【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成17年10月20日(2005.10.20)

【公開番号】特開2004-65098(P2004-65098A)
【公開日】平成16年3月4日(2004.3.4)
【年通号数】公開・登録公報2004-009
【出願番号】特願2002-228705(P2002-228705)
【国際特許分類第７版】
　Ｃ１２Ｐ　19/60
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｐ　19/60

【手続補正書】
【提出日】平成17年6月27日(2005.6.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
【課題を解決するための手段】
本発明者等は、２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の製造において、その初発工程であるＬ－アスコルビン酸とα－グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素または糖転移酵素とグルコアミラーゼとを作用させる工程で得られる２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸を含有する溶液中に夾雑物である５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸を生成しないか、若しくは検出されないほど生成量を少なくすることができれば、これら直接還元性を示すＬ－アスコルビン酸糖誘導体を酸化処理するなどの除去工程を必要とすることなく、高純度の２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸高含有物を工業的規模で高収率に製造できるのではないかと考え、５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸を生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ない２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸生成反応の確立を目指して、研究を続けてきた。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１４】
更に、糖転移反応する際、該α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とＣＧＴａｓｅとを併用し糖転移反応を起こさせ、次いで、グルコアミラーゼを作用させることによって、得られる２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の生成量は、糖転移酵素としてα－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を単独で使用する場合よりも増加し、しかも、その時の５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸等の結合異性体は、糖転移酵素としてα－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を単独で使用する場合と同様に生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ないことも判明した。
【手続補正３】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
本発明に用いるα－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、例えば、国際公開番号ＷＯ０２／１０３６１号明細書に記載の如く、非還元性末端の結合様式としてα－１，４グルコシド結合を有するグルコース重合度が２以上の糖質に対して、該糖質から、還元力を実質的に増加することなくα－グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式としてα－１，６グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式としてα－１，４グルコシド結合を有するグルコース重合度が３以上の糖質を生成する酵素活性を有しており、具体例としては、下記の理化学的性質を有する酵素がある。尚、前記非還元性末端の結合様式としてα－１，４グルコシド結合を有するグルコース重合度が２以上の糖質としては、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉及びグリコーゲンから選ばれる１種又は２種以上の糖質を例示できる。
（１）　作用
非還元性末端の結合様式としてα－１，４グルコシド結合を有するグルコース重合度が２以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなくα－グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式としてα－１，６グルコシド結合を有し、この非還元末端以外の結合様式としてα－１，４グルコシド結合を有するグルコース重合度が３以上の糖質を生成する。
（２）　分子量
ＳＤＳ－ゲル電気泳動法により、約７４，０００乃至１６０，０００ダルトンの範囲内で分子量を有する。
（３）等電点
アンフォライン含有電気泳動法により、ｐＩ約３．８乃至７．８の範囲内に等電点を有する。
（４）　至適温度
ｐＨ６．０、６０分間反応で、約４０乃至５０℃の範囲内で至適温度を有する。
ｐＨ６．０、６０分間反応で、１ｍＭＣａ$^{2+}$存在下、約４５乃至５５℃の範囲内に至適温度を有する。
ｐＨ８．４、６０分間反応で、約６０℃に至適温度を有する。または、
ｐＨ８．４、６０分間反応で１ｍＭＣａ$^{2+}$存在下、約６５℃に至適温度を有する。
（５）　至適ｐＨ
３５℃、６０分間反応で、ｐＨ約６．０乃至８．４の範囲内に至適ｐＨを有する。
（６）　温度安定性
ｐＨ６．０、６０分間保持する条件で、約４５℃以下に温度安定域を有する。
ｐＨ６．０、６０分間保持する条件で、１ｍＭＣａ$^{2+}$存在下、約５０℃以下に温度安定域を有する。
ｐＨ８．０、６０分間保持する条件で、約５５℃以下に温度安定域を有する。または、
ｐＨ８．０、６０分間保持する条件で、１ｍＭＣａ$^{2+}$存在下、約６０℃以下に温度安定域を有する。
（７）　ｐＨ安定性
４℃、２４時間保持する条件で、ｐＨ約４．５乃至１０．０の範囲内に安定ｐＨ域を有する。
（８）　Ｎ末端アミノ酸配列
チロシン－バリン－セリン－セリン－ロイシン－グリシン－アスパラギン－ロイシン－イソロイシン（配列表における配列番号１）、ヒスチジン－バリン－セリン－アラニン－ロイシン－グリシン－アスパラギン－ロイシン－ロイシン（配列表における配列番号２）、

または、アラニン－プロリン－ロイシン－グリシン－バリン－グルタミン－アルギニン－アラニン－グルタミン－フェニルアラニン－グルタミン－セリン－グリシン（配列表における配列番号３）を有する場合がある。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２４】
本発明に用いるα－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、糖転移反応の供与体として、非還元性末端の結合様式がα－１，４グルコシド結合であるグルコース重合度が２以上の糖質を用いると、Ｌ－アスコルビン酸に糖転移し２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸、及び、更にこの２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸のグルコピラノシル基にα－グルコピラノシル基が１個または２個以上転移した２－Ｏ－α－グリコシル－Ｌ－アスコルビン酸を生成する。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４８】
尚、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定は、次のようにして測定する。マルトトリオースを濃度２ｗ／ｖ％となるよう１００ｍＭグリシン－ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ８．４）に溶解させ基質液とし、その基質液０．５ｍｌに酵素液０．５ｍｌ加えて、４０℃で６０分間酵素反応し、その反応液を１０分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中のマルトース含量を高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）法で定量することによって行った。α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性１単位は、上記の条件下で１分間に１μモルのマルトースを生成する酵素量と定義した。尚、ＨＰＬＣは、『Ｓｈｏｄｅｘ　ＫＳ－８０１カラム』（昭和電工株式会社製造）を用い、カラム温度６０℃、溶離液として水を用いて流速０．５ｍｌ／ｍｉｎの条件で行い、検出は示差屈折計『ＲＩ－８０１２』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４９】
【実験２】
〈α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製〉
実験１の方法で得た培養上清約１８Ｌを８０％飽和硫安液で塩析して４℃、２４時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（１０，０００ｒｐｍ、３０分間）して回収し１０ｍＭトリス・塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約８５０ｍｌを得た。この粗酵素液は、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約８，２１０単位含んでいた。この粗酵素液を『ＤＥＡＥ－トヨパール（Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ）６５０Ｓ』ゲル（東ソー株式会社製造）を用いたイオン交換クロマトグラフィー（ゲル量３８０ｍｌ）に供した。酵素活性成分は、『ＤＥＡＥ－トヨパール（Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ）６５０Ｓ』ゲルには吸着し、ＮａＣｌ濃度０Ｍから１Ｍのリニアグラジエントで溶出させたところ、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、ＮａＣｌのリニアグラジエントでその濃度が約０．２Ｍ付近で溶出した。そこで、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分を回収し、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部

分精製酵素標品を回収した。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７０】
表４の結果から明らかなように、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、アスコルビン酸への転移物として２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸のみを生成し、他の５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸は生成されなかった。一方、対照のＣＧＴａｓｅは、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とほぼ同じの２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸生成量であったが、５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の生成量は、それぞれ、０．８％、０．３％であった。
【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７５】
以上の結果から、５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び／又は６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の生成が無いか若しくは検出できない使用量のＣＧＴａｓｅを、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と併用することによって、２－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の生成率をα－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独使用の場合より増加させ、且つ、α－イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独使用の場合と同様に、５－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸及び／又は６－Ｏ－α－Ｄ－グルコピラノシル－Ｌ－アスコルビン酸の生成が無いか若しくは検出できないほどの極微量にできることが判明した。