵素及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに、α－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素を作用させ、次いで、グルコアミラーゼを作用させてα，α－トレハロース含有糖液を得る工程、前記糖液から、α，α－トレハロース二含水結晶を晶析させる工程、及び、晶析したα，α－トレハロース二含水結晶を遠心分離により採取し、これを熟成、乾燥する工程を含むα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法であって、α，α－トレハロース含有糖液を得る工程において、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素、及び、パエニバチルス属微生物由来シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを用いることによりカラムクロマトグラフィーによる分画工程を経ることなく、前記糖液中のα，α－トレハロース含量を無水物換算で８６．０％超とし、且つ、前記α，α－トレハロース二含水結晶を晶析させる工程が制御冷却法又は擬似制御冷却法によって行われることを特徴とする、無水物換算でα，α－トレハロースを９８．０質量％以上含有し、粉末Ｘ線回析プロフィルに基づき算出されるα，α－トレハロース二含水結晶についての結晶化度が９０．０％以上であるα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法。
【請求項２】
前記スルフォロブス属微生物が、スルフォロブス・アシドカルダリウス又はスルフォロブス・ソルファタリカスである請求項１記載のα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末

の製造方法。
【請求項３】
前記スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素が、組換え型酵素又は変異体酵素である請求項１又は２記載のα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法。
【請求項４】
前記パエニバチルス属微生物由来シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼが、組換え型酵素又は変異体酵素である請求項１乃至３のいずれかに記載のα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、α，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法に関し、詳細には、高純度のα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末を、澱粉から一貫した工程で収率良く製造するα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法と、その製造方法によって得られるα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末に関する。
【背景技術】
【０００２】
α，α－トレハロース（以下、本明細書では「トレハロース」と略称する。）の二含水結晶含有粉末の製造方法としては、従来から種々の方法が知られている。例えば、特許文献１には、液化澱粉にβ－アミラーゼ又はβ－アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ、次いで、マルトース・トレハロース変換酵素を作用させてトレハロース含有糖液を得、これを適宜精製した後、トレハロースを晶析させてトレハロース二含水結晶含有粉末を製造する方法が開示されており、特許文献２には、液化澱粉に、澱粉枝切酵素とともに、α－グリコシルトレハロース生成酵素（別名「非還元性糖質生成酵素」）及びトレハロース遊離酵素を作用させ、さらにグルコアミラーゼを作用させて、トレハロース含有糖液を得、これを適宜精製した後、トレハロースを晶析させてトレハロース二含水結晶含有粉末を製造する方法が開示されている。
【０００３】
また、特許文献３、４には、特許文献２に開示された前記製造方法において、澱粉枝切酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（以下、「ＣＧＴａｓｅ」と略称する。）を併用し、それらとともにα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させることによって前記トレハロース含有糖液中のトレハロース含量を高めた、トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法が開示されている。さらに、特許文献５、６や非特許文献１、２には、液化澱粉に、スルフォロブス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ）属に属する微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素、又はα－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素を作用させて、トレハロース含有糖液を得る方法、さらには、このトレハロース含有糖液を適宜精製した後、トレハロースを晶析させてトレハロース二含水結晶含有粉末を製造する方法が開示されている。
【０００４】
これら公知の製造方法のうち、特許文献３、４に開示された前記各酵素の組み合わせによる場合には、液化澱粉を原料にして、カラムクロマトグラフィーによる分画工程を経ることなく、酵素反応だけでトレハロース含量が無水物換算で８０質量％を超えるトレハロース含有糖液を容易に調製することができ、しかも、斯くして調製されたトレハロース含有糖液の組成はトレハロース以外は殆どがグルコースであるので、トレハロースの晶析性が良いという利点を有している。したがって、特許文献３、４に開示された前記製造方法による場合には、前記トレハロース含有糖液からトレハロース二含水結晶を晶析させ、遠心分離によって結晶を採取する分蜜方式によって、比較的高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を収率良く製造することができる。
【０００５】

特に、特許文献３、４に開示された前記製造方法において、α－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素としてアルスロバクター（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）属に属する微生物由来の酵素を用いる場合には、アルスロバクター属に属する微生物は生育が比較的早く、また、前記酵素の生産性も高いので、トレハロース二含水結晶含有粉末を工業的規模で製造する上では極めて有利である。このため、本出願人は、現在、α－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素としてアルスロバクター属に属する微生物由来の酵素を用い、特許文献３、４に開示された前記製造方法によって、高純度トレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売、製品規格上のトレハロース純度：９８．０質量％以上。以下、「食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末」という。）を製造し、主として、食品素材、化粧品素材などとして販売している。しかし、本製造方法による場合には、酵素反応によって得られるトレハロース含有糖液中のトレハロース含量は、現在のところ、種々酵素反応の条件を最適化した場合でも、無水物換算で約８５質量％前後止まりであり、対澱粉収率は４０質量％に達しないというのが実状である。

【０００６】

一方、特許文献５、６や非特許文献１、２に開示されたスルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素を用いる方法は、酵素が耐熱性を有することから比較的高温での反応が可能であり、酵素反応中の反応液の雑菌汚染の懸念が少ないという利点はあるものの、微生物の生育が悪く、酵素の生産性が低いなどの問題点があり、トレハロースの工業的規模での製造には適していなかった。特許文献７、８にはスルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素の組換え型酵素がそれぞれ開示されており、組換え型酵素を使用することにより酵素の生産性の問題は解消する。しかしながら、スルフォロブス属微生物由来の酵素を用いるトレハロースの製造方法では、特許文献６、８、非特許文献１，２などに記載されているように、澱粉枝切酵素を併用した場合でも酵素反応によって得られるトレハロース含有糖液中のトレハロース含量は無水物換算で７５乃至８１質量％程度と低く、さらにＣＧＴａｓｅを添加して最適化した場合であっても、無水物換算で約８２質量％前後止まりであった。

【０００７】

また一方、非特許文献３、４には、スルフォロブス・ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ　ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）由来の耐熱性α－グリコシルトレハロース生成酵素、耐熱性トレハロース遊離酵素及び耐熱性イソアミラーゼの各遺伝子をそれぞれ大腸菌で発現させることにより調製した組換え酵素や、それらにさらに部位特異的変異を導入して作製した変異体酵素を組み合わせて可溶性澱粉に作用させると、トレハロース含量が無水物換算で８７質量％前後のトレハロース含有糖液が得られることが開示されている。

【０００８】

しかしながら、非特許文献３、４において原料として用いられている可溶性澱粉は、澱粉を酸処理することにより澱粉粒内の非晶質部分を除去することにより製造される非常に特殊で高価な原料であり、たとえトレハロース含量が高まった酵素反応液が得られるとしても、可溶性澱粉をトレハロース二含水結晶含有粉末の工業的生産用の原料として使用することは、コスト的にみて到底不可能である。また、非特許文献３、４に開示されている組換え酵素や変異体酵素を、可溶性澱粉ではなく、工業的規模での製造において用いられる液化澱粉に作用させた場合には、酵素反応によって得られるトレハロース含有糖液中のトレハロース含量は、当然のことながら８７質量％前後よりも低下し、８５質量％前後に止まることとなり、現行の製造方法以上にトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率を向上させることは望めない。

【０００９】

因みに、トレハロース含有糖液中のトレハロース含量を単に８６．０質量％以上に高めるのであれば、トレハロース含有糖液にカラムクロマトグラフィーを用いるカラム分画を適用してトレハロース高含有画分を採取することが考えられる。しかし、カラム分画を行

うと、工程が増える分だけ製造コストが増す上に、トレハロース高含有画分として採取される画分以外の画分に含まれるトレハロースのロスが必然的に発生するので、仮にカラム分画によって無水物換算でのトレハロース含量が８６．０質量％を超えるトレハロース含有糖液が得られたとしても、そのような糖液から晶析したトレハロース二含水結晶を採取してトレハロース二含水結晶含有粉末を製造しても、対澱粉収率が大幅に低下することは避けられない。

【００１０】

また、単に対澱粉収率を高めるだけであれば、晶析した結晶を遠心分離で採取する分蜜方式に代えて、晶析した結晶を含むマスキットを容器に取り出してその全量を結晶・固化させてこれを粉砕するか、又は、マスキットを噴霧乾燥して粉末を得る、いわゆる全糖方式を採用することも考えられる。しかし、全糖方式による場合には、晶析したトレハロースとともに、マスキットに含まれるグルコースのような製法に特有の共雑物までもが一緒に粉末化されるので、得られるトレハロース二含水結晶含有粉末中のトレハロース含量はマスキットにおけるトレハロース含量以上に高まらず、高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を得ることができないという不都合がある。

【００１１】

澱粉は、現在では、比較的豊富に存在し、安価で容易に入手し得る原料であるが、決して無尽蔵に存在する物質ではなく、一年間に地球上で人間によって生産される澱粉の総量には限りがある。その一方で、澱粉の用途は広く、従来からの工業的用途、食料用、飼料用、或いは食品原料としての用途に加えて、近年では、クリーンなエネルギー需要の隆盛から、新たにバイオエタノール等の燃料原料としても用いられるようになっている。斯かる状況下、製品、すなわち、トレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率を向上させることは、限りある資源の有効利用という点からみて極めて重要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１２】

【特許文献１】特開平７－１７０９７７号公報
【特許文献２】特開平７－２１３２８３号公報
【特許文献３】特開平８－７３５０４号公報
【特許文献４】特開２０００－２２８９８０号公報
【特許文献５】特開平８－６６１８８号公報
【特許文献６】特開平８－６６１８７号公報
【特許文献７】特開平８－８４５８６号公報
【特許文献８】特開平８－３３６３８８公報

【非特許文献】

【００１３】

【非特許文献１】カズヒサ・ムカイ（Ｋａｚｕｈｉｓａ　Ｍｕｋａｉ）ら、スターチ（Ｓｔａｒｃｈ）、１９９７年、第４９巻、２６乃至３０頁
【非特許文献２】カズオ・コバヤシ（Ｋａｚｕｏ　Ｋｏｂａｙａｓｈｉ）ら、ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｆｅｒｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ）、１９９７年、第８３巻、第３号、２９６乃至２９８頁
【非特許文献３】ファン（Ｆａｎｇ）ら、ジャーナル・オブ・アグリカルチュラル・アンド・フード・ケミストリー（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　ａｎｄ　Ｆｏｏｄ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）、２００７年、第５５巻、５５８８乃至５５９４頁
【非特許文献４】ファン（Ｆａｎｇ）ら、ジャーナル・オブ・アグリカルチュラル・アンド・フード・ケミストリー（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　ａｎｄ　Ｆｏｏｄ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）、２００８年、第５６巻、５６２８乃至５６３３頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１４】
本発明は、上記従来のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法における不都合を解消し、トレハロースの純度を保ちつつ、トレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率をより高めることを目的として為されたもので、高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を、澱粉を原料に一貫した工程で収率良く製造することを可能にするトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法と、その製造方法によって製造される新規なトレハロース二含水結晶含有粉末を提供することを課題とする。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
上記の課題を解決すべく、本発明者らは、特許文献５、６に開示された前記製造方法で用いられる複数の酵素の組み合わせについて種々検討と試行錯誤を重ねた結果、α－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素として、スルフォロブス属微生物由来の耐熱性酵素を用いる場合には、これらの酵素とともに用いるＣＧＴａｓｅとして、これまで使用していたジオバチルス・ステアロサーモフィラス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ） Ｔｃ－９１株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１２７３）由来ＣＧＴａｓｅに代えて、パエニバチルス（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ）属微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いることにより、トレハロース生成反応がより効率よく進行し、グルコアミラーゼ処理工程後のトレハロース含有糖液中のトレハロース含量を、カラムクロマトグラフィーによる分画工程を経ることなく、無水物換算で８６．０質量％を超えるレベルにまで向上させることができることを見出した。そして、このようにして得られたトレハロース含有糖液を、常法に従い、脱色、脱塩、濃縮し、トレハロース二含水結晶を晶析させ、得られる結晶を遠心分離によって採取し、これを熟成、乾燥することにより、無水物換算でトレハロースを９８．０質量％以上含有する高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を、従来よりも高い対澱粉収率で製造できることを見出して、本発明を完成した。
【００１６】
すなわち、本発明は、液化澱粉に、澱粉枝切酵素及びＣＧＴａｓｅとともに、α－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素を作用させ、次いで、グルコアミラーゼを作用させてα，α－トレハロース含有糖液を得る工程、前記糖液から、α，α－トレハロース二含水結晶を晶析させる工程、及び、晶析したトレハロース二含水結晶を遠心分離により採取し、これを熟成、乾燥する工程を含むトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法であって、トレハロース含有糖液を得る工程において、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素、及び、パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅを用いることによりカラムクロマトグラフィーによる分画工程を経ることなく、前記糖液中のトレハロース含量を無水物換算で８６．０％超とすることを特徴とする、無水物換算でトレハロースを９８．０質量％以上含有するα，α－トレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法を提供することによって、上記課題を解決するものである。
【００１７】
上記本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、本発明者らが確認したところによれば、トレハロース純度はもとより、流動性良好である点で、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて何ら遜色のない粉末であり、当該粉末は、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様に、食品素材、化粧品素材などとして広範な分野に使用することができる。
【００１８】
なお、α－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素の供給源である前記スルフォロブス属微生物としては、例えば、特許文献５乃至８、非特許文献１乃至４などに開示されたスルフォロブス・アシドカルダリウス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ）やスルフォロブス・ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）が挙げられる。

【００１９】
また、前記した理由により、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素の天然型酵素を大量に調製することは難しいことから、現実的にはこれら酵素として組換え型酵素を用いるのが好適である。さらに、これら酵素の遺伝子に常法により変異を導入した後適宜の宿主において発現させて調製した変異体酵素を用いることもできる。
【００２０】
本発明の製造方法で用いるパエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅとしては、当該微生物由来の天然型酵素や、当該微生物が有するＣＧＴａｓｅ遺伝子を常法によりクローニングし、適宜の宿主において発現させて調製した組換え型酵素、さらには、そのＣＧＴａｓｅ遺伝子に常法により変異を導入した後発現させて調製した変異体酵素を用いることもできる。
【００２１】
本発明者らは、さらに試行錯誤を重ねた結果、トレハロースを無水物換算で８６．０質量％超含有する前記トレハロース含有糖液からトレハロース二含水結晶を晶析させるに際し、後述する制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用すれば、トレハロース含有糖液の温度低下を自然に任せる自然冷却法によってトレハロース二含水結晶を晶析させる場合に比較して、得られるトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率をさらに高めることができることを見出した。すなわち、本発明は、前記本発明の製造方法において、前記トレハロース二含水結晶を晶析させる工程が、制御冷却法又は擬似制御冷却法によって行われるトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法を提供することによっても、上記の課題を解決するものである。
【００２２】
なお、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用すると対澱粉収率が向上する理由は定かではないが、制御冷却法又は擬似制御冷却法によれば、晶析の初期においては、冷却による急激な過飽和度の上昇と二次的な結晶核の形成を抑制して、大きさのほぼ揃った微小な結晶核を多数生成させ、微小な結晶核が多数出揃った晶析の後期において急速に冷却することにより、大きさの揃った多数の結晶核を一斉に成長させることになるので、微結晶が少ない粒径が揃った結晶を含むマスキットが得られ、遠心分離による結晶の採取が容易となり、比較的少量の水で採取した結晶を洗浄することができるので、洗浄時のトレハロースのロスが少なくなるためではないかと推測される。
【００２３】
加えて、本発明者らは、上記のようにしてトレハロース二含水結晶の晶析時に制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用することによって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、意外にも、自然冷却法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末や従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて、固結し難い点において優れていること見出した。そして、このような優れた物性が、トレハロース二含水結晶含有粉末におけるトレハロース純度とトレハロース二含水結晶についての結晶化度の違いによってもたらされるものであることを確認し、トレハロース二含水結晶含有粉末自体についての本発明を完成した。
【００２４】
すなわち、本発明は、トレハロース二含水結晶を晶析させるに際して前記制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用する本発明の製造方法によって得られるトレハロース二含水結晶含有粉末であって、無水物換算でトレハロースを９９．０質量％以上９９．５質量％以下含有し、粉末Ｘ線回折プロフィルに基づき算出されるトレハロース二含水結晶についての結晶化度が９０．０％以上９５．０％以下であるトレハロース二含水結晶含有粉末を提供することによって、上記の課題を解決するものである。
【００２５】
因みに、無水物換算でトレハロースを９９．０質量％以上９９．５質量％以下含有し、粉末Ｘ線回折プロフィルに基づき算出されるトレハロース二含水結晶についての結晶化度

が９０．０％以上９５．０％以下であるトレハロース二含水結晶含有粉末は、本発明者らが確認したところによれば、トレハロース含量が従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同程度かやや高い程度でありながら、トレハロース二含水結晶についての結晶化度が食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末よりも有意に高く、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末とは区別される新規な粉末である。

【００２６】

なお、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用することによって、固結し難いトレハロース二含水結晶含有粉末が得られる理由は定かではないが、制御冷却法又は擬似制御冷却法によれば、上述したとおり、微結晶が少ない粒径が揃った結晶を含むマスキットが得られるので、得られる粉末におけるトレハロースの純度とトレハロース二含水結晶についての結晶化度が高まることが作用しているのではないかと推測される。このことは、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用することによって得られる本発明のトレハロース二含水結晶含有粉末におけるトレハロース二含水結晶についての結晶化度が、自然冷却で得られた粉末や、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末におけるトレハロース二含水結晶についての結晶化度よりも有意に高いという事実によっても裏付けられる。

【発明の効果】

【００２７】

本発明の製造方法によれば、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素、及び、パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅを用い、澱粉を原料にして一貫した工程で、高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率良く製造することができる。したがって、原料である澱粉資源の有効利用に貢献するという優れた利点がもたらされる。特に、トレハロース含有糖液からトレハロース二含水結晶を晶析させるに際して、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用する場合には、製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率をより向上させることができるという利点がある。また、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用する本発明の製造方法で製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて、トレハロース純度及びトレハロース二含水結晶についての結晶化度が高く、固結し難い点において優れた粉末である。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】実質的にトレハロース二含水結晶からなるトレハロース二含水結晶含有粉末の特性Ｘ線による粉末Ｘ線回折パターンの一例である。

【図２】実質的に無定形部分からなるトレハロース粉末の特性Ｘ線による粉末Ｘ線回折パターンの一例である。

【図３】実質的にトレハロース二含水結晶からなるトレハロース二含水結晶含有粉末のシンクロトロン放射光による粉末Ｘ線回折パターンの一例である。

【図４】実質的に無定形部分からなるトレハロース粉末のシンクロトロン放射光による粉末Ｘ線回折パターンの一例である。

【図５】各種冷却パターンを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

１．用語の定義

本明細書において以下の用語は以下の意味を有している。

【００３０】

＜対澱粉収率＞

本明細書でいう「対澱粉収率」とは、原料澱粉の無水物換算での単位質量当たりの得られるトレハロース二含水結晶含有粉末の無水物換算での質量の割合を百分率（％）で表したものである。なお、本明細書では、澱粉を原料とし、これに酵素を作用させてトレハロースを生成させ、生成したトレハロースを晶析、採取、熟成、乾燥するという一連の一貫した工程で、トレハロース二含水結晶含有粉末を製造することを前提としているので、本

明細書でいう「対澱粉収率」とは、澱粉に酵素を作用させて得られるトレハロース含有糖液から最初に晶析する、いわゆる一番晶から製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率を意味しており、晶析した結晶を採取した後に残った糖液や、マスキットから分離された蜜などを糖液に戻して再度晶析させる、いわゆる二番晶以降から製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末を含めたものではない。因みに、種晶を添加して晶析させる場合、対澱粉収率の算出において種晶の量は、本明細書を通じて、得られるトレハロース二含水結晶含有粉末の量に含まれる。

【００３１】

＜ＣＧＴａｓｅ活性＞

本明細書において「ＣＧＴａｓｅ活性」は以下のように定義される。すなわち、０．３％（ｗ／ｖ）可溶性澱粉、２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）、１ｍＭ塩化カルシウムを含む基質水溶液５ｍｌに対し、適宜希釈した酵素液０．２ｍｌを加え、基質溶液を４０℃に保ちつつ、反応０分目及び反応１０分目に基質溶液を０．５ｍｌずつサンプリングし、直ちに０．０２Ｎ硫酸溶液１５ｍｌに加えて反応を停止させた後、各硫酸溶液に０．１Ｎヨウ素溶液を０．２ｍｌずつ加えて呈色させ、１０分後、吸光光度計により波長６６０ｎｍにおける吸光度をそれぞれ測定し、下記式［１］により澱粉分解活性として算出する。ＣＧＴａｓｅ活性１単位は、斯かる測定条件で、溶液中の澱粉１５ｍｇのヨウ素呈色を完全に消失させる酵素量と定義する。

【００３２】

式［１］：

【数１】

$$\text{活性（単位／ｍｌ）} = \frac{A_{660nm}^{\text{反応0分}} - A_{660nm}^{\text{反応10分}}}{A_{660nm}^{\text{反応0分}}} \times \frac{1}{0.2} \times \text{希釈倍率}$$

【００３３】

＜制御冷却法＞

本明細書でいう「制御冷却法」とは、「制御された冷却」によって結晶を晶析させる方法をいい、晶析工程として設定した作業時間を「τ」、晶析開始時の液温を「T_0」、晶析終了時の目標とする液温を「T_f」、時間「ｔ」における液温を「Ｔ」とすると、時間ｔにおける液温Ｔが原則として下記式［２］で表される冷却方法をいう。

【００３４】

式［２］：

【数２】

$$T = T_0 - (T_0 - T_f)(t / \tau)^3$$

【００３５】

制御冷却法を、晶析工程として設定する作業時間を横軸、晶析時の液温を縦軸としたグラフを用いてより具体的に（模式的に）表すならば、図５の符号ａに示すごとくである。図５の符号ａに示すとおり、制御冷却法によれば、液温が高い晶析の初期においては液温が緩やかに低下し、液温がある程度低下した晶析の後期においては液温が急速に低下することになり、ｔ＝τ／２の時点、つまり、晶析工程の中間点における液温「T_m」は、少なくとも　$T_m > [(T_0 - T_f)/2 + T_f]$　の関係（つまり、晶析工程の中間点における温度変化が総温度変化の５０％未満となる）が維持される。この液温の時間に対する変化パターンにおいて、制御冷却法は、液温がT_0からT_fまで時間τをかけて直線的に低下する直線冷却（図５における符号ｂ）や、液温が高い晶析の初期においては液温が指数関数的に急速に低下し、液温が低下した晶析の後期になるほど液温が緩やかに低下してゆく通常の自然冷却法（図５における符号ｃ）とは明らかに区別される。なお、液温Ｔ

を上記式［２］で表される時間ｔの関数として変化させるには、例えば、市販されている汎用の晶析システム用プログラム恒温循環装置などを用いれば良い。

【００３６】

晶析工程において斯かる制御冷却法を適用する場合には、トレハロースの種晶を添加した後、晶析の初期においては、液温の冷却が緩やかに行われるので、冷却による急激な過飽和度の上昇と二次的な結晶核の形成が抑制され、添加した種晶を結晶核とする結晶を優先的に成長させることができる。一方、添加した種晶を結晶核とする結晶が出揃った晶析の後期においては、液温を急速に冷却することにより、出揃った結晶を一斉に成長させることになるので、制御冷却法によれば、微結晶が少ない粒径が揃った結晶を含むマスキットが得られるという利点が得られる。なお、「制御冷却法」については、例えば、「久保田徳昭著、『分かり易いバッチ晶析』、分離技術会、平成２２年４月３０日発行、３２～４７頁」に詳述されている。

【００３７】

＜擬似制御冷却法＞

本明細書でいう「擬似制御冷却法」とは、文字どおり上記した制御冷却法に擬似した冷却法であり、液温Ｔを時間ｔに対して厳密に上記式［２］にしたがって変化させるのではなく、晶析に用いるトレハロース含有溶液におけるトレハロース純度、濃度、過飽和度、種晶の量などにもよるけれども、作業時間ｔ＝τ／２の時点（晶析工程の中間点）で結晶核がおおむね出揃うことが望ましいことから、ｔ＝τ／２の時点における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が、総温度変化量（T_0-T_f）の５％以上５０％未満、望ましくは、１０％以上３０％未満の範囲を維持するように液温Ｔを時間ｔに対して連続的又は段階的に低下させる冷却法を意味する。ｔ＝τ／２の時点における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が、総温度変化量（T_0-T_f）の５％以上５０％未満であるように液温Ｔを時間ｔに対して連続的又は段階的に低下させる場合には、液温が高い晶析の初期においては液温Ｔが時間ｔに対して緩やかに低下し、液温がある程度低下した晶析の後期においては液温Ｔが時間ｔに対して急速に低下することになり、結果として、上述した制御冷却法には及ばない場合があるものの、微結晶が少ない粒径が揃った結晶を含むマスキットが得られるという、制御冷却法とほぼ同様の利点が得られる。

【００３８】

具体的には、例えば、作業時間τを、少なくとも２つ、好ましくは３つ以上の区間に分け、晶析工程の初期の区間においては、冷却における温度勾配を緩やかに（冷却速度を遅く）し、初期乃至は中期から後期に向かうにしたがい、温度勾配を大きく（冷却速度を速く）して、ｔ＝τ／２の時点における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が総温度変化量（T_0-T_f）の５％以上５０％未満、望ましくは、１０％以上３０％未満となるように液温Ｔを時間ｔに対して連続的又は段階的に低下させれば良い。ｔ＝τ／２の時点における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が総温度変化量（T_0-T_f）の５０％以上である場合には、晶析の初期における冷却速度が早すぎて、冷却による急激な過飽和度の上昇によって二次的な結晶核が形成される恐れがあり、５％未満である場合には、晶析の初期における冷却速度が遅すぎて、添加した種晶を結晶核とする結晶が十分に出揃わないままに、急速な冷却が始まる晶析後期を迎えることになり、いずれにしても、微結晶が少ない粒径が揃った結晶を含むマスキットを得ることが困難になる。

【００３９】

上述した制御冷却法を行うには、液温Ｔを式［２］で表される時間ｔの関数として変化させる必要があり、設定したプログラムで液温を制御することのできる装置や晶析缶が必須であるが、擬似制御冷却法によれば、ｔ＝τ／２の時点における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が総温度変化量（T_0-T_f）の５％以上５０％未満、望ましくは、１０％以上３０％未満となるように液温Ｔを時間ｔに対して連続的又は段階的に低下させれば良いので、擬似制御冷却法には、液温を精密に制御する設備がない場合であっても、比較的容易に実行することができるという利点がある。

【００４０】

＜結晶化度＞

本明細書でいう「トレハロース二含水結晶についての結晶化度」とは、下記式［３］によって定義される数値を意味する。

【００４１】

式［３］：

【数３】

$$\text{結晶化度}(\%) = \frac{Hs - H_0}{H_{100} - H_0} \times 100$$

H_{100}：実質的にトレハロース二含水結晶からなるトレハロース二含水結晶含有粉末標準試料の粉末X線回折プロフィルから求めた結晶化度についての解析値

H_0：実質的に無定形部分からなるトレハロース含有粉末標準試料の粉末X線回折プロフィルから求めた結晶化度についての解析値

Hs：被験試料となるトレハロース含有粉末の粉末X線回折プロフィルから求めた結晶化度についての解析値

【００４２】

式［３］において、解析値H_{100}、H_0、Ｈｓを求める基礎となる粉末Ｘ線回折プロフィルは、通常、反射式又は透過式の光学系を備えた粉末Ｘ線回折装置により測定することができる。粉末Ｘ線回折プロフィルは被験試料又は標準試料に含まれるトレハロース二含水結晶についての回折角及び回折強度を含み、斯かる粉末Ｘ線回折プロフィルから結晶化度についての解析値を決定する方法としては、例えば、ハーマンス法、フォンク法などが挙げられる。これら解析方法のうち、ハーマンス法を用いるのが簡便さと精度の点で好適である。今日、これらの解析方法は、いずれもコンピューターソフトウェア化されていることから、斯かるコンピューターソフトウェアのいずれかが搭載された解析装置を備えた粉末Ｘ線回折装置を用いるのが好都合である。

【００４３】

また、解析値H_{100}を求める「実質的にトレハロース二含水結晶からなるトレハロース二含水結晶含有粉末標準試料」としては、トレハロースについての純度が９９．９質量％以上（以下、特にことわらない限り、本明細書では質量％を「％」と略記する。ただし、本明細書でいう結晶化度に付された％はこの限りではない。）である粉末又は単結晶であって、粉末Ｘ線回折パターンにおいて、トレハロース二含水結晶に特有な回折ピークを示し、実質的にトレハロース二含水結晶からなるものを用いる。斯かる粉末又は単結晶としては、本出願人が分析用の試薬として販売しているトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）、又はこれを再結晶化して得られるトレハロース二含水結晶含有粉末又はトレハロース二含水結晶の単結晶が挙げられる。因みに、実質的にトレハロース二含水結晶からなる上記トレハロース二含水結晶含有粉末標準試料の粉末Ｘ線回折プロフィルを、ハーマンス法によるコンピューターソフトウェアにて解析した場合の解析値H_{100}は、通常、５０．６乃至５０．９％程度となる。

【００４４】

一方、解析値H_0を求める「実質的に無定形部分からなるトレハロース含有粉末標準試料」としては、トレハロースについての純度が９９．９％以上であり、実質的に無定形部分からなるものを用いる。斯かる粉末としては、例えば、上記した解析値H_{100}を求める標準試料を適量の精製水に溶解し、濃縮した後、凍結乾燥し、さらに、カールフィッシャー法により決定される水分含量が２．０％以下となるまで真空乾燥することにより得られた粉末が挙げられる。斯かる処理を施した場合に、実質的に無定形部分からなる粉末が得られることは、経験上知られている。但し、一般に、実質的に無定形部分からなる粉末

であっても、粉末Ｘ線回折装置にかけ、得られる粉末Ｘ線回折プロフィルをハーマンス法、フォンク法などで解析すると、それら各解析法を実行するコンピューターソフトウェアのアルゴリズムに起因して無定形部分に由来する散乱光の一部が演算され、解析値が必ずしも０％になるとはかぎらない。因みに、実質的に無定形部分からなる上記トレハロース含有粉末標準試料の粉末Ｘ線回折プロフィルを、ハーマンス法によるコンピューターソフトウェアにて解析した場合の解析値H_0は、通常、８．５乃至８．７％程度となる。

【００４５】

＜平均結晶子径＞

一般に、結晶含有粉末における１個の粉末粒子は複数の単結晶、すなわち、複数の結晶子により構成されると考えられている。結晶含有粉末における結晶子の大きさ（結晶子径）は結晶含有粉末の特性に反映されると考えられる。本明細書でいう「トレハロース二含水結晶についての平均結晶子径」（以下、単に「平均結晶子径」という。）とは、トレハロース二含水結晶含有粉末を粉末Ｘ線回折分析に供し、得られた粉末Ｘ線回折パターンにおいて検出される回折ピークの内、５個の回折ピーク、すなわち、結晶子の不均一歪に起因する回折ピーク幅への影響が少ないとされる比較的低角の領域で、他の回折ピークとよく分離した、回折角（２θ）１３．７°（ミラー指数（ｈｋｌ）：１０１）、１７．５°（ミラー指数：２２０）、２１．１°（ミラー指数：２２１）、２３．９°（ミラー指数：２３１）及び２５．９°（ミラー指数：１５０）の回折ピーク（図１の符号ａ乃至ｅを参照）を選択し、それぞれの半値幅と回折角とを用い、標準品としてケイ素（米国国立標準技術研究所（ＮＩＳＴ）、Ｘ線回折用標準試料（『Ｓｉ６４０ｄ』）を用いた場合の測定値に基づき補正した後、下記式［４］に示す「シェラー（Ｓｃｈｅｒｒｅｒ）の式」によりそれぞれ算出された結晶子径の平均値を意味する。

【００４６】

式［４］：

【数４】

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

D：結晶子の大きさ（Å）
λ：Ｘ線の波長（Å）
β：回折線幅（ｒａｄ）
θ：回折角（°）
K：定数（βに半値幅（半価幅）を用いる場合０．９）

【００４７】

一般的な粉末Ｘ線回折装置には、斯かる結晶子径算出用のコンピューターソフトウェアが搭載されていることから、トレハロース二含水結晶含有粉末さえ入手できれば、当該結晶含有粉末におけるトレハロース二含水結晶の平均結晶子径は比較的容易に測定することができる。なお、被験試料は、粉末Ｘ線回折分析に先立ち、被験試料を乳鉢によりすり潰した後、５３μｍの篩によりふるい分け、篩を通過した粉末を用いる。

【００４８】

＜還元力＞

本明細書でいう「粉末全体の還元力」とは、Ｄ－グルコースを標準物質として用い、斯界において汎用されるソモジ－ネルソン法及びアンスロン硫酸法によりそれぞれＤ－グルコース換算に基づく還元糖量及び全糖量を求め、粉末に含まれる全糖量に対する還元糖量の百分率（％）を、下記式［５］を用いて計算することにより求めることができる。

【００４９】

式［５］：

【数５】

$$還元力（\%）＝\frac{還元糖量}{全糖量}\times１００$$

【００５０】
＜粒度分布＞
本明細書において、粉末の粒度分布は以下のようにして決定する。すなわち、日本工業規格（ＪＩＳ　Ｚ　８８０１－１）に準拠する、目開きが４２５、３００、２１２、１５０、１０６、７５及び５３μｍの金属製網ふるい（株式会社飯田製作所製）を正確に秤量した後、この順序で重ね合わせてロータップふるい振盪機（株式会社田中化学機械製造所製、商品名『Ｒ－１』）へ装着し、次いで、秤取した一定量の試料を最上段のふるい（目開き４２５μｍ）上に載置し、ふるいを重ね合わせた状態で１５分間振盪した後、各ふるいを再度正確に秤量し、その質量から試料を載置する前の質量を減じることによって、各ふるいによって捕集された粉末の質量を求める。その後、ふるい上に載置した試料の質量に対する、各ふるいによって捕集された各粒度を有する粉末の質量の百分率（％）を計算し、粒度分布として表す。
【００５１】
２．本発明のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法
本発明の製造方法は、基本的に以下の（１）乃至（６）の工程を含んでいる：
（１）液化澱粉溶液に、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素を、澱粉枝切酵素とパエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅとともに作用させてトレハロースを生成させるトレハロース生成工程；
（２）トレハロース生成工程により得られたトレハロースを含有する反応液にグルコアミラーゼを作用させるグルコアミラーゼ処理工程；
（３）トレハロースを含有する反応液を濾過、脱色、脱塩、濃縮する精製濃縮工程；
（４）トレハロースを含有する濃縮液にトレハロース二含水結晶の種晶を含有せしめ、トレハロース二含水結晶を晶析する工程；
（５）晶析工程において得られたマスキットから遠心分離によりトレハロース二含水結晶を採取する工程；
（６）採取したトレハロース二含水結晶を熟成、乾燥し、必要に応じて粉砕する工程。
【００５２】
以下、上記（１）乃至（６）の工程について順次説明する。
【００５３】
＜（１）の工程（トレハロース生成工程）＞
当該工程は、原料である液化澱粉に、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素と、同じくスルフォロブス属微生物由来のトレハロース遊離酵素を、澱粉枝切り酵素とパエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅとともに作用させてトレハロースを生成させる工程である。
【００５４】
α－グリコシルトレハロース生成酵素は、液化澱粉に作用して分子の末端にトレハロース構造を有するα－グリコシルトレハロースを生成する酵素であり、一方、トレハロース遊離酵素はα－グリコシルトレハロースに作用してトレハロースを遊離する酵素である。したがって、澱粉を糊化・液化して得られる液化澱粉に、澱粉枝切酵素を併用しつつα－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素を作用させれば、トレハロースを効率よく製造することができる。
【００５５】
また、本願発明の製造方法で用いるα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素の給源であるスルフォロブス属微生物としては、例えば、特許文献５、６、非特許文献１、２などに開示されたスルフォロブス・アシドカルダリウスや、スルフォロ

ブス・ソルファタリカスが挙げられ、より具体的には、スルフォロブス・アシドカルダリウス　ＡＴＣＣ３３９０９株やスルフォロブス・ソルファタリカス　ＡＴＣＣ３５０９１株が挙げられる。

【００５６】

また、本願発明の製造方法においては、スルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素としては、天然型酵素を用いることができるものの、前記した理由により天然型酵素を大量に調製することは難しいことから、これら酵素としては特許文献７及び８などに開示された組換え型酵素を用いるのが好適である。さらにはこれら酵素に部位特異的変異などを導入して改良した変異体酵素も、本願発明の目的を損なわない限り有利に用いることができる。

【００５７】

本発明でいう「組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素」又は「組換え型トレハロース遊離酵素」としては、上記スルフォロブス属微生物のα－グリコシルトレハロース生成酵素遺伝子又はトレハロース遊離酵素遺伝子をクローニングし、例えば、大腸菌、枯草菌など適宜の宿主微生物で発現させることにより得られる組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素又は組換え型トレハロース遊離酵素を好適に用いることができる。例えば、前述したスルフォロブス・アシドカルダリウス　ＡＴＣＣ３３９０９株に由来するα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素は、それぞれ特許文献７及び８に開示されているように、配列表における配列番号１及び２でそれぞれ示されるアミノ酸配列を有している。すなわち、配列表における配列番号１及び２でそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素及び組換え型トレハロース遊離酵素は、本発明の製造方法においてそれぞれの天然型酵素と同様に用いることができる。

【００５８】

本発明でいう「α－グリコシルトレハロース生成酵素の変異体酵素」としては、上記スルフォロブス属微生物由来α－グリコシルトレハロース生成酵素をコードする遺伝子に遺伝子工学的手法を適用して、α－グリコシルトレハロース生成酵素としての基質特異性や酵素活性を実質的に変更しない範囲でアミノ酸配列上１個又は２個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入変異を導入した変異体酵素を好適に用いることができる。アミノ酸配列上の変異導入箇所は、α－グリコシルトレハロース生成酵素としての基質特異性や酵素活性が実質的に保持される限り、特に限定されないものの、スルフォロブス属微生物由来α－グリコシルトレハロース生成酵素のアミノ酸配列上に共通して保存されている領域、例えば、配列表における配列番号１で示されるアミノ酸配列を用いて例示するならば、８５番目のアスパラギン酸残基から９０番目のヒスチジン残基（Ａｓｐ８５～Ｈｉｓ９０）、２２４番目のグリシン残基から２３２番目のグリシン残基（Ｇｌｙ２２４～Ｇｌｙ２３２）、２５０番目のリジン残基から２５８番目のロイシン残基（２５０Ｌｙｓ～Ｌｅｕ２５８）、４３８番目のアラニン残基から４４６番目のフェニルアラニン残基（Ａｌａ４３８～Ｐｈｅ４４６）の領域への変異導入は避けるのが望ましい。一方、非特許文献３には、スルフォロブス・ソルファタリカス由来α－グリコシルトレハロース生成酵素の４０５番目のフェニルアラニン残基を他のアミノ酸残基に置換して得た、野生型酵素の活性を２９乃至５７％保持する変異体酵素が開示されている。当該アミノ酸残基は、スルフォロブス・アシドカルダリウス由来α－グリコシルトレハロース生成酵素のアミノ酸配列、すなわち、配列表における配列番号１で示されるアミノ酸配列における３８８番目のチロシン残基に相当する。α－グリコシルトレハロース生成酵素のこれらアミノ酸残基の近傍への変異導入であれば、基質特異性や酵素活性に大きく影響を及ぼさず、逆にこれら性質が改良された酵素が得られる可能性がある。

【００５９】

本発明でいう「トレハロース遊離酵素の変異体酵素」としては、上記と同様に、スルフォロブス属微生物由来トレハロース遊離酵素をコードする遺伝子に遺伝子工学的手法を適用して、トレハロース遊離酵素としての基質特異性や酵素活性を実質的に変更しない範囲

でアミノ酸配列上１個又は２個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入変異を導入した変異体酵素を好適に用いることができる。アミノ酸配列上の変異導入箇所は、トレハロース遊離酵素としての基質特異性や酵素活性が実質的に保持される限り特に限定されない。

【００６０】

本発明の製造方法においては、澱粉枝切酵素として、斯界で汎用されているイソアミラーゼ又はプルラナーゼを用いることができる。市販の酵素剤を用いても、微生物から単離したものを用いてもよい。イソアミラーゼとしては、例えば、シュードモナス・アミロデラモサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｍｙｌｏｄｅｒａｍｏｓａ）由来及びマイロイデス・オドラタス（Ｍｙｒｏｉｄｅｓ　ｏｄｏｒａｔｕｓ）由来のものがよく知られており、とりわけ、シュードモナス・アミロデラモサ由来のイソアミラーゼ剤（株式会社林原製）が好適である。プルラナーゼ剤としては、例えば、クレブシェラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）由来のプルラナーゼ（株式会社林原販売）、バチルス・アミロプルリティカス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｐｕｌｌｕｌｙｔｉｃｕｓ）由来のプルラナーゼ（商品名『プロモザイム』、ノボザイムズ・ジャパン株式会社販売）などが挙げられる。

【００６１】

上記トレハロース生成工程におけるＣＧＴａｓｅの役割は、主としてα－グリコシルトレハロース生成酵素及びトレハロース遊離酵素によるトレハロース生成反応の過程で必然的に生成するグルコース重合度４以下のマルトオリゴ糖を、ＣＧＴａｓｅが触媒する不均化反応（直鎖糖分子間転移反応、Ｄｉｓｐｒｏｐｏｒｔｉｏｎａｔｉｏｎ）によって、グルコース重合度５以上のマルトオリゴ糖に変換することにより、上記トレハロース生成反応をさらに進行させて、反応液中のトレハロース含量をより高めることにある。

【００６２】

なお、ＣＧＴａｓｅは、従来より種々の微生物から単離されており、その作用、理化学的性質などが明らかにされている（『工業用糖質酵素ハンドブック』、講談社サイエンティフィク社編集、講談社発行、２８乃至３２頁（１９９９年）などを参照）。また、上記ＣＧＴａｓｅの内のいくつかについてはその遺伝子がクローニングされ、遺伝子の塩基配列からアミノ酸配列が決定されており、そのＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列上にはα－アミラーゼファミリーに分類される酵素群に共通して存在するとされる４つの保存領域が存在することも知られている。さらに、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス由来のＣＧＴａｓｅ蛋白については、Ｘ線結晶構造解析によってその立体構造が既に明らかにされており、当該ＣＧＴａｓｅの３つの触媒残基、すなわち、配列表における配列番号４で示されるアミノ酸配列における２２５番目のアスパラギン酸残基（Ｄ２２５）、２５３番目のグルタミン酸残基（Ｅ２５３）、３２４番目のアスパラギン酸残基（Ｄ３２４）も判明している（『工業用糖質酵素ハンドブック』、講談社サイエンティフィク社編集、講談社発行、５６乃至６３頁（１９９９年）参照）。

【００６３】

本発明の製造方法においては、ＣＧＴａｓｅとして、パエニバチルス属微生物由来の天然型若しくは組換え型ＣＧＴａｓｅ又はそれらの変異体酵素が好適に用いられる。本発明でいう「パエニバチルス属属微生物由来の天然型ＣＧＴａｓｅ」としては、例えば、パエニバチルス・イリノイセンシス、パエニバチルス・パブリ、パエニバチルス・アミロリティカスなどの公知菌株に由来するＣＧＴａｓｅや、自然界から単離したパエニバチルス属微生物に由来するＣＧＴａｓｅが使用できる。より具体的には、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５９５９株、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株、パエニバチルス・パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株、及び、パエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株にそれぞれ由来するＣＧＴａｓｅや、これらパエニバチルス属微生物に対し、斯界において慣用される、例えば、紫外線照射、化学物質による変異処理などにより突然変異を導入することにより取得した酵素高産生変異株由来のＣＧＴａｓｅがより好適に利用できる。さらに、パエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅとしては、例えば、パエニバチルス・エスピー（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ

．）由来ＣＧＴａｓｅ（商品名『アルカリＣＤアミラーゼ』、ナガセケムテックス株式会社製）も使用することができる。因みに、食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造において従来から用いられているＣＧＴａｓｅは、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来のＣＧＴａｓｅである。

【００６４】

また、本発明において用いるＣＧＴａｓｅとしては、下記（ａ）乃至（ｄ）に示す部分アミノ酸配列を有するＣＧＴａｓｅが好適に用いられる。

（ａ）Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－$Ｘ_{1}$－Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ；

（ｂ）Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ａｓｎ；

（ｃ）Ｌｙｓ－Ｍｅｔ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ；

（ｄ）Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｓｎ－$Ｘ_{2}$－Ｔｙｒ；

（但し、$Ｘ_{1}$はＡｌａ又はＳｅｒを、$Ｘ_{2}$はＡｌａ又はＴｈｒをそれぞれ意味する。）

上記部分アミノ酸配列は、パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅに特有の特徴的なアミノ酸配列である。

【００６５】

また、本発明でいう「パエニバチルス属微生物由来の組換え型ＣＧＴａｓｅ」としては、上記パエニバチルス属微生物のＣＧＴａｓｅ遺伝子をクローニングし、例えば、大腸菌、枯草菌など適宜の宿主微生物で発現させることにより得られる組換え型ＣＧＴａｓｅを好適に用いることができる。なお、前述したパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株、パエニバチルス・パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株、及び、パエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株にそれぞれ由来するＣＧＴａｓｅは、出願人が独自にこれら微生物からＣＧＴａｓｅ遺伝子をクローニングし、遺伝子の塩基配列を決定したところ、配列表における配列番号１、２及び３でそれぞれ示されるアミノ酸配列を有していることが判明した。上記パエニバチルス属微生物のＣＧＴａｓｅ遺伝子を大腸菌で発現させて得られる組換え型ＣＧＴａｓｅ、すなわち、配列表における配列番号１、２又は３で示されるアミノ酸配列を有する組換え型ＣＧＴａｓｅは、本発明の製造方法において同様に用いることができる。

【００６６】

本発明でいう「パエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅの変異体酵素」（以下、「変異体ＣＧＴａｓｅ」と略称する。）としては、上記パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅをコードする遺伝子に遺伝子工学的手法を適用して、ＣＧＴａｓｅとしての基質特異性や酵素活性を実質的に変更しない範囲でアミノ酸配列上１個又は２個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入変異を導入した変異体ＣＧＴａｓｅを好適に用いることができる。アミノ酸配列上の変異導入箇所は、ＣＧＴａｓｅとしての基質特異性や酵素活性が実質的に保持される限り、特に限定されないものの、ＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列上に存在するα－アミラーゼファミリーに属する酵素群に共通して保存される４つの領域や、パエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅに特有の、前述した（ａ）乃至（ｄ）の部分アミノ酸配列への変異導入は避けるのが望ましい。

【００６７】

本発明の製造方法において好適に用いることのできる、「パエニバチルス属微生物由来の天然型若しくは組換え型ＣＧＴａｓｅ又はそれらの変異体酵素」のさらに具体的な例としては、上述した配列表における配列番号３、４及び５でそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するＣＧＴａｓｅや、実施例において後述したパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株のＣＧＴａｓｅ遺伝子に部位特異的変異を導入することにより作製した、配列表における配列番号１４又は１５で示されるアミノ酸配列を有する変異体ＣＧＴａｓｅが挙げられる。

【００６８】

トレハロースの製造に用いる原料澱粉は、トウモロコシ澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよく、また、これら澱粉を酸又はアミラーゼで部分分解して得られる澱粉部分分解物であっ

てもよい。原料澱粉は、通常、水に懸濁して濃度約１０乃至５０％の澱粉乳とし、耐熱性α－アミラーゼの存在下で加熱することにより糊化・液化される。液化澱粉の液化の程度はデキストロース・エクイバレント（ＤＥ）として、通常、１０未満、詳細には、５未満に調整する。

【００６９】

本発明の製造方法においては、好適には、原料である液化澱粉（ｐＨ約４乃至１０）を基質とし、これに上述したスルフォロブス属微生物由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素を基質固形物１グラム当たり１乃至２０単位、同じく上述したスルフォロブス属微生物由来のトレハロース遊離酵素を５乃至５０単位、さらに、澱粉枝切酵素を１００乃至２，０００単位、及び、上述したパエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅを１乃至５０単位添加し、使用した酵素が失活しない温度範囲、通常、３０乃至７０℃で１０乃至１００時間反応させる。反応終了時の反応液のトレハロース含量は、通常、無水物換算で、８６％前後となる。

【００７０】

＜（２）の工程（グルコアミラーゼ処理工程）＞

この工程は、（１）のトレハロース生成工程で得られた反応液に、さらにグルコアミラーゼ剤を作用させ、無水物換算でのトレハロース含量を高める工程である。すなわち、トレハロース生成工程により得られる反応液には、トレハロースとともに、Ｄ－グルコース、マルトース、グルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖、α－グルコシルトレハロース、及びα－マルトシルトレハロースなどの糖質が含まれているので、この反応液にグルコアミラーゼを作用させることにより、マルトースとグルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖をＤ－グルコースにまで分解するとともに、α－グルコシルトレハロースやα－マルトシルトレハロースなどのα－グリコシルトレハロースをＤ－グルコースとトレハロースにまで分解することによって、反応液中のトレハロース純度、つまりは無水物換算でのトレハロース含量を高めることができる。

【００７１】

本発明の製造方法において、用いるグルコアミラーゼとしては、マルトースとグルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖をＤ－グルコースにまで分解でき、また、α－グルコシルトレハロースやα－マルトシルトレハロースなどのα－グリコシルトレハロースをＤ－グルコースとトレハロースにまで分解できる限り、その起源や由来に特段の制限はない。市販のグルコアミラーゼ剤、例えば、天野エンザイム株式会社販売、商品名『グルクザイムＡＦ６』や、ナガセケムテックス株式会社販売、商品名『グルコチーム』などを好適に用いることができる。

【００７２】

なお、グルコアミラーゼ処理後の反応液、すなわちトレハロース含有糖液中のトレハロース含量は、通常、無水物換算で８６．０％を超え、好ましくは８７．０％以上となる。因みに、パエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅではなく、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来ＣＧＴａｓｅを用いる場合には、グルコアミラーゼ処理後のトレハロース含有糖液中のトレハロース含量は無水物換算で８３．０％程度に止まり、８６．０％以上となることはない。

【００７３】

＜（３）の工程（精製濃縮工程）＞

この工程は、グルコアミラーゼ処理を終えて無水物換算でのトレハロース含量が高められたトレハロース含有糖液に、常法により、濾過、遠心分離などを施して不溶物を除去し、活性炭で脱色し、カチオン交換樹脂（H^+型）、アニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩するとともに、晶析に適した濃度まで濃縮する工程である。反応液中の無水物換算でのトレハロース含量は、（２）のグルコアミラーゼ処理工程によって既に８６．０％以上にまで高められているので、（３）の精製濃縮工程においては、カラムクロマトグラフィーによる分画工程などのトレハロース含量をさらに高める工程は不要である。

【００７４】

＜（４）の工程（晶析工程）＞

この工程は、上記（１）乃至（３）の工程を経て得られたトレハロース含有糖液から、トレハロース二含水結晶の種晶の存在下、トレハロース二含水結晶を晶析させる工程である。すなわち、無水物換算でのトレハロース含量が所定のレベルにまで高められた糖液を、通常、トレハロースについての過飽和度を１．０５乃至１．５０の範囲になるように調節した後、言い換えれば、トレハロース濃度を約６０乃至８５％、液温を約４０乃至８０℃に調節した後、助晶缶に移し、次いで、トレハロース二含水結晶の種晶を助晶缶中の濃縮糖液体積に対して、通常、０．１乃至５％（ｗ／ｖ）、詳細には、０．５乃至２％（ｗ／ｖ）含有せしめ、緩やかに撹拌しつつ、３乃至４８時間かけて液温を５乃至６０℃まで自然冷却することによりトレハロース二含水結晶の晶析を促す。なお、助晶缶内等に既にトレハロース二含水結晶の種晶が存在する場合には、トレハロース二含水結晶の種晶は特段添加する必要はない。作業効率の点で、濃縮液からのトレハロース二含水結晶の晶析は、通常、種晶の存在下で行われる。

【００７５】

晶析工程においては、上記の自然冷却法に代えて、制御冷却法又は擬似制御冷却法を用いることも有利に実施できる。晶析を制御冷却法又は擬似制御冷却法によって行う場合には、上記（３）の工程を経て所定の温度に調整したトレハロース含有糖液を、助晶缶に移し、次いで、トレハロース二含水結晶の種晶を助晶缶中の濃縮糖液体積に対して、通常、０．１乃至５％（ｗ／ｖ）、詳細には、０．５乃至２％（ｗ／ｖ）含有せしめ、緩やかに撹拌しつつ、冷却を制御することによって、晶析工程の初期は液温をゆるやかに低下させ、冷却工程の後期においては液温を急速に低下させ助晶する。晶析に要する時間はトレハロース二含水結晶の種晶の添加量によっても異なるものの、例えば、擬似制御冷却法による場合には、全冷却時間を少なくとも２つ、好ましくは３つ以上の区間に分け、各区間内では時間に対して温度を概ね直線的に低下させ、作業時間ｔ＝τ／２の時点（晶析工程の中間点）における液温Ｔの変化量（T_0-T_m）が、総温度変化量（T_0-T_f）の５％以上５０％未満、望ましくは、１０％以上３０％未満の範囲を維持するように液温Ｔを時間ｔに対して連続的又は段階的に低下させるのが良い。例えば、１０時間かけて液温を６０℃から２０℃まで冷却して結晶を晶析させる場合には、冷却時間を６時間と４時間の２つの区間に分け、液温を６０℃から５０℃まで６時間かけて冷却し、次いで、５０℃から２０℃まで４時間かけて冷却するか、又は、冷却時間を７時間と３時間の２つの区間に分け、液温を６０℃から４５℃まで７時間かけて冷却し、次いで、４５℃から２０℃まで３時間かけて冷却するのが好ましく、さらに好ましくは、冷却時間を４時間、３時間、３時間の３つの区間に分け、最初の区間では４時間かけて液温を６０℃から５５℃まで冷却し、次の区間では３時間かけて５５℃から５０℃まで冷却し、さらに、最後の区間では３時間かけて液温を５０℃から２０℃まで冷却するのが好ましい。

【００７６】

このように、制御冷却法又は擬似制御冷却法による場合には、温度制御を行うことなく自然冷却する晶析法に比べ、トレハロース二含水結晶の微結晶が生じ難く、粒径の揃った結晶を含むマスキットを得ることができ、また結果として、自然冷却法による場合よりも、得られるトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率をより高めることができる。また、後述するとおり、得られるトレハロース二含水結晶粉末は、自然冷却法で得られる粉末に比べ、トレハロース純度、及び固結性の重要な指標となるトレハロース二含水結晶についての結晶化度の点でも高いという特徴を備えている。また、制御冷却法又は擬似制御冷却法による場合には、自然冷却する晶析法によって得られる粉末に比べて、より粒度分布の揃った粉末が得られるという利点がある。

【００７７】

＜（５）の工程（採取工程）＞

この工程は、（４）の晶析工程で得られたマスキットから、常法の分蜜方式に従い、トレハロース二含水結晶を遠心分離により採取する工程である。採取されたトレハロース二含水結晶は、表面に付着している非晶質の蜜を除去するため、少量の精製水をスプレー（

シャワー）して洗浄される。なお、結晶の洗浄に用いる精製水の量は、通常、遠心分離前のマスキットの重量に対して、３％以上、１０％までとするのが好ましい。すなわち、洗浄に用いられる精製水の量が３％未満では、洗浄が十分に行われず、非晶質の蜜が残り、所期のトレハロース純度が得られない恐れがある。一方、洗浄に用いられる精製水の量が１０％を超えると、洗浄によって溶解、除去されるトレハロース二含水結晶の量が増し、対澱粉収率が低下する恐れがある。

【００７８】

＜（６）の工程（熟成、乾燥工程）＞

この工程は、採取されたトレハロース二含水結晶を、所定の温度及び湿度雰囲気中に一定時間保持し、結晶を熟成させるとともに熱風乾燥して、トレハロース二含水結晶含有粉末を得る工程である。熟成及び乾燥工程における結晶の品温や雰囲気の相対湿度、並びに保持時間は、所期の粉末が得られる限り、特段の制限はないが、熟成、乾燥工程において、結晶はその品温が２０乃至５５℃、雰囲気の相対湿度は６０乃至９０％に保たれるのが好ましく、熟成、乾燥時間は約５乃至２４時間とするのが好ましい。熟成、乾燥工程を経た粉末は、次いで、室温まで自然放冷される。また、室温程度の清浄な空気を吹き付けて室温程度の品温にまで強制冷却することも有利に実施できる。得られた結晶粉末はそのまま、若しくは、必要に応じて粉砕して製品とされる。

【００７９】

本発明のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法によれば、酵素反応によって無水物換算で８６．０％超という高いトレハロース含量のトレハロース含有糖液を得ることができるので、カラムクロマトグラフィーによる分画工程が不要であり、分画によるトレハロースのロスがなく、トレハロース二含水結晶含有粉末を高い対澱粉収率で得ることができる。また、晶析した結晶を含むマスキット全体を晶析、固化又は噴霧乾燥する全糖方式ではなく、晶析した結晶を遠心分離して不純物を含む蜜を除去する分蜜方式を採用しているので、得られるトレハロース二含水結晶含有粉末中のトレハロース含量を容易に９８．０％以上に高め、高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を製造することができる。

【００８０】

斯くして製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、晶析が自然冷却によって行われた場合には、保存時の固結性などの物性において、従来の食品級のトレハロース含有粉末とほぼ同等の粉末であり、通常、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が粉末全体の７０％以上を占め、且つ、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子を粉末全体の５０％以上含むトレハロース二含水結晶含有粉末である。また、晶析が制御冷却法又は擬似制御冷却法によって行われた場合には、本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、従来の食品級のトレハロース含有粉末よりも有意に固結し難い粉末であり、通常、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が粉末全体の８０％以上を占め、且つ、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子を粉末全体の６０％以上含むトレハロース二含水結晶含有粉末である。また、本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、通常、前記式［６］で求められる粉末全体の還元力が０．５％以下であり、食品や医薬品等に配合しても、褐変による変色の恐れがない優れた粉末である。

【００８１】

したがって、本発明の製造方法によって製造される粉末は、そのままで、或いは粒度を適宜調整して、粉末状の食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、又は医薬品素材などとして使用することができる。特に、晶析に際して制御冷却法を適用する本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、上述したとおり、従来の食品級のトレハロース含有粉末よりも有意に固結し難い粉末であり、従来未知の全く新規なトレハロース二含水結晶含有粉末であると言える。当該粉末は、粉末原料を取り扱うことを前提に設計された製造プラントを用いる食品製造、化粧品製造、医薬部外品製造、さらには医薬品製造の各分野において、他の単独若しくは複数の粉末状の食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、医薬品素材などに安心して含有せしめることができるという優れた利点を備えている。

【００８２】
以下、本発明のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法について、実験により具体的に説明する。
【００８３】
＜実験１：ＣＧＴａｓｅの由来が酵素反応液におけるトレハロース含量に及ぼす影響＞
液化澱粉に、スルフォロブス属微生物由来の組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素と、同じくスルフォロブス属微生物由来の組換え型トレハロース遊離酵素を、澱粉枝切酵素及びＣＧＴａｓｅとともに作用させ、次いで、グルコアミラーゼを作用させる酵素反応によってトレハロースを生成させる酵素反応系において、使用するＣＧＴａｓｅの由来が、酵素反応で得られる糖液中のトレハロース含量にどのような影響を及ぼすかを調べるべく、以下の実験を行った。
【００８４】
＜実験１－１：スルフォロブス属微生物由来の組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素と組換え型トレハロース遊離酵素の調製＞
特許文献７（特開平８－８４５８６号公報）の実施例Ａ－２（ｂ）に記載された方法により、スルフォロブス・アシドカルダリウス　ＡＴＣＣ３３９０９株由来のα－グリコシルトレハロース生成酵素遺伝子を含む組換えＤＮＡ、ｐＳＴ３６を保持する組換え大腸菌ＳＴ３６を培養し、同明細書実験例１の方法により組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素を精製して１ｍｌ当たり約２１０単位含む精製酵素液約３，８００ｍｌを得た。また、特許文献８（特開平８－３３６３８８公報）の実施例Ａ－２（ｂ）に記載された方法により、スルフォロブス・アシドカルダリウス　ＡＴＣＣ３３９０９株由来のトレハロース遊離酵素遺伝子を含む組換えＤＮＡ、ｐＳＵ１９を保持する組換え大腸菌ＳＵ１９を培養し、同明細書実験例１の方法により組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素を精製して１ｍｌ当たり約２，９００単位含む精製酵素液約２，０５０ｍｌを得た。なお、α－グリコシルトレハロース生成酵素とトレハロース遊離酵素の活性は上記特許文献５（特開平８－６６１８８号公報）及び６（特開平８－６６１８７号公報）に開示された方法に準じて測定した。
【００８５】
＜実験１－２：各種微生物由来ＣＧＴａｓｅ＞
各種微生物由来のＣＧＴａｓｅとして、以下のＣＧＴａｓｅを用いた。すなわち、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来のＣＧＴａｓｅとしては、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス　Ｔｃ－９１株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１２７３）由来のＣＧＴａｓｅ（株式会社林原製）を、バチルス・マセランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍａｃｅｒａｎｓ）由来のＣＧＴａｓｅとしては、市販のＣＧＴａｓｅ（商品名『コンチザイム』、天野エンザイム株式会社販売）を、サーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス（Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏｓｕｌｆｕｒｉｇｅｎｅｓ）由来のＣＧＴａｓｅとしては、市販のＣＧＴａｓｅ（商品名『トルザイム』、ノボザイムズ・ジャパン株式会社販売）を用いた。
【００８６】
また、パエニバチルス属微生物由来のＣＧＴａｓｅとして、以下のＣＧＴａｓｅを調製した。すなわち、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５９５９株、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株、パエニバチルス・パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株、及び、パエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株をそれぞれ、デキストリン２％、塩化アンモニウム０．５％、リン酸水素カリウム０．０５％、硫酸マグネシウム０．０２５％及び炭酸カルシウム０．５％を含む液体培地で２７℃、３日間培養し、培養液を遠心分離して得たそれぞれの遠心上清を常法に従い硫安塩析、透析することにより各微生物由来のＣＧＴａｓｅの粗酵素液を得た。得られたＣＧＴａｓｅ粗酵素液を、それぞれＤＥＡＥ－トヨパール　６５０Ｓゲル（東ソー株式会社製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー及びブチル－トヨパール　６５０Ｍゲル（東ソー株式会社製）を用いた疎水カラムクロマトグラフィーに供して精製し、部分精製ＣＧＴａ

ｓｅをそれぞれ調製した。なお、各菌株由来のＣＧＴａｓｅの活性は、前記した方法に従い測定し、式［１］を用いて算出した。

【００８７】

＜実験１－３：トレハロース生成反応＞

トウモロコシ澱粉を濃度３０％となるように水に懸濁し、この懸濁液に炭酸カルシウムを０．１％加えた。当該懸濁液のｐＨを６．０に調整した後、澱粉固形物当たり０．２％の耐熱性α－アミラーゼ剤（商品名『ターマミル６０Ｌ』、ノボザイムズ・ジャパン株式会社販売）を加え、９５℃で１５分間反応させて澱粉を糊化・液化した。得られた液化澱粉溶液を１２０℃で３０分間オートクレーブした後、５７℃に冷却し、ｐＨ５．５に調整した後、同温度で維持しつつ、澱粉固形物１グラム当たり、１０単位の組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素、４０単位の組換え型トレハロース遊離酵素、１，５００単位のイソアミラーゼ剤（株式会社林原製）、及び、実験１－２に記載したＣＧＴａｓｅ又は実験１－２で調製したＣＧＴａｓｅのいずれかを１５単位加え、４８時間反応させた。得られた反応物を９７℃で３０分間加熱してそれぞれ酵素を失活させた後、ｐＨ４．５に調整し、澱粉固形物１グラム当たり１０単位のグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム＃２００００』、ナガセケムテックス株式会社製）を加えて２４時間反応させた。斯くして得た反応液を９５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、以下に記す反応液中のトレハロース含量の測定に供した。なお、ＣＧＴａｓｅを添加しない以外は同一条件で酵素反応を行って得た反応液を対照とした。

【００８８】

＜実験１－４：反応液中のトレハロース含量の測定＞

実験１－３で得た反応液をそれぞれ表１に示す反応液１乃至８とし、トレハロース含量を以下のようにして求めた。すなわち、反応液１乃至８をそれぞれ精製水により１％溶液とし、０．４５μｍメンブランフィルターにより濾過した後、下記条件によるＨＰＬＣ分析に供し、示差屈折計によるクロマトグラムに出現したピークの面積から反応液のトレハロース含量を計算し、無水物換算した。結果を表１に示す。なお、表１に示す反応液中のトレハロース含量は、各ＣＧＴａｓｅについて同一の条件でトレハロース生成反応及びグルコアミラーゼ処理を５回繰り返した場合にも、若干のばらつきの範囲内で再現性よく得られる値である。

・分析条件

ＨＰＬＣ装置：『ＬＣ－１０ＡＤ』（株式会社島津製作所製）
デガッサー：『ＤＧＵ－１２ＡＭ』（株式会社島津製作所製）
カラム：『ＭＣＩ　ＧＥＬ　ＣＫ０４ＳＳ』（三菱化学株式会社製）
サンプル注入量：２０μｌ
溶離液：精製水
流　速：０．４ｍｌ／分
温　度：８５℃
示差屈折計：『ＲＩＤ－１０Ａ』（株式会社島津製作所製）
データ処理装置：『クロマトパックＣ－Ｒ７Ａ』（株式会社島津製作所製）

【００８９】

【表１】

反応液	CGTaseの由来	グルコアミラーゼ処理後の反応液におけるトレハロース含量（質量%、無水物換算）
1	対照（CGTase無添加）	77.1
2	ジオバチルス・ステアロサーモフィラス Tc－91	82.5
3	バチルス・マセランス	81.2
4	サーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス	80.6
5	パエニバチルス・イリノイセンシス NRBC15959	86.8
6	パエニバチルス・イリノイセンシス NRBC15379	86.5
7	パエニバチルス・パブリ NRBC13638	86.3
8	パエニバチルス・アミロリティカス NRBC15957	86.1

【００９０】
表１に示すとおり、組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素、組換え型トレハロース遊離酵素、及び、澱粉枝切酵素（イソアミラーゼ）の組合せ（反応液１、対照）ではグルコアミラーゼ処理後の反応液中のトレハロース含量は７７．１％に止まるところ、従来からトレハロースの生成に用いられているジオバチルス・ステアロサーモフィルス由来ＣＧＴａｓｅを添加すると８２．５％（反応液２）まで増加し、ＣＧＴａｓｅの併用によるトレハロースの増収効果が認められた。一方、バチルス・マセランス由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（反応液３）には８１．２％、また、サーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（反応液４）には８０．６％となり、従来からトレハロースの生成に用いられているジオバチルス・ステアロサーモフィラスＴｃ－９１株由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（反応液２）よりも低い値となった。
【００９１】
これに対し、パエニバチルス属に属する微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（反応液５乃至８）には、いずれも、グルコアミラーゼ処理後のトレハロース含量は無水物換算で８６．０％を上回り、従来からトレハロースの生成に用いられているジオバチルス・ステアロサーモフィラス　Ｔｃ－９１株由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（反応液２）よりも約４％増加した。特に、ＣＧＴａｓｅとして、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５９５９株由来（反応液５）、及び、パエニバチルス・イリノイセンシスＮＢＲＣ１５３７９株由来（反応液６）の各ＣＧＴａｓｅを用いた場合には、トレハロース含量は８６．０乃至８７．０％まで上昇することが判明した。今回の実験においては、パエニバチルス・イリノイセンシス由来のＣＧＴａｓｅが最も好ましいことが判明した。
【００９２】
＜実験２：トレハロース含量が異なる各糖液から製造したトレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース純度、対澱粉収率、及び物性＞
【００９３】
＜実験２－１：被験試料の調製＞
＜被験試料１乃至８＞
実験１で得たトレハロース含量が異なる反応液１乃至８のそれぞれを、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、固形物濃度約６０％まで濃

縮して、反応液１乃至８のそれぞれに対応して、トレハロース含有糖液１乃至８（トレハロースを無水物換算で７７．１乃至８６．８％含有）を得た。

【００９４】

上記トレハロース含有糖液１乃至８を、それぞれ減圧下で固形物濃度約８５％にまで濃縮し、助晶缶にとり、各糖液の容量に対して約１％（ｗ／ｖ）のトレハロース二含水結晶を種晶として加えて攪拌しつつ６０℃から２０℃まで約１０時間かけて自然冷却することにより助晶し、トレハロース二含水結晶を晶析させたマスキットを調製した。前記マスキットから、常法により、バスケット型遠心分離機によりトレハロース二含水結晶を採取し、採取したトレハロース二含水結晶をマスキット重量に対し８％の脱イオン水を用いて洗浄し、４０℃で８時間、熟成、乾燥させた後、２５℃の清浄な空気を３０分間吹き付けて強制冷却し、粉砕することにより、トレハロース二含水結晶含有粉末とした。トレハロース含有糖液１乃至８のそれぞれから得られたトレハロース二含水結晶含有粉末をそれぞれ被験試料１乃至８とした。

【００９５】

＜被験試料９＞

被験試料９として、食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、ロット番号：９Ｉ１３１、株式会社林原販売）を用いた。

【００９６】

＜実験２－２：被験試料１乃至９のトレハロース純度、対澱粉収率、及び固結性＞

＜トレハロース純度＞

被験試料１乃至９のトレハロース純度は、実験１－３と同じＨＰＬＣ法にて求めた。結果は表２に示した。

【００９７】

＜対澱粉収率＞

上記で調製した被験試料１乃至８の対澱粉収率は、各被験試料の調製に用いた酵素反応液の質量と原料澱粉の仕込み時の濃度（３０％）とから原料澱粉の無水物換算での質量を算出し、この値で得られた被験試料１乃至８の無水物換算での質量を除した後、１００を乗じることでパーセント表示した。結果は表２に併せて示した。

【００９８】

＜固結性試験＞

被験試料１乃至９の各々について、それぞれの粉末の固結性を調べる目的で、以下の実験を行った。すなわち、被験試料１乃至９を１グラムずつ秤取し、それぞれ別個に内底部が半球状の１４ｍｌ容蓋つきポリプロピレン製円筒チューブ（ベクトン・ディッキンソン社販売、商品名『ファルコンチューブ２０５９』、直径１．７ｃｍ、高さ１０ｃｍ）の内部に充填し、チューブを試験管立てに直立させた状態で５０℃のインキュベーター（アドバンテック東洋株式会社販売、商品名『ＣＩ－４１０』）の内部に収容し、２４時間にわたって静置した後、チューブをインキュベーター外に取り出し、チューブから蓋を外し、チューブを緩慢に転倒させることにより、被験試料を黒色プラスチック製平板上に取り出し、取り出された被験試料の状態を肉眼観察した。

【００９９】

固結の有無は、被験試料が平板上でもなおチューブ内底部の半球状を明らかに保っている場合を「固結あり」（＋）、被験試料がチューブ内底部の形状をわずかではあるが識別できる場合を「やや固結あり」（±）、被験試料が崩壊し、チューブ内底部の形状を保っていない場合を「固結なし」（－）と判定した。結果は、表２における「固結性」の欄に示した。

【０１００】

【表２】

被験試料	トレハロース純度（質量%）	対澱粉収率（質量%）	固結性
1	98.0	27	＋
2	98.4	31	±
3	98.3	30	±
4	98.1	30	＋
5	99.2	41	±
6	99.1	40	±
7	99.0	39	±
8	98.8	39	±
9	99.0	－	±

【０１０１】

表２に示すとおり、被験試料１乃至８のトレハロース二含水結晶含有粉末における無水物換算でのトレハロース含量、すなわちトレハロース純度は、いずれも９８．０％を超え、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末である被験試料９と同様に、高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末であった。しかし、対澱粉収率についてみると、パエニバチルス属の微生物由来のＣＧＴａｓｅ以外のＣＧＴａｓｅを用いた被験試料２乃至４においては、対澱粉収率は、高々３１％にとどまったのに対し、パエニバチルス属の微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いた被験試料５乃至８においては、対澱粉収率は３９乃至４１％に達し、用いるＣＧＴａｓｅの由来による差異が認められた。また、表１と表２における結果を比較すると、グルコアミラーゼ処理後の酵素反応液中のトレハロース含量が高い酵素反応液から調製されたトレハロース二含水結晶含有粉末ほど、対澱粉収率が高いという傾向が見られ、酵素反応液中のトレハロース含量と対澱粉収率との間には相関関係が認められた。

【０１０２】

これらの結果から、ＣＧＴａｓｅとして、パエニバチルス属の微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いる場合（被験試料５乃至８）には、グルコアミラーゼ処理後の酵素反応液中のトレハロース含量が８６．０％を超え、その結果、トレハロース二含水結晶含有粉末についての対澱粉収率も約４０％まで高まるとの知見が得られた。なお、パエニバチルス属の微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合の対澱粉収率（被験試料５乃至８の対澱粉収率）の向上は、従来から用いられているジオバチルス・ステアロサーモフィラス　Ｔｃ－９１株由来のＣＧＴａｓｅを用いた場合（被験試料２）に比べて８乃至１０％も向上し、顕著な効果が認められた。

【０１０３】

一方、粉末としての取り扱い上の重要な物性である固結性に関しては、ＣＧＴａｓｅを用いないトレハロース含有糖液１から製造された被験試料１、及び、ＣＧＴａｓｅとして、サーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス由来のＣＧＴａｓｅを用いて製造された被験試料４は、上記固結性試験において「固結あり（＋）」と判定されたのに対し、その他のＣＧＴａｓｅを用いて製造された被験試料２、３、５乃至８は、従来から市販されている食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（被験試料９）と同様に、上記固結性試験において「やや固結あり」（±）と判定されるに止まった。この結果は、パエニバチルス属の微生物由来のＣＧＴａｓｅを用いる本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末（被験試料５乃至８）は、従来から市販されている食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（被験試料９）と比べて固結性において遜色のない粉末であり、粉末状の食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、又は医薬品素材として、従来から市販されている食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様に使用することがで

きる粉末であることを示している。

【０１０４】

＜実験３：晶析時の擬似制御冷却がトレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース純度、対澱粉収率、及び固結性に及ぼす影響＞

本実験では、実験２－１で調製されたトレハロース含有糖液１乃至８からトレハロース二含水結晶を晶析させるに際し、擬似制御冷却法を適用してトレハロース二含水結晶含有粉末を調製した場合の、粉末のトレハロース純度、対澱粉収率、及び固結性に及ぼす影響を検討した。

【０１０５】

＜実験３－１：被験試料の調製＞

実験２－１で調製した無水物換算でのトレハロース含量が異なるトレハロース含有糖液１乃至８のそれぞれを、減圧下で固形物濃度約８５％にまで濃縮し、助晶缶にとり、糖液の容量に対して約１％（ｗ／ｖ）のトレハロース二含水結晶を種晶として加えて攪拌しつつ、６０℃から２０℃まで約１０時間かけて擬似制御冷却することにより助晶した以外は、実験２におけると同様にして、トレハロース二含水結晶を晶析させたマスキットを調製した。なお、擬似制御冷却は、全１０時間の冷却時間を４時間、３時間、３時間の３つの区間に分け、最初の区間では４時間かけて液温を６０℃から５５℃まで、次の区間では３時間かけて５５℃から５０℃まで、さらに、最後の区間では３時間かけて液温を５０℃から２０℃まで、いずれも液温が時間に対して略直線状に低下するように冷却することによって行った。得られたマスキットから、常法により、バスケット型遠心分離機によりトレハロース二含水結晶を採取し、採取したトレハロース二含水結晶をマスキット重量に対し８％の脱イオン水を用いて洗浄し、４０℃で８時間、熟成、乾燥させた後、２５℃の清浄な空気を３０分間吹き付けて強制冷却し、粉砕することにより、トレハロース二含水結晶含有粉末とした。トレハロース含有糖液１乃至８のそれぞれから擬似制御冷却によって得られたトレハロース二含水結晶含有粉末をそれぞれ被験試料１ｃ乃至８ｃとした。

【０１０６】

＜実験３－２：被験試料１ｃ乃至８ｃのトレハロース純度、対澱粉収率、及び固結性＞

＜トレハロース純度＞

被験試料１ｃ乃至８ｃのトレハロース純度は、実験１－３と同じＨＰＬＣ法にて求めた。結果は表３に示した。

【０１０７】

＜対澱粉収率＞

被験試料１ｃ乃至８ｃの対澱粉収率は、実験２－２と同じ方法により算出した。結果は表３に併せて示した。

【０１０８】

＜固結性試験＞

【０１０９】

被験試料１ｃ乃至８ｃの固結性は、実験２－２と同じ固結性試験により評価した。結果は表３に併せて示した。

【０１１０】

【表３】

被験試料	トレハロース純度（質量%）	対澱粉収率（質量%）	固結性
1c	98.7	31	±
2c	99.1	35	±
3c	99.0	34	±
4c	99.0	34	±
5c	99.5	44	－
6c	99.4	43	－
7c	99.3	43	－
8c	99.3	42	－

【０１１１】
表３に示すとおり、晶析工程において擬似制御冷却法を適用して調製した被験試料１ｃ乃至８ｃのトレハロース純度は、９８．７乃至９９．５％の範囲であった。この結果を実験２の自然冷却法にて晶析して得た被験試料１乃至８のトレハロース純度（表２の「トレハロース純度」の欄）と対比すると、被験試料１ｃ乃至８ｃでは、いずれもトレハロース純度が０．３乃至０．９％高まっていた。この結果は、晶析工程において擬似制御冷却を適用することにより、粉末のトレハロース純度を高めることができることを示している。
【０１１２】
また、被験試料１ｃ乃至８ｃの対澱粉収率は３１乃至４４％であり、この結果を実験２の自然冷却法にて晶析して得た被験試料１乃至８の対澱粉収率（表２の「対澱粉収率」の欄）と対比すると、被験試料１ｃ乃至８ｃでは、いずれも対澱粉収率が３乃至４％程度向上していた。この結果は、晶析に際して擬似制御冷却法を適用すると、自然冷却法により晶析した場合に比べて対澱粉収率が高まることを意味している。晶析に用いたトレハロース含有糖液におけるトレハロース含量に変化がないにもかかわらず、擬似制御冷却法を適用することによって得られるトレハロース二含水結晶含有粉末の対澱粉収率が高まる理由は定かではないが、前述のとおり、擬似制御冷却法によれば微結晶が少なく粒度のそろった結晶が得られるため、遠心分離によってマスキットから結晶を採取する時、及び、採取した結晶を水で洗浄する時におけるトレハロースのロスが少なくなるためではないかと推測される。
【０１１３】
さらに、被験試料１ｃ乃至８ｃについて、実験２－２におけると同様の固結性試験を行いその粉末の固結性を調べたところ、表３に示すとおり、被験試料１ｃ乃至４ｃはいずれも「やや固結あり」（±）と判定され、被験試料５ｃ乃至８ｃは、いずれも平板上に取り出すと崩壊し、チューブ内底部の形状を保っておらず、「固結なし」（－）と判定された。これらの結果は、晶析に際して擬似制御冷却法を適用すると、意外にも、得られる粉末の固結性が、自然冷却法にて晶析させた場合に比べて改善される傾向にあることを示している。中でも、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（被験試料９）が固結性試験において「やや固結あり」（±）（表２参照）と判定されたのに対し、トレハロース含量が８６％超と比較的高いトレハロース含有糖液５乃至８から擬似制御冷却法を適用して晶析することにより得られたトレハロース二含水結晶含有粉末（被験試料５ｃ乃至８ｃ）が、「固結なし」（－）と判定されたという事実は、トレハロース含量が８６％超と比較的高いトレハロース含有糖液から擬似制御冷却法を適用して晶析することにより、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末よりも有意に固結し難い、粉末としての特性に優れたトレハロース二含水結晶含有粉末を製造できることを物語っている。
【０１１４】
上記の結果から、晶析工程において擬似制御冷却法を適用することにより、自然冷却法

によって晶析された場合に比べて、トレハロース純度が高いトレハロース二含水結晶含有粉末を、より高い対澱粉収率で製造できることが判明した。また、トレハロース含量が８６．０％超と比較的高い糖液から擬似制御冷却法により晶析して製造したトレハロース二含水結晶含有粉末は、自然冷却法で製造される従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末が「やや固結あり」（±）と判定される条件下でも固結せず、粉末としての流動性を維持している点で、より優れた粉末であることが判明した。

【０１１５】

＜実験４：粉末の固結性の違いに及ぼす結晶化度及び平均結晶子径の影響＞

実験３において、トレハロース含量が８６％超と比較的高い糖液から擬似制御冷却法を適用して調製したトレハロース二含水結晶含有粉末被験試料５ｃ乃至８ｃは、それ以外の被験試料と比べトレハロース純度において大差ないにもかかわらず、固結し難いという優れた粉末特性を有していた。その理由を解明する目的で、本実験では実験２で得た被験試料１乃至８、及び、実験３で得た被験試料１ｃ乃至８ｃについて、粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度と平均結晶子径を測定した。また、対照として、被験試料９についても同様に調べた。

【０１１６】

＜実験４－１：結晶化度の測定に用いる標準試料の調製＞

＜標準試料Ａ＞

被験試料Ａとして、実質的にトレハロース二含水結晶からなる標準試料を、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、純度９９．９％以上）を再結晶させることによって調製した。すなわち、上記試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末１，８４０ｇを１，０００ｇの精製水に加熱・溶解し、溶解した溶液を２０℃の恒温チャンバーに入れて一晩放置して再結晶させた。再結晶により晶出したトレハロース二含水結晶を常法によりバスケット型遠心分離機を用いて回収して、４０℃で８時間乾燥してトレハロース二含水結晶約９５０ｇを得た。これを被験試料Ａとした。被験試料Ａのトレハロース純度を実験１記載のＨＰＬＣ法で測定したところ、１００％であった。

【０１１７】

＜標準試料Ｂ＞

被験試料Ｂとして、実質的に無定形部分からなる標準試料を、以下の手順で調製した。すなわち、被験試料Ａを適量の精製水に溶解し、３日間かけて凍結乾燥した後、４０℃以下で１晩真空乾燥して、実質的に無定形部分からなる粉末を得た。これを被験試料Ｂとした。被験試料Ｂのトレハロース純度を実験１記載のＨＰＬＣ法で測定したところ、１００％であった。なお、被験試料Ｂの水分含量をカールフィッシャー法により測定したところ、２．０％であった。

【０１１８】

＜実験４－２：被験試料Ａ及びＢ、被験試料１乃至９、及び、被験試料１ｃ乃至８ｃの結晶化度＞

＜結晶化度＞

被験試料Ａ及びＢ、被験試料１乃至９、被験試料１ｃ乃至８ｃにおけるトレハロース二含水結晶についての結晶化度を以下のようにして求めた。すなわち、市販の反射光方式による粉末Ｘ線回折装置（スペクトリス株式会社製、商品名『Ｘ’Ｐｅｒｔ　ＰＲＯ　ＭＰＤ』）を用い、Ｃｕ対陰極から放射される特性Ｘ線であるＣｕＫα線（Ｘ線管電流４０ｍＡ、Ｘ線管電圧４５ｋＶ、波長１．５４０５オングストローム）による粉末Ｘ線回折プロフィルに基づき、同粉末Ｘ線回折装置に搭載された専用の解析コンピューターソフトウェアを用い、被験試料Ａ及びＢ、被験試料１乃至９、及び被験試料１ｃ乃至８ｃの各々につきハーマンス法による結晶化度の解析値を求めた。ハーマンス法による結晶化度の解析に先立ち、各粉末Ｘ線回折パターンにおけるピーク同士の重なり、回折強度、散乱強度などを勘案しながら、最適と判断されるベースラインが得られるように、ソフトウェアに設定された粒状度及びベンディングファクターをそれぞれ適切なレベルに合わせた。なお、ハ

ーマンス法については、ピー・エイチ・ハーマンス（Ｐ．Ｈ．Ｈａｒｍａｎｓ）とエー・ワイジンガー（Ａ．　Ｗｅｉｄｉｎｇｅｒ）、「ジャーナル・オブ・アプライド・フィジクス」（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｐｈｙｓｉｃｓ）、第１９巻、４９１～５０６頁（１９４８年）、及び、ピー・エイチ・ハーマンス（Ｐ．Ｈ．Ｈａｒｍａｎｓ）とエー・ワイジンガー（Ａ．　Ｗｅｉｄｉｎｇｅｒ）、「ジャーナル・オブ・ポリマー・サイエンス」（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）、第４巻、１３５～１４４頁（１９４９年）に詳述されている。

【０１１９】

被験試料Ａについての結晶化度の解析値を解析値H_{100}、被験試料Ｂについての結晶化度の解析値を解析値H_0とし、各被験試料についての結晶化度の解析値をＨｓとして前記した式［３］に代入することにより結晶化度を求めた。因みに被験試料Ａについてのハーマンス法による結晶化度の解析値（H_{100}）及び被験試料Ｂについての同解析値（H_0）は、それぞれ、５０．６９％及び８．５９％であった。結果は表４に示した。なお、被験試料Ａ及びＢについては、粉末Ｘ線回折パターンをそれぞれ図１及び図２に示した。

【０１２０】

図１に見られるとおり、被験試料Ａの粉末Ｘ線回折パターンにおいては、トレハロース二含水結晶に特有な回折ピークが回折角（２θ）５乃至５０°の範囲に明瞭かつシャープに出現し、無定形部分に特有なハローは一切認められなかった。一方、図２に見られるとおり、被験試料Ｂの粉末Ｘ線回折パターンにおいては、図１の粉末Ｘ線回折パターンとは異なり、無定形部分に特有なハローがベースラインの膨らみとして著明に出現したものの、トレハロースの二含水結晶や無水結晶に特有な回折ピークが一切認められなかった。

【０１２１】

＜実験４－３：被験試料Ａ及びＢのシンクロトロン放射による粉末Ｘ線回折＞

本実験では、被験試料Ａ及びＢがそれぞれ、解析値H_{100}及びH_0を決定するための試料として適切なものであることをさらに裏付ける目的で、これら標準試料をシンクロトロン放射光（以下、「放射光」と言う。）をＸ線源に用い、微弱な回折や散乱のシグナルを検出することができる透過光方式の粉末Ｘ線回折に供した。なお、測定条件は次のとおりであった。

【０１２２】

＜測定条件＞

粉末Ｘ線回折装置：高速粉末Ｘ線回折装置（神津精機社販売、
型番『ＰＤＳ－１６』）、デバイシェラモード、
カメラ長：４９７．２ｍｍ
Ｘ線源　：偏向電磁石からの放射光（兵庫県ビームライン（ＢＬ０８Ｂ２））
測定波長：１．２３９４Å（１０．００ｋｅＶ）
測定強度：10^9フォトン／秒
測定角　：３乃至３８°
露光時間：６００秒間
画像撮影：イメージングプレート（富士フイルム社製、商品名『イメージ
ングプレート　ＢＡＳ－２０４０』
画像読取装置：イメージアナライザー（富士フイルム社製、『バイオイメー
ジアナライザーＢＡＳ－２５００』）

【０１２３】

測定は、大型放射光施設「ＳＰｒｉｎｇ－８」（兵庫県佐用郡佐用町光都１－１－１）内に設けられた「兵庫県ビームライン（ＢＬ０８Ｂ２）」を利用して実施した。

【０１２４】

粉末Ｘ線回折の測定に先立ち、被験試料Ａ及びＢを乳鉢によりすり潰した後、５３μｍの篩によりふるい分け、篩を通過した粉末をＸ線結晶回折用のキャピラリー（株式会社トーホー販売、商品名『マークチューブ』、Ｎｏ．１４（直径０．６ｍｍ、リンデマンガラス製））内に充填長が略３０ｍｍとなるように均一に充填した。次いで、キャピラリーを

試料の充填終端で切断し、開口部を接着剤により封じた後、試料マウントへキャピラリーを粘土により固定し、キャピラリーの長手方向が粉末Ｘ線回折装置の光軸に対して垂直になるように、試料マウントを粉末Ｘ線回折装置に取り付けた。トレハロース二含水結晶の配向による粉末Ｘ線回折プロフィルへの影響を除くため、測定中、試料マウントを２回／秒の周期で等速回転させた。

【０１２５】

被験試料Ａ及びＢについて得られた粉末Ｘ線回折プロフィルを解析し、粉末Ｘ線回折パターンを作成する過程においては、測定精度を上げるため、常法にしたがい、各粉末Ｘ線回折プロフィルから粉末Ｘ線回折装置に由来するバックグラウンドシグナルを除去した。斯くして得られた被験試料Ａ及びＢについての粉末Ｘ線回折パターンをそれぞれ図３及び図４に示す。

【０１２６】

図３に見られるとおり、放射光を用いた粉末Ｘ線回折による被験試料Ａについての粉末Ｘ線回折パターンはトレハロース二含水結晶に特有な回折ピークが回折角（２θ）３乃至３８°の範囲に明瞭かつシャープに出現した。図３と図１とを比較すると、放射光の波長（１．２３９４Å）、と特性Ｘ線の波長（１．５４０５Å）とが異なるため、図３においては、図１におけるほぼ５分の４の回折角（２θ）で各回折ピークが出現するという違いはあるものの、図１及び図３における回折パターンは極めてよく一致していた。また、図３における各回折ピークの強度は、図１における回折ピークの強度より５０倍近く強いにもかかわらず、各回折ピークの半値幅は図１におけるよりも明らかに狭く、分離度も高かった。また、図３の粉末Ｘ線回析パターンにおいては、後述する図４におけるがごとき、無定形部分に特有なハローは一切認められなかった。このことは、被験試料Ａ中のトレハロース二含水結晶の結晶性が極めて高く、被験試料Ａが実質的にトレハロース二含水結晶からなることを示している。

【０１２７】

一方、図４に示すとおり、放射光を用いた粉末Ｘ線回折による被験試料Ｂについての粉末Ｘ線回折パターンにおいては、無定形部分に特有なハローがベースラインの膨らみとして著明に出現し、トレハロース二含水結晶に特有な回折ピークは一切認められなかった。このことは、被験試料Ｂが実質的に無定形部分からなることを示している。

【０１２８】

シンクロトロン放射光をＸ線源として用いて得られた上記の結果は、被験試料Ａ及びＢが、式［３］における解析値H_{100}及び解析値H_0を決定するための試料として適切なものであることを裏付けている。

【０１２９】

＜実験４－４：被験試料Ａ、被験試料１乃至９及び被験試料１ｃ乃至８ｃの平均結晶子径＞

粉末Ｘ線回折パターンにおける各回折ピークの半値幅及び回折角（２θ）から、結晶子径を算出することができる。本発明者らは、複数の回折ピークから算出される結晶子径の平均値（平均結晶子径）が、結晶含有粉末の物性を規定するパラメータとなり得ると考え、トレハロース二含水結晶含有粉末の被験試料について平均結晶子径を求めた。

【０１３０】

無定形粉末であり、粉末Ｘ線回折パターンにおいて回折ピークを示さない被験試料Ｂを除く、被験試料Ａ、被験試料１乃至９、及び、被験試料１ｃ乃至８ｃについて、結晶化度を求めた際の各粉末Ｘ線回折パターンを用いてさらにそれぞれの平均結晶子径を求めた。平均結晶子径は、トレハロース二含水結晶含有粉末のそれぞれの粉末Ｘ線回折パターンにおける５個の回折ピーク、すなわち、結晶子の不均一歪に起因する回折ピーク幅への影響が少ないとされる比較的低角の領域で、他の回折ピークとよく分離した回折角（２θ）１３．７°（ミラー指数（ｈｋｌ）：１０１）、１７．５°（ミラー指数：２２０）、２１．１°（ミラー指数：２２１）、２３．９°（ミラー指数：２３１）及び２５．９°（ミラー指数：１５０）の回折ピーク（図１に示した符号ａ乃至ｅ）を選択し、それぞれにつ

いてその半値幅と回折角（２θ）を用い、粉末Ｘ線回折装置に付属する解析用コンピューターソフトウェア（『エクスパート　ハイスコア　プラス（Ｘ´ｐｅｒｔ　Ｈｉｇｈｓｃｏｒｅ　Ｐｌｕｓ）』を用い、標準品としてケイ素（米国国立標準技術研究所（ＮＩＳＴ）、Ｘ線回折用標準試料（『Ｓｉ６４０ｄ』）を用いた場合の測定値に基づき補正した後、前記式［４］に基づき結晶子径を算出し、５点の平均値として求めた。結果は表４に併せて示した。

【０１３１】

なお、表４には、被験試料１乃至９及び被験試料１ｃ乃至８ｃについて、トレハロース純度と粉末の固結性試験の結果を表２及び３からそれぞれ転記し、併せて示した。また、結晶化度測定のための標準試料とした被験試料Ａ及びＢについても、それぞれを実験２－２、実験３－２と同じ固結性試験に供し、その固結性を評価した。結果は併せて表４に示した。

【０１３２】

【表４】

被験試料	トレハロース純度（質量%）	結晶化度（%）	平均結晶子径（Å）	固結性
A	100	100	3,910	－
B	100	0	－	＋
1	98.0	75.3	2,050	＋
2	98.4	84.4	2,480	＋
3	98.3	84.2	2,550	＋
4	98.1	83.9	2,380	＋
5	99.2	87.8	2,740	±
6	99.1	87.5	2,710	±
7	99.0	86.9	2,650	±
8	98.8	86.5	2,620	±
9	99.0	85.4	2,590	±
1c	98.7	86.2	2,680	±
2c	99.1	88.1	2,810	±
3c	99.0	87.4	2,770	±
4c	99.0	87.6	2,610	±
5c	99.5	94.8	3,380	－
6c	99.4	93.6	3,410	－
7c	99.3	93.1	3,350	－
8c	99.3	90.4	3,120	－

【０１３３】

結晶化度測定において、解析値H_{100}を決定するための標準試料とした被験試料Ａ（トレハロース純度１００．０%、結晶化度１００．０%）の平均結晶子径は３，９１０Åであった。また、表４に示されるとおり、固結性試験において被験試料Ａは「固結なし」（－）と判定された。これに対し、解析値H_0を決定するための標準試料とした被験試料Ｂ（トレハロース純度１００．０%、結晶化度０．０%）は、固結性試験において、チューブから平板上に取り出してもチューブ内底部の半球状を明確に保っており、「固結あり」（＋）と判定された。なお、平板上に取り出された被験試料Ｂが保っているチューブ内底部の半球状の形態は、平板に軽く振動を与えた程度では崩壊しないほどであった。一方、従来から市販されている食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末である被験試料９のトレハロース純度は９９．０%、結晶化度は８５．４%であった。

【０１３４】

表４の「結晶化度」の欄に示すとおり、晶析工程において自然冷却法にて晶析して得た被験試料１乃至８の結晶化度は７５．３乃至８７．８%の範囲となり、また、晶析工程に

おいて擬似制御冷却法を適用して調製した被験試料１ｃ乃至８ｃの結晶化度は、８６．２乃至９４．８％の範囲となった。晶析方法の違いの観点から上記被験試料１乃至８及び被験試料１ｃ乃至８ｃの結晶化度を対比すると、擬似制御冷却法にて得た被験試料１ｃ乃至８ｃでは、試料間でばらつきはあるものの、自然冷却法にて得た被験試料１乃至８よりも結晶化度が３．２乃至１０．９％高まっていることが判明した。

【０１３５】

また、表４に示す結果は、結晶化度が粉末の固結性と相関性があることを物語っている。すなわち、表４に示すとおり、結晶化度が９０％以上である被験試料Ａ、被験試料５ｃ乃至８ｃが、いずれも「固結なし」（－）であったのに対し、結晶化度が８５％以上９０％未満である被験試料５乃至９、及び被験試料１ｃ乃至４ｃは、いずれも「やや固結あり」（±）であり、結晶化度が８５％未満である被験試料Ｂ、被験試料１乃至４は、いずれも「固結あり」（＋）であった。このことは、結晶化度が、固結し難いトレハロース二含水結晶含有粉末を規定する有力な指標となり得ることを物語っている。

【０１３６】

さらに、この結果は、トレハロース二含水結晶含有粉末の製造において、反応液中のトレハロース含量を８６．０％超にまで高め、その後の晶析工程において擬似制御冷却法を適用すれば、得られる粉末におけるトレハロース二含水結晶についての結晶化度が９０％以上となり、結果として、固結の点で、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末よりも有意に固結し難いトレハロース二含水結晶含有粉末を得ることができることを物語っている。

【０１３７】

一方、表４の「平均結晶子径」の欄に示すとおり、晶析工程において自然冷却法にて晶析して得た被験試料１乃至８の平均結晶子径は２，０５０乃至２，７４０Åの範囲となり、また、晶析工程において擬似制御冷却法を適用して調製した被験試料１ｃ乃至８ｃの平均結晶子径は、２，６８０乃至３，４１０Åの範囲となった。平均結晶子径について被験試料１ｃ乃至８ｃと被験試料１乃至８とを対比すると、擬似制御冷却法にて得た被験試料１ｃ乃至８ｃでは、試料間でばらつきはあるものの自然冷却法にて得た被験試料１乃至８よりも平均結晶子径が２２０乃至７４０Å増大していることが判明した。この結果から、トレハロース二含水結晶の晶析工程における擬似制御冷却法の適用は、平均結晶子径の大きいトレハロース二含水結晶含有粉末を得る上でも優れた方法であると言える。

【０１３８】

また、被験試料１乃至８及び被験試料１ｃ乃至８ｃにおいては、粉末におけるトレハロース純度及びトレハロース二含水結晶についての結晶化度が高いほど平均結晶子径の値が大きい傾向が認められた。この傾向は、トレハロース純度が１００．０％で結晶化度が１００．０％である被験試料１の平均結晶子径が３，９１０Åであり、食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末である被験試料９の平均結晶子径が２，５９０Åであったことを併せると、トレハロース二含水結晶含有粉末における平均結晶子径は、トレハロース純度及び結晶化度と一定の相関性があることを物語っている。

【０１３９】

さらに、表４に示す結果は、平均結晶子径も粉末の固結性と相関性があることを物語っている。すなわち、表４に示すとおり、平均結晶子径が３，１２０Å以上である被験試料Ａ、被験試料５ｃ乃至８ｃが、いずれも「固結なし」（－）であったのに対し、平均結晶子径が２，６２０Å以上２，９００Å未満の範囲にある被験試料５乃至９、及び被験試料１ｃ乃至４ｃは、いずれも「やや固結あり」（±）であり、平均結晶子径が２，６００Å未満である被験試料Ｂ、被験試料１乃至４は、いずれも「固結あり」（＋）であった。このことは、結晶化度とともに平均結晶子径も、固結し難いトレハロース二含水結晶含有粉末を規定する有力な指標となり得ることを物語っている。

【０１４０】

＜実験５：被験試料の粉末特性（保存性、水への溶解性）＞

被験試料１乃至９及び被験試料１ｃ乃至８ｃの粉末としての性質をさらに明らかにする

ことを目的とし、保存性試験及び水への溶解性試験を行った。

【０１４１】

＜実験５－１：保存性試験＞

実験２－２、実験３－２等において行われた固結性試験が、トレハロース二含水結晶含有粉末の実際の保存時における固結性を評価する試験として妥当なものであることを確認すべく、実験４－１の方法で得た被験試料Ａ及びＢ、実験２で得た被験試料１乃至９、及び、実験３で得た被験試料１ｃ乃至８ｃについて、市場に流通する製品としてのトレハロース二含水結晶含有粉末が実際に保存される状態、環境、期間などを想定した保存性試験を行った。

【０１４２】

すなわち、被験試料Ａ及びＢ、被験試料１乃至９、及び、被験試料１ｃ乃至８ｃを各々１５０ｇずつ取り、別々にポリエチレン袋（商品名『ユニパック　Ｆ－４』、株式会社生産日本社製、１７ｃｍ×１２ｃｍ）に採取し、空気を抜いた状態で封入したポリエチレン袋を各被験試料について３袋ずつ作製した。次いで、各ポリエチレン袋の片面積１ｍ^{2}当たりの荷重が６４８ｋｇになるように１３．２ｋｇの錘を、それぞれのポリエチレン袋の上に上面全体に荷重が掛かるように載せ、その状態で、高温多湿を避けた環境下にて６０日間保存した。なお、食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末製品は、通常、２０ｋｇ詰めの袋入の荷姿で、１０段程度積み重ねた状態で倉庫等において保存されるところ、ポリエチレン袋の片面積１ｍ^{2}当たり６４８ｋｇという荷重は、この１０段積みした状態における最下段の製品にかかる荷重に相当する。６０日間保存後、各被験試料をポリエチレン袋から取り出し、目開き４２５μｍの篩にかけ、篩を通過した粉末と通過しなかった粉末の質量をそれぞれ測定し、粉末全体に占める粒径４２５μｍ以上の粒子の質量割合（％）を求め、各被験試料について試験した３袋の平均値をとることにより、６０日間保存後の粉末における固結の有無を判定した。粉末の固結は、粒径４２５μｍ以上の粒子が粉末全体の３０％未満の場合を「固結なし」（－）、同粒子が粉末全体の３０％以上の場合を「固結あり」（＋）と判定した。なお、粉末における４２５μｍ以上の粒子の割合が３０％を超えると、一般に、粉末の溶解や他の粉末状組成物との混合、混捏などに支障が生じるため、判定の基準を３０％とした。結果を表５に示した。

【０１４３】

＜実験５－２：水への溶解性試験＞

各被験試料を各０．２５ｇ秤量し、それぞれ内底部が半球状の１４ｍｌ容蓋付きポリプロピレン製円筒チューブ（ベクトン・ディッキンソン社販売、商品名「ファルコンチューブ２０５９」に入れた。各被験試料を入れたチューブに、脱イオン水を５ｍｌ加え、５０℃の恒温水槽で、３０分間加温した後、２回転倒させ、さらに５０℃で１５分保持し、その時の溶解性を調べた。目視により、粉末が完全に溶解したと見なされる場合を溶解性「良」、不溶物の残存が確認される場合を溶解性「不良」と判定した。結果を併せて表５に示した。

【０１４４】

【表５】

被験試料	保存性	水への溶解性
Ａ	－	不良
Ｂ	＋	良
1	＋	良
2	＋	良
3	＋	良
4	＋	良
5	＋	良
6	＋	良
7	＋	良
8	＋	良
9	＋	良
1c	＋	良
2c	＋	良
3c	＋	良
4c	＋	良
5c	－	良
6c	－	良
7c	－	良
8c	－	良

【０１４５】

表５の「保存性」の欄に示されるとおり、各被験試料を荷重を掛けながら高温多湿を避けた環境下で６０日間保存した保存性試験において、トレハロースについての結晶化度が９０．０％未満、平均結晶子径が２，８５０Å以下である被験試料１乃至９及び被験試料１ｃ乃至４ｃが「固結あり」（＋）と判断されたのに対し、結晶化度が９０．４％以上９５．０％以下、平均結晶子径が３，１２０Å以上である被験試料Ａ、被験試料５ｃ乃至８ｃは「固結なし」（－）と判断された。この結果は、実験２－２、実験３－２等において行った固結性試験において「固結あり」（＋）若しくは「やや固結あり」（±）と判定された被験試料は本保存試験においては「固結あり」（＋）と判定されるのに対し、実験２－２、実験３－２等において行った固結性試験において「固結なし」（－）と判定された被験試料は、本保存試験においても同様に「固結なし」（－）と判定されることを示している。この事実は、実験２－２、実験３－２等において行った固結性試験が、トレハロース二含水結晶含有粉末の実際の保存環境下での固結性を評価する試験として妥当なものであることを示している。

【０１４６】

また、表５の「水への溶解性」の欄に示すとおり、水への溶解性試験において、結晶化度１００％、平均結晶子径３，９１０Åの被験試料Ａが溶解性「不良」と判定されたのに対し、結晶化度が９４．８％以下、平均結晶子径が３，４１０Å以下である被験試料１乃至９及び被験試料１ｃ乃至８ｃは、いずれも溶解性「良」と判定された。この結果は、トレハロース二含水結晶含有粉末において、結晶化度及び平均結晶子径が被験試料Ａのレベル、換言すれば、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末のレベルにまで高まると、水への溶解性が悪くなるという、固結性とは違った問題が生じることを示している。

【０１４７】

＜実験６：トレハロースの製造により好適なＣＧＴａｓｅに共通する部分アミノ酸配列＞

トレハロースの製造により好適なＣＧＴａｓｅを特徴づける目的で、酵素反応液中のトレハロース含量を高める効果に優れる前記パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅ、すなわち、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株、パエニバチルス・

パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株、及び、パエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株にそれぞれ由来するＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列（配列表における配列番号１、２及び３）と、酵素反応液中のトレハロース含量を高める効果がパエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅに比べると弱い前記ジオバチルス・ステアロサーモフィラス　Ｔｃ－９１株、とバチルス・マゼランス、サーモアナエロバクター・サーモスルフリゲネスにそれぞれ由来するＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列（配列表における配列番号４、５及び６）を比較した。なお、アミノ酸配列の比較に用いた配列表における配列番号１乃至３で示されるアミノ酸配列はいずれも、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株、パエニバチルス・パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株、及び、パエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株のそれぞれのＣＧＴａｓｅ遺伝子を出願人が独自にクローニングし決定した塩基配列にコードされるアミノ酸配列を用いた。また、配列表における配列番号４及び５で示されるアミノ酸配列は、出願人が独自に決定し本願と同じ出願人による特開昭６１－１３５５８１号公報に開示されたジオバチルス・ステアロサーモフィラス（旧分類ではバチルス・ステアロサーモフィラス）　Ｔｃ－９１株由来、及び、バチルス・マゼランス由来ＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列である。因みに、配列表における配列番号５で示されるアミノ酸配列は、実験１で用いたバチルス・マゼランス由来ＣＧＴａｓｅ（商品名『コンチザイム』、天野エンザイム株式会社販売）のものではないものの、同じバチルス・マゼランス由来ＣＧＴａｓｅのアミノ酸であることから代用した。また、サーモアナエロバクター・サーモスルフリゲネス由来ＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列としては、遺伝子データベース『ＧｅｎＢａｎｋ』にアクセッションＮｏ．３５４８４として登録されているものを用いた。

【０１４８】

上記したアミノ酸配列の比較において、酵素反応液中のトレハロース含量を高める効果に優れるＣＧＴａｓｅ、すなわち、前記パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅに共通して存在し、且つ、酵素反応液中のトレハロース含量を高める効果がそれほどでもないＣＧＴａｓｅ、すなわち、ジオバチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・マゼランス、及び、サーモアナエロバクター・サーモスルフリゲネスにそれぞれ由来するＣＧＴａｓｅに存在しない部分アミノ酸配列として、下記（ａ）乃至（ｄ）の部分アミノ酸配列が認められた。

（ａ）Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－$Ｘ_{1}$－Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ；
（ｂ）Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ａｓｎ；
（ｃ）Ｌｙｓ－Ｍｅｔ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｐｈｅ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ；
（ｄ）Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｓｎ－$Ｘ_{2}$－Ｔｙｒ；
（但し、$Ｘ_{1}$はＡｌａ又はＳｅｒを、$Ｘ_{2}$はＡｌａ又はＴｈｒをそれぞれ意味する。）

【０１４９】

以上の結果から、本発明の製造方法によるトレハロースの製造において、より好適なＣＧＴａｓｅ、すなわち、酵素反応液中のトレハロース含量を８６．０％超とすることのできるＣＧＴａｓｅは、上記（ａ）乃至（ｄ）の部分アミノ酸配列を有すると特徴づけることができる。

【０１５０】

以下、実施例に基づき本発明をさらに詳しく説明する。しかしながら、本発明はこれら実施例によってなんら限定されるものではない。

【実施例１】

【０１５１】

＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

トウモロコシ澱粉を３０％になるように水中に懸濁し、この懸濁液に終濃度０．１％となるように炭酸カルシウムを添加し、ｐＨ６．０に調整した。これに耐熱性α－アミラーゼ（商品名『ターマミル６０Ｌ』、ノボザイムズ・ジャパン株式会社販売）を澱粉質量当たり０．２％加えて９８乃至１００℃、１５分間反応させ、澱粉を糊化・液化した。得られた液化澱粉溶液を１２５℃で１５分間オートクレーブした後、５７℃に冷却し、これに

実験１－１の方法で調製した組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素と組換え型トレハロース遊離酵素の部分精製標品を、澱粉１グラム当たりそれぞれ５単位及び２０単位になるよう加え、さらに、澱粉１グラム当たり１，５００単位のイソアミラーゼ（株式会社林原製）及び１５単位の実験１－２の方法で調製したパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５９５９株由来のＣＧＴａｓｅを加え、さらに、約５０時間反応させた。次いで、この反応液を９７℃で６０分間加熱して酵素を失活させた後、ｐＨ４．５に調整し、これにグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム＃２００００』、ナガセケムテックス株式会社販売）を澱粉１グラム当り１０単位加えて２４時間反応させたところ、トレハロース純度、すなわち無水物換算でのトレハロース含量が８６．４％の反応液が得られた。斯くして得た反応液を加熱し酵素を失活させ、常法により活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H^+型）及びアニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩し、減圧濃縮し、固形物濃度約８５％の濃縮液とした。これを助晶缶にとり、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）を種晶として２％加えて５５℃とし、穏やかに撹拌しつつ２４時間かけて１５℃まで自然冷却し、トレハロース二含水結晶を晶析させた。バスケット型遠心分離機で結晶を回収し、結晶をマスキット重量に対し約５％の精製水でスプレーし洗浄した後、５０℃で２時間、熟成、乾燥し、２０℃の空気を１０分間吹き付けて冷却し、粉砕して、無水物換算でトレハロースを９９．１％、Ｄ－グルコースを０．６％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０９％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．１２％含有するトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率約４０％で得た。

【０１５２】

本例の製造方法によれば、トレハロース二含水結晶含有粉末を、約４０％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は８７．５％、平均結晶子径は２，６１０Å、粉末全体の還元力は０．７％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が７５．３％、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子が６６．１％、及び、粒径４２５μｍ以上の粒子が１０．２％含まれていた。本品は、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様に、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、及び医薬品素材などとして用いることができる。

【実施例２】

【０１５３】

＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

澱粉１グラム当たりそれぞれ１０単位及び４０単位の組換え型α－グリコシルトレハロース生成酵素と組換え型トレハロース遊離酵素を用いて反応時間を４０時間とし、ＣＧＴａｓｅとして実験１－２の方法で得たパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株由来ＣＧＴａｓｅを用いた以外は、実施例１と同様の方法によりトレハロース生成反応及びグルコアミラーゼ処理を行うことにより、トレハロース純度、すなわち無水物換算でのトレハロース含量が８６．２％の反応液を得た。得られた反応液を加熱し酵素を失活させ、常法により活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H^+型）及びアニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩し、減圧濃縮し、固形物濃度約８５％の濃縮液とした。これを助晶缶にとり、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）を種晶として１％加えて６０℃とし、次いで、このトレハロース含有溶液を、穏やかに撹拌しつつ６０℃から５０℃まで１２時間、５０℃から４０℃まで６時間、さらに４０℃から１５℃まで６時間かけて冷却する擬似制御冷却法にて計２４時間で１５℃まで冷却することにより、トレハロースの二含水結晶を晶析させた。バスケット型遠心分離機で結晶を回収し、結晶をマスキット重量に対し約５％の精製水でスプレーし洗浄した後、

５０℃で２時間、熟成、乾燥し、２０℃の空気を２０分間吹き付けて冷却し、粉砕して、無水物換算でトレハロースを９９．４％、Ｄ－グルコースを０．０８％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０５％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０７％含有するトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率約４３％で得た。

【０１５４】

本トレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は９４．１％、平均結晶子径は３，３４０Å、粉末全体の還元力は０．１８％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μm以上４２５μm未満の粒子が８５．１％、粒径５３μm以上３００μm未満の粒子が７４．７％、及び、粒径４２５μm以上の粒子が５．８％含まれていた。本品を用い、実験２－２、実験３－２等と同じ方法により固結性試験を行ったところ、「固結なし」（－）と判定された。また、実験５と同じ方法により水への溶解性を試験したところ、溶解性「良」と判定された。

【０１５５】

本例の製造方法によれば、トレハロース二含水結晶含有粉末を、約４３％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、食品素材などとして市販されている従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売）と比べて、トレハロース純度においてそれほどの違いがないにもかかわらず、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて有意に固結し難い粉末であり、保存や取扱いが容易である。本品は、トレハロースの二含水結晶含有粉末である点では従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様であり、保存や取り扱いが容易である分、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、及び医薬品素材などとしてより好適に用いることができる。

【実施例３】

【０１５６】

＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

ＣＧＴａｓｅとして、実験１－２の方法で調製したパエニバチルス・パブリ　ＮＢＲＣ１３６３８株由来のＣＧＴａｓｅを用いた以外は実施例１におけると同様にしてトレハロース生成反応を行ったところ、グルコアミラーゼ処理後の反応液における無水物換算でのトレハロース含量は８６．１％であった。斯くして得た反応液を加熱し酵素を失活させ、常法により活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H^+型）及びアニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩し、減圧濃縮し、固形物濃度約８５％の濃縮液とした。これを助晶缶にとり、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）を種晶として１％加えて６０℃とし、穏やかに撹拌しつつ６０℃から４５℃まで１５時間、４５℃から２０℃まで９時間かけて冷却する２段階の擬似制御冷却法にて２４時間かけて冷却し、トレハロース二含水結晶を晶析させた。バスケット型遠心分離機で結晶を回収し、結晶をマスキット重量に対し約５％の精製水でスプレーし洗浄した後、５０℃で２時間、熟成、乾燥し、２０℃の空気を１０分間吹き付けて冷却し、粉砕して、無水物換算でトレハロースを９９．３％、Ｄ－グルコースを０．３％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０７％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．１２％含有するトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率約４３％で得た。

【０１５７】

本トレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は９３．４％、平均結晶子径は３，２１０Å、粉末全体の還元力は０．４％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μm以上４２５μm未満の粒子が７７．９％、粒径５３μm以上３００μm未満の粒子が６８．４％、及び、粒径４２５μm以上の粒子が８．８％含まれていた。本品を用い、実験２－２、実験３－２

等と同じ方法により固結性試験を行ったところ、「固結なし」（－）と判定された。また、実験５と同じ方法により水への溶解性を試験したところ、溶解性「良」と判定された。

【０１５８】

本例の製造方法によれば、トレハロース二含水結晶含有粉末を、約４３％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、食品素材などとして市販されている従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売）と比べて、トレハロース純度においてそれほどの違いがないにもかかわらず、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて有意に固結し難い粉末であり、保存や取扱いが容易である。本品は、トレハロースの二含水結晶含有粉末である点では従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様であり、保存や取り扱いが容易である分、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、及び医薬品素材などとしてより好適に用いることができる。

【実施例４】

【０１５９】

＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

原料澱粉としてタピオカ澱粉を用い、ＣＧＴａｓｅとして実験１－２の方法で得たパエニバチルス・アミロリティカス　ＮＢＲＣ１５９５７株由来ＣＧＴａｓｅを用いた以外は、実施例１と同様の方法によりトレハロース生成反応及びグルコアミラーゼ処理を行うことにより、トレハロース純度、すなわち無水物換算でのトレハロース含量が８６．２％の反応液を得た。得られた反応液を加熱し酵素を失活させ、常法により活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H^+型）及びアニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩し、減圧濃縮し、固形物濃度約８６％の濃縮液とした。これを助晶缶にとり、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）を種晶として１％加えて６０℃とし、次いで、このトレハロース含有溶液を、穏やかに撹拌しつつ６０℃から５０℃まで８時間、５０℃から３５℃まで８時間、３５℃から１５℃まで８時間かけて冷却する３段階の擬似制御冷却法にて計２４時間で１５℃まで冷却することにより、トレハロースの二含水結晶を晶析させた。バスケット型遠心分離機で結晶を回収し、結晶をマスキット重量に対し約５％の精製水でスプレーし洗浄した後、５０℃で２時間、熟成、乾燥し、２０℃の空気を２０分間吹き付けて冷却し、粉砕して、無水物換算でトレハロースを９９．２％、Ｄ－グルコースを０．０７％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０４％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０６％含有するトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率約４２％で得た。

【０１６０】

本トレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は９３．１％、平均結晶子径は３，１６０Å、粉末全体の還元力は０．１５％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が７８．８％、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子が７１．０％、及び、粒径４２５μｍ以上の粒子が８．４％含まれていた。本品を用い、実験２－２、実験３－２等と同じ方法により固結性試験を行ったところ、「固結なし」（－）と判定された。また、実験５と同じ方法により水への溶解性を試験したところ、溶解性「良」と判定された。

【０１６１】

本例の製造方法によれば、トレハロース二含水結晶含有粉末を、約４２％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、食品素材などとして市販されている従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売）と比べて、トレハロース純度においてそれほどの違いがないにもかかわらず、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて有意に固結し難い粉末であり、保存や取扱いが容易である。本品は、ト

レハロースの二含水結晶含有粉末である点では従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様であり、保存や取り扱いが容易である分、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、及び医薬品素材などとしてより好適に用いることができる。

【実施例５】

【０１６２】

＜組換え型ＣＧＴａｓｅ及び変異体ＣＧＴａｓｅの調製とそれらを用いたトレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

実施例２において用いたパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株由来のＣＧＴａｓｅに替えて、同株由来のＣＧＴａｓｅ遺伝子を大腸菌を宿主として発現させて得た組換え型（野生型）ＣＧＴａｓｅと、当該ＣＧＴａｓｅ遺伝子に常法により部位特異的変異を導入し、コードされるアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の１残基が他のアミノ酸残基に置換した変異体ＣＧＴａｓｅ２種を調製し、トレハロース二含水結晶含有粉末の製造に用いた。

【０１６３】

＜組換え型ＣＧＴａｓｅの調製＞

本発明者らがパエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株からクローニングし保有している同株由来のＣＧＴａｓｅ遺伝子（配列表における配列番号７で示される塩基配列）を用い、そのコードするアミノ酸配列を変えることなく変異させて制限酵素部位などを導入又は欠失させた後、それを発現用プラスミドベクター「ｐＲＳＥＴ－Ａ」（インビトロジェン社製）に組換え、天然型（野生型）ＣＧＴａｓｅをコードする遺伝子を含む発現用組換えＤＮＡを作成した。得られた組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ」を用いて常法により大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）（ストラタジーン社製）を形質転換し、同組換えＤＮＡを保持する形質転換体「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ」を取得した。次いで、当該形質転換体をアンピシリンＮａ塩１００μｌ／ｍｌを含むＴ培地（培地１Ｌ当り、バクトートリプトン１２ｇ、バクトーイーストエキストラクト２４ｇ、グリセロール５ｍｌ、１７ｍＭ　リン酸一カリウム、７２ｍＭ　リン酸二カリウムを含有）を用いて３７℃で２４時間好気的に培養した。培養液を遠心分離して得た菌体を超音波破砕器（商品名『Ｕｌｔｒａ　Ｓｏｎｉｃ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ　ＵＨ－６００』、エムエステー株式会社製）を用いて破砕処理し、遠心分離により得た破砕液上清についてＣＧＴａｓｅ活性（澱粉分解活性）を測定し、培養液１ｍｌ当たりに換算したところ、約１２．８単位／ｍｌの酵素活性が得られた。破砕液上清を常法に従い硫安塩析、透析することにより組換え型ＣＧＴａｓｅの粗酵素液を得た後、ＤＥＡＥ－トヨパール　６５０Ｓゲル（東ソー株式会社製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー及びブチルートヨパール　６５０Ｍゲル（東ソー株式会社製）を用いた疎水カラムクロマトグラフィーに供して精製し、組換え型ＣＧＴａｓｅの部分精製標品とした。

【０１６４】

＜変異体ＣＧＴａｓｅの調製＞

上記パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株由来の天然型（野生型）ＣＧＴａｓｅ遺伝子に、常法により部位特異的変異を導入し、得られた変異ＣＧＴａｓｅ遺伝子を大腸菌で発現させることにより、１アミノ酸置換変異体ＣＧＴａｓｅを２種調製した。なお、当該ＣＧＴａｓｅにアミノ酸置換を導入するに際しては、パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株由来ＣＧＴａｓｅのアミノ酸配列である配列表における配列番号１で示されるアミノ酸配列の、１３３番目のアスパラギン酸残基から１３８番目のヒスチジン残基（Ａｓｐ１３３～Ｈｉｓ１３８）、２２３番目のグリシン残基から２３１番目のヒスチジン残基（Ｇｌｙ２２３～Ｈｉｓ２３１）、２５５番目のグルタミン酸残基から２５８番目のロイシン残基（Ｇｌｕ２５５～Ｌｅｕ２５８）、３２１番目のフェニルアラニン残基から３２６番目のアスパラギン酸残基（Ｐｈｅ３２１～Ａｓｐ３２６）、すなわち、α－アミラーゼファミリーに分類される酵素群に共通して保存されている４つの保存領域と、２５９番目のグリシン残基から２６４番目のアスパラギン酸残基（Ｇｌｙ２６９～Ａｓｐ２６４）、３３１番目のリジン残基から３３７番目のアスパラ

ギン残基（Ｌｙｓ３３１～Ａｓｎ３３７）、３７５番目のリジン残基から３８１番目のリジン残基（Ｌｙｓ３７５～Ｌｙｓ３８１）、５６７番目のバリン残基から５７２番目のチロシン残基（Ｖａｌ５６７～Ｔｙｒ５７２）、すなわち、パエニバチルス属微生物由来ＣＧＴａｓｅに特有の前述した（ａ）乃至（ｄ）の部分アミノ酸配列へのアミノ酸置換変異は避け、これら以外の箇所から変異箇所を選択することとした。

【０１６５】

配列表における配列番号１における１７８番目のグリシン残基をアルギニン残基に置換した変異体ＣＧＴａｓｅ（Ｇ１７８Ｒ）と、４５４番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換した変異体ＣＧＴａｓｅ（Ｙ４５４Ｈ）の２種類を調製することにした。パエニバチルス・イリノイセンシス　ＮＢＲＣ１５３７９株由来の天然型（野生型）ＣＧＴａｓｅ遺伝子を保持する組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ」を鋳型に用い、配列表における配列番号８及び９でそれぞれ示される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、市販の『ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ』（ストラタジーン社製）を用いて常法のＰＣＲ法、ＤｐｎＩ法にてＣＧＴａｓｅ遺伝子に部位特異的変異を導入することにより変異ＣＧＴａｓｅ（Ｇ１７８Ｒ）をコードする組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｇ１７８Ｒ）」を得た。また、配列表における配列番号１０及び１１でそれぞれ示される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとした以外は上記と同様にして変異ＣＧＴａｓｅ（Ｙ４５４Ｈ）をコードする組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｙ４５４Ｈ）」を得た。

【０１６６】

変異体ＣＧＴａｓｅ遺伝子を保持する組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｇ１７８Ｒ）」及び「ｐＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｙ４５４Ｈ）」をそれぞれ用いて常法により大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）（ストラタジーン社製）を形質転換し、それぞれの組換えＤＮＡを保持する形質転換体「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｇ１７８Ｒ）」及び「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｙ４５４Ｈ）」を取得した。これら形質転換体を上記「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ」の場合と同様に培養し、菌体破砕した後、部分精製してそれぞれの変異体ＣＧＴａｓｅの部分精製標品を得た。因みにそれぞれの菌体破砕液上清についてＣＧＴａｓｅ活性（澱粉分解活性）を測定し、培養液１ｍｌ当たりの酵素活性に換算したところ、「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｇ１７８Ｒ）」では約１０．３単位／ｍｌ、「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＰＩ（Ｙ４５４Ｈ）」では約１３．７単位／ｍｌであった。

【０１６７】

＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞

上記で得た組換え型（野生型）ＣＧＴａｓｅ、変異体ＣＧＴａｓｅとしてのＧ１７８Ｒ（配列表における配列番号１４で示されるアミノ酸配列を有するＣＧＴａｓｅ）、又は、Ｙ４５４Ｈ（配列表における配列番号１５で示されるアミノ酸配列を有するＣＧＴａｓｅ）を用いた以外は実施例２と同様の方法によりトレハロース二含水結晶含有粉末を製造した。それぞれのＣＧＴａｓｅを用いて得られた反応液中のトレハロース含量、得られたトレハロース二含水結晶含有粉末における糖組成、対澱粉収率、トレハロース二含水結晶についての結晶化度、平均結晶子径、粉末全体の還元力、粒度分布を測定するとともに、粉末を実験２－２、実験３－２等と同じ方法による固結性試験及び実験５と同じ方法による水への溶解性試験に供した。結果を表６にまとめた。

【０１６８】

【表６】

項目			CGTase		
			組換え体（野生型）	変異体酵素 G178R	変異体酵素 Y454H
反応液におけるトレハロース含量*（質量%）			86.2	86.5	86.3
糖組成（質量%**）	トレハロース		99.4	99.3	99.4
	D-グルコース		0.08	0.07	0.07
	4-O-α-グルコシルトレハロース		0.04	0.05	0.03
	6-O-α-グルコシルトレハロース		0.07	0.06	0.08
対澱粉収率（質量%）			43	42	43
結晶化度（%）			93.3	94.5	93.1
平均結晶子径（Å）			3350	3420	3300
粉末全体の還元力（%）			0.16	0.15	0.16
粒度分布（質量%）	粒径53μm以上 425μm未満		83.1	81.6	83.1
	粒径53μm以上 300μm未満		72.1	72.3	70.5
	粒径425μm以上		8.2	7.3	6.2
固結性試験			—	—	—
水への溶解性			良	良	良

*：グルコアミラーゼ処理後

**：無水物換算

【０１６９】

表６に示すとおり、組換え型ＣＧＴａｓｅや１アミノ酸置換変異体ＣＧＴａｓｅを用いた場合であっても、酵素反応液中のトレハロース含量は天然型ＣＧＴａｓｅの場合と同等の８６．０％以上であり、同じ製造方法によれば、ほぼ同等のトレハロース二含水結晶含有粉末を、約４２％～４３％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、実施例１乃至４において天然型ＣＧＴａｓｅを用いて製造したトレハロース二含水結晶含有粉末と同様に、食品素材などとして市販されている従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売）と比べて、トレハロース純度においてそれほどの違いがないにもかかわらず、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて有意に固結

し難い粉末であり、保存や取扱いが容易である。
【実施例６】
【０１７０】
＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞
トレハロース二含水結晶の晶析工程において、汎用の晶析システム用プログラム恒温循環装置を用い、温度制御した熱媒体を助晶缶のジャッケットに流して、温度を６０℃から２０℃へ、前記式［２］に近似させた２０段階の冷却プロファイルにて２４時間かけて冷却する制御冷却法を適用することにより、トレハロース二含水結晶を晶析させた以外は、実施例２と同様の方法によりトレハロース二含水結晶含有粉末を製造し、無水物換算でトレハロースを９９．５％、Ｄ－グルコースを０．０５％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０３％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０５％含有するトレハロース二含水結晶含有粉末を対澱粉収率約４４％で得た。
【０１７１】
本トレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は９５．６％、平均結晶子径は３，４８０Å、粉末全体の還元力は０．１４％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が８２．１％、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子が７７．４％、及び、粒径４２５μｍ以上の粒子が８．１％含まれていた。本品を用い、実験２－２、実験３－２等と同じ方法により固結性試験を行ったところ、「固結なし」（－）と判定された。また、実験５と同じ方法により水への溶解性を試験したところ、溶解性「良」と判定された。
【０１７２】
本例の製造方法によれば、トレハロース二含水結晶含有粉末を、約４４％という高い対澱粉収率で製造することができる。また、本製造方法によって製造されたトレハロース二含水結晶含有粉末は、食品素材などとして市販されている従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハ』、株式会社林原販売）と比べて、トレハロース純度においてそれほどの違いがないにもかかわらず、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べて有意に固結し難い粉末であり、保存や取扱いが容易である。本品は、トレハロースの二含水結晶含有粉末である点では従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様であり、保存や取り扱いが容易である分、食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、及び医薬品素材などとしてより好適に用いることができる。
【比較例】
【０１７３】
＜トレハロース二含水結晶含有粉末の製造＞
ＣＧＴａｓｅとして、ジオバチルス・ステアロサーモフィラス　Ｔｃ－９１株由来のＣＧＴａｓｅ酵素剤（株式会社林原製）を用いた以外は実施例１におけると同様にしてトレハロース生成反応及びグルコアミラーゼ処理を行ったところ、グルコアミラーゼ処理後の反応液における無水物換算でのトレハロース含量は８２．２％であった。この反応液を、常法により活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H^+型）及びアニオン交換樹脂（OH^-型）にて脱塩し、減圧濃縮し、固形物濃度約８４％の濃縮液とした。これを助晶缶にとり、試薬級のトレハロース二含水結晶含有粉末（商品名『トレハロース　９９９』、コード番号：ＴＨ２２４、トレハロース純度９９．９％以上、株式会社林原販売）を種晶として１％加えて５５℃とした。次いで、このトレハロース含有溶液を、穏やかに撹拌しつつ５５℃から１５℃まで２０時間かけて自然冷却することにより、トレハロースの二含水結晶を晶析させた。バスケット型遠心分離機で結晶を回収し、結晶をマスキット重量に対し約５％の精製水でスプレーし洗浄した後、５０℃で２時間、熟成、乾燥し、２０℃の空気を２０分間吹き付けて冷却し、粉砕して、無水物換算でトレハロースを９８．３％、Ｄ－グルコースを０．９％、４－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．０８％、及び、６－Ｏ－α－グルコシルトレハロースを０．１２％含有するトレハロース二含水結晶

含有粉末を得たものの、その対澱粉収率は約３１％であった。
【０１７４】
本トレハロース二含水結晶含有粉末のトレハロース二含水結晶についての結晶化度は８４．８％、平均結晶子径は２，４６０Å、粉末全体の還元力は１．１％であった。因みに、上記結晶化度の測定はハーマンス法にて行い、実験４－２で求めた解析値H_{100}及びH_0を用いて行った。本品の粒度分布を測定したところ、粒径５３μｍ以上４２５μｍ未満の粒子が７６．７％、粒径５３μｍ以上３００μｍ未満の粒子が６８．８％、及び、粒径４２５μｍ以上の粒子が１１．５％含まれていた。本品を用い、実験２－２、実験３－２等と同じ方法で固結性試験を行ったところ、「やや固結あり」（±）と判定された。また、実験５と同じ方法により水への溶解性を試験したところ、溶解性「良」と判断された。
【実施例７】
【０１７５】
＜α－グリコシルトレハロース生成酵素変異体の調製＞
本発明者らがスルフォロブス・アシドカルダリウス　ＡＴＣＣ３３９０９株からクローニングし保有している天然型（野生型）α－グリコシルトレハロース生成酵素遺伝子に、常法により部位特異的変異を導入し、得られた変異α－グリコシルトレハロース生成酵素遺伝子を大腸菌で発現させることにより、１アミノ酸置換α－グリコシルトレハロース生成酵素変異体を４種調製した。
【０１７６】
市販の『ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ』（ストラタジーン社製）を用いて常法のＰＣＲ法、ＤｐｎＩ法にてα－グリコシルトレハロース生成酵素遺伝子に部位特異的変異を導入することにより、配列表における配列番号１における１９２番目のアルギニン残基をアラニン残基に（Ｒ１９２Ａ）、２７５番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に（Ｄ２７５Ａ）、４００番目のチロシン残基をセリン残基に（Ｙ４００Ｓ）、又は、４０２番目のアルギニン残基をセリン残基に（Ｒ４０２Ｓ）それぞれ置換したα－グリコシルトレハロース生成酵素変異体をコードする４種類の変異体遺伝子を調製した。
【０１７７】
この変異体遺伝子をそれぞれ保持する組換えＤＮＡ「ｐＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｒ１９２Ａ）」、「ｐＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｄ２７５Ａ）」、「ｐＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｙ４００Ｓ）」及び「ｐＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｒ４０２Ｓ）」を用いて常法により大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）（ストラタジーン社製）を形質転換し、それぞれの組換えＤＮＡを保持する形質転換体「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｒ１９２Ａ）」、「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｄ２７５Ａ）」、「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｙ４００Ｓ）」及び「ＢＬ２１－ＲＳＥＴ－ｉＳＴ（Ｒ４０２Ｓ）」を取得した。これら形質転換体をそれぞれアンピシリンＮａ塩１００μｌ／ｍｌを含むＴ培地（培地１Ｌ当り、バクトートリプトン１２ｇ、バクトーイーストエキストラクト２４ｇ、グリセロール５ｍｌ、１７ｍＭ　リン酸一カリウム、７２ｍＭ　リン酸二カリウムを含有）を用いて３７℃で２４時間好気的に培養した。培養液を遠心分離して得た菌体を超音波破砕器（商品名『Ｕｌｔｒａ　Ｓｏｎｉｃ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ　ＵＨ－６００』、エムエステー株式会社製）を用いて破砕処理し、遠心分離により得た破砕液上清についてα－グリコシルトレハロース生成酵素活性を測定した。次いで、破砕液上清を常法に従い硫安塩析、透析することによりα－グリコシルトレハロース生成酵素変異体の粗酵素液を得た後、ＤＥＡＥ－トヨパール　６５０Ｓゲル（東ソー株式会社製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー及びブチル－トヨパール　６５０Ｍゲル（東ソー株式会社製）を用いた疎水カラムクロマトグラフィーに供して精製し、α－グリコシルトレハロース生成酵素変異体の精製標品とした。
【０１７８】
得られた４種類のα－グリコシルトレハロース生成酵素変異体について酵素活性及び基質特異性を調べたところ、酵素活性は天然型（野生型）酵素の４０乃至８０％に若干低下

していたものの、基質特異性に大きな変化は認められなかった。これらα－グリコシルトレハロース生成酵素変異体は、本発明のトレハロースの製造方法において、天然型（野生型）酵素と同様に用いることができる。

【産業上の利用可能性】

【０１７９】

以上のとおり、本発明のトレハロース二含水結晶含有粉末の製造方法によれば、澱粉を原料として、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末と同様に高純度で、かつ、固結し難いトレハロース二含水結晶含有粉末を、高い対澱粉収率で製造することができる。特に、トレハロース二含水結晶の晶析工程において制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用する場合には、より高純度のトレハロース二含水結晶含有粉末を、より高い対澱粉収率で製造することができる。このように本発明の製造方法は、豊富に存在するとはいえ限られた資源である澱粉を原料として、より効率的にトレハロース二含水結晶含有粉末を工業的規模で製造することを可能にするものであり、その産業上の有用性には格別のものがある。また、制御冷却法又は擬似制御冷却法を適用する本発明の製造方法によって製造されるトレハロース二含水結晶含有粉末は、従来の食品級のトレハロース二含水結晶含有粉末に比べ有意に固結し難い粉末であり、より取り扱いが容易な粉末状の食品素材、化粧品素材、医薬部外品素材、又は医薬品素材として、各種用途に使用することができるという優れた産業上の利用可能性を有している。斯くも顕著な作用効果を奏する本発明の産業上の有用性は極めて大きい。

【符号の説明】

【０１８０】

図１において、

ａ：結晶子径の算出に用いる回折角（２θ）１３．７°（ミラー指数（ｈｋｌ）：１０１）の回折ピーク

ｂ：結晶子径の算出に用いる回折角（２θ）１７．５°（ミラー指数：２２０）の回折ピーク

ｃ：結晶子径の算出に用いる回折角（２θ）２１．１°（ミラー指数：２２１）の回折ピーク

ｄ：結晶子径の算出に用いる回折角（２θ）２３．９°（ミラー指数：２３１）の回折ピーク

ｅ：結晶子径の算出に用いる回折角（２θ）２５．９°（ミラー指数：１５０）の回折ピーク

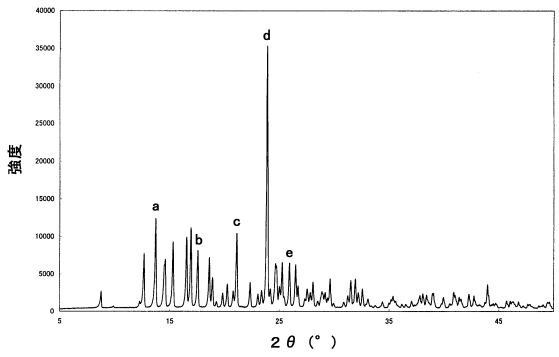
図５において、

ａ：制御冷却曲線

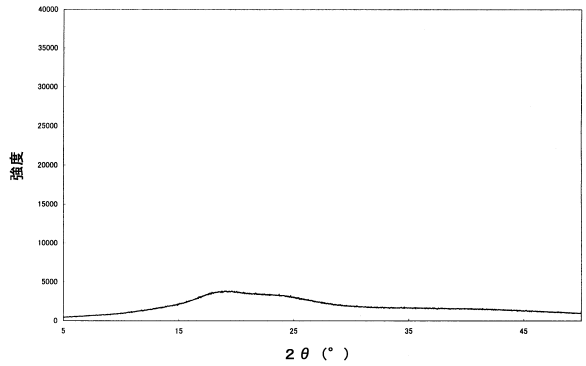
ｂ：直線冷却

ｃ：自然冷却曲線

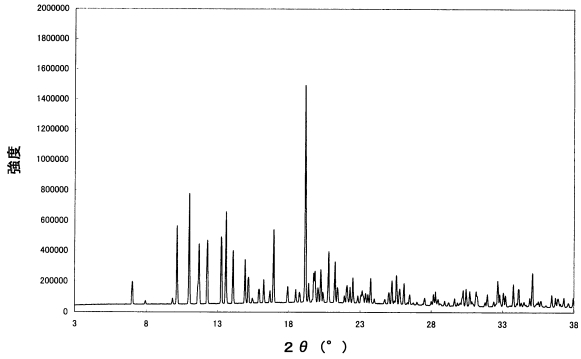
【図１】


強度
a
b
c
d
e
２θ（°）

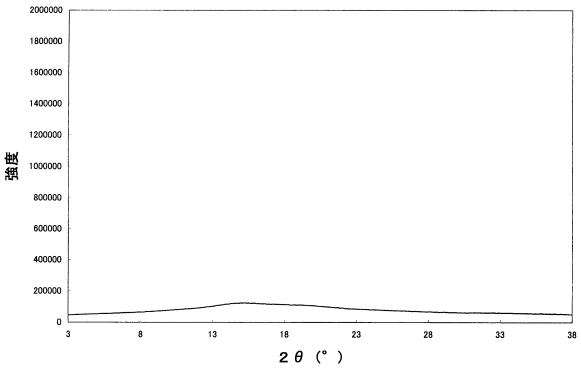
【図２】


強度
２θ（°）

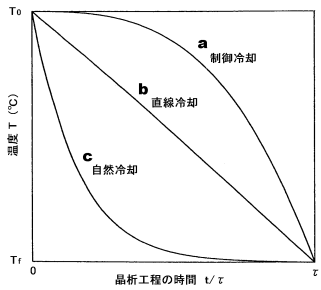
【図３】


強度
２θ（°）

【図４】


強度
２θ（°）

【図５】


T0
a
制御冷却
b
直線冷却
c
自然冷却
温度 T（℃）
Tf
0
τ
晶析工程の時間 t/τ

【配列表】
0005993674000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開２０００－２２８９８０（ＪＰ，Ａ）
特開平８－７３５０４（ＪＰ，Ａ）
特開平８－６６１８８（ＪＰ，Ａ）
特開平８－８４５８６（ＪＰ，Ａ）
特開平８－３３６３８８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　１９／００－６４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）