

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年2月8日 (08.02.2001)

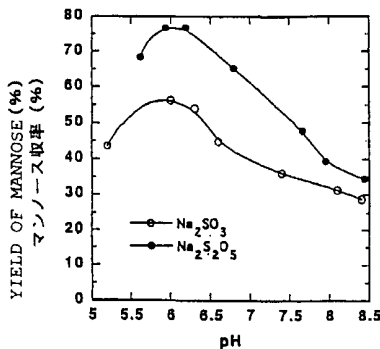
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/09366 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 19/24 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高崎義幸 (TAKASAKI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒270-0034 千葉県松戸市新松戸7丁目63番地C-109 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05176
- (22) 国際出願日: 2000年8月2日 (02.08.2000) (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ:
特願平11/252094 1999年8月2日 (02.08.1999) JP
特願2000/7455 2000年1月17日 (17.01.2000) JP
添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR ENZYMATICALLY PRODUCING MANNOSE

(54) 発明の名称: 酵素法によるマンノースの製造法



(57) Abstract: A process for efficiently producing mannose by elevating the conversion ratio of fructose into mannose in a reaction of producing mannose from fructose with the use of mannose isomerase. In this process, fructose is isomerized into mannose by using mannose isomerase in the presence of a reducing sulfur oxygen acid compound or an ammonium compound.

(57) 要約:

マンノースイソメラーゼを用いフラクトースからマンノースを製造する反応において、フラクトースからマンノースへの変換率を高め、収量よくマンノースを製造する方法を提供するために、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化する。



WO 01/09366 A1

明 細 書

酵素法によるマンノースの製造法

技術分野

この出願の発明はD-マンノース(以下、マンノースと記載する)とD-フラクトース(以下、フラクトースと記載する)を相互変換する酵素、マンノースイソメラーゼを用い、フラクトースからマンノースを高い収率で製造する方法に関するものである。さらに、詳しくは、この出願の発明は、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いて、フラクトースからマンノースを製造する方法に関するものである。

背景技術

マンノースはマンニトールの原料や、動物細胞培養の原料として広く用いられている。また、マンノースには腸内サルモネラ菌の増殖を抑制する効果があると報告されており、ニワトリなどの家禽類の飲料水や飼料に添加することが検討されている(R. H. Brown, *Feedstuff*, June 12, 10 (1989))。さらに、マンノースは様々な食品の風味を改善することでも知られており、食品素材としての利用も考えられている。

従来、マンノースの製造方法としては、木材やコンニャクなどの植物に含まれるグルコマンナンを酸分解する方法や、モリブデン酸塩を触媒としてグルコースを高温加熱処理する方法が知られていた。しかし、いずれの方法も、原料資源が不足していたり、高価な試薬や高温を要するために、コストが高いという問題があったのである。そのため、マンノースはこれまで非常に高価であった上、十分

な量が提供されていなかったのである。

発明者は、フラクトースを原料として、マンノースイソメラーゼを用い、マンノースを製造する技術や、マンノースイソメラーゼとグルコースイソメラーゼとを用いてグルコースから直接マンノースを製造する技術を確立することを目的として、鋭意研究を進めてきた。

マンノースイソメラーゼは、1956年、Palleroni と Doudoroff らにより シュードモナス・サッカロフィラ (*Pseudomonas saccharophila*) 中に初めて見いだされた (*Journal Biological Chemistry*, Vol. 218, 535 (1956))。その後、本願発明者は、キサントモナス・ルブリリネアンス (*Xanthomonas rubrilineans*) と同定した細菌 (*日本農芸化学会誌*, 第 37 巻, 524 (1963), *Agricultural Biological Chemistry*, Vol. 28, 601 (1964)) や、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属菌 (*工業技術院発酵研究所報告*, 第 28 巻, 89 (1966)) が同酵素を生産することを見出し、報告した。

さらに、発明者は、この酵素 (マンノースイソメラーゼ) の工業的利用を目的として、熱安定性に優れたマンノースイソメラーゼ生産菌の探索を行い、これまでにシュードモナス属細菌やアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属細菌の生産する耐熱性マンノースイソメラーゼを確認し、報告した (特開平 4-218370、特願平 11-1234870 他)。

しかしながら、従来のマンノースイソメラーゼによるフラクトースからマンノースへの異性化においては、収率 (異性化率) は約 25% と少なく、反応後の反応液からマンノースを分離精製することが困難であった。したがって、精製にコストを要するという問題があったのである。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解決し、フラクトースからマンノースへの異性化率を高め、高い収率で、フラクトースを製造する方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化することを特徴とするマンノースの製造方法を提供する。

また、第2には、この出願の発明は、前記のマンノースの製造方法において、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムのいずれかのアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化するマンノースの製造方法を提供する。

さらに、この出願の発明は、第3には、前記のマンノースの製造方法において、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化した後、反応液を亜硫酸型または重亜硫酸型のいずれかの陰イオン交換樹脂と接触させることにより、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物を除去し、精製するマンノースの製造方法を提供する。

そして、第4には、この出願の発明は、上記のマンノースの製造方法において、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムの存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化した後、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムを気

化させることにより反応液から除去し、精製するマンノースの製造方法をも提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本願発明の実施例 1（試験例 1）における、反応 pH とマンノースの収量の関係を示した図である。

図 2 は、本願発明の実施例 1（試験例 2）における、反応温度とマンノース収量の関係を示した図である。

図 3 は、本願の実施例 3 および実施例 4 における、基質濃度に対する亜硫酸塩添加量（モル濃度比）とマンノース収量の関係を示した図である。

図 4 は、本願発明の実施例において、亜硫酸型陰イオン交換樹脂カラムを用いたマンノースとフラクトースをそれぞれ含む糖液からの亜硫酸塩と各糖との分離を示した図である。

図 5 は、本願発明の実施例において、重亜硫酸型陰イオン交換樹脂カラムを用いたマンノースとフラクトースをそれぞれ含む糖液からの亜硫酸塩と各糖の分離を示した図である。

図 6 は、本願発明の実施例 15 において、炭酸アンモニウムを含む反応液からの炭酸アンモニウムの気化除去における処理温度の影響を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、発明の実施の形態を示し、この出願の発明について、さらに詳しく説明する。

この出願の発明は、発明者の鋭意研究により、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースからマンノースを生成する反応を、還

元性のイオウ酸素酸化合物の存在下またはアンモニウム化合物の存在下で行うことで、フラクトースからマンノースへの異性化率が顕著に高められることを見出したことによりなされたものである。

具体的には、還元性のイオウ酸素酸化合物として、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、またはメタ重亜硫酸（ピロ亜硫酸ともいう）ナトリウムの存在下、pH 5.5～7.0で反応を行うことにより、フラクトースからマンノースへの異性化率を60～90%まで高められることが確認された。

アンモニウム化合物として、例えば、炭酸アンモニウムや、硫酸ヒドロキシアンモニウムの存在下で反応を行うことにより、マンノースへの異性化率を約30～85%まで高められ、高い収率でマンノースが生産できることが確認された。さらに、これらいずれかの化合物で処理されたイオン交換樹脂の存在下で反応を行っても、マンノースへの異性化率は顕著に高められ、収率よくマンノースが生産できることが確認された。しかし、硫酸ナトリウムなどの還元性のないイオウの酸素酸を存在させてもマンノースの収率は増大しなかった。

この出願の発明は、以上の知見に基づいてなされたものである。

この出願の発明のマンノースの製造方法において使用されるマンノースイソメラーゼは、前述のキサントモナス（*Xanthomonas*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属、ストレプトマイセス（*Streptomyces*）属等の菌から、例えば、日本農芸化学会誌、第37巻、524-528（1963）、*Agricultural Biological Chemistry*, Vol. 28, No. 9, 601-604（1964）、*Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 76, No. 3, 237-239（1993）、工業技術院発酵研究所報告、第28巻、89頁（1965）

、特開平4-218370などに記載された方法に従い、ポリペプトンなどの有機窒素源やグルコースなどの有機炭素源を含む液体培地において、30℃で1～3日間培養することにより得られる。マンノースイソメラーゼは、培養後の菌を遠心分離した菌体として、または菌体から超音波処理法または自己消化法により抽出し、遊離酵素として得られる。さらには、マンノースイソメラーゼは、菌体または遊離酵素を公知の方法により固定化した酵素としても使用できる。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、マンノースの収率は、選択する還元性のイオウ酸素酸化合物やアンモニア化合物の種類に大きく影響される。

還元性のイオウ酸素酸化合物としては、亜硫酸ナトリウム(Na_2SO_3)、亜硫酸カリウム(K_2SO_3)、メタ重亜硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (ピロ亜硫酸ナトリウムまたは二亜硫酸ナトリウムともいう)、メタ重亜硫酸カリウム($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (ピロ亜硫酸カリウムまたは二亜硫酸カリウムともいう)、重亜硫酸ナトリウム(NaHSO_3)、重亜硫酸カリウム(KHSO_3)、次亜硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)、次亜硫酸カリウム($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_4$)などの水溶性の塩が例示されるが、中でも亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウムが高い反応率でマンノースを与え、好ましい。異性化率の面では、とくに、メタ重亜硫酸ナトリウムが好ましい。

また、この出願の発明のマンノースの製造方法においては、上記の還元性のイオウ酸素酸化合物のイオンを結合したイオン交換樹脂を用いてもよい。このような還元性のイオウ酸素陰イオンを結合させるためのイオン交換樹脂は、とくに限定されないが、アンバーライト (Amberlite) IRA-400 (ローム&ハース社製)、ダウエックス

(Dowex) 1-X8 (ダウ・ケミカル社製) などの強塩基性陰イオン交換樹脂やこれと陽イオン交換樹脂との混合樹脂 (例えば、アンバーライト MB-1) などが例示される。混合樹脂は反応液の pH を望ましい領域に維持するのに効果的であり、好ましい。このように、陰イオン交換樹脂を用いる場合においても、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、およびメタ重亜硫酸ナトリウムで処理した場合が最も高い収率でマンノースが得られ、好ましい。

これらの陰イオン交換樹脂の処理方法はとくに限定されないが、例えば、陰イオン交換樹脂を水酸化ナトリウムで OH 型とした後、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、あるいはメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元性のイオウ酸素酸化合物で処理し、水洗する方法があげられる。また、陰イオン交換樹脂の大きさ等は、とくに限定されないが、メッシュが小さいほど樹脂あたりの基質量を多くすることができ、効率よくマンノースを製造することができる。

このようにして得られた還元性のイオウ酸素酸化合物結合陰イオン交換樹脂をフラクトースとマンノースイソメラーゼを含む反応液と接触させる方法としては、種々のものが考慮される。例えば、還元性のイオウ酸素酸化合物結合陰イオン交換樹脂をカラムに充填し、反応液を通過させてもよいし、反応液中に還元性のイオウ酸素酸化合物結合陰イオン交換樹脂を浸漬させてもよい。

さらに、この出願の発明のマンノースの製造方法では、還元性のイオウ酸素酸化合物の代わりに、アンモニウム化合物を用いてもよい。このようなアンモニウム化合物としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、燐酸二アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)、燐酸二水素アンモニウム ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)、炭酸水素アンモニウム (NH_4HCO_3)、炭酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$)、ヒドロキシルアンモニウム (ヒドロキ

シアミンともいう、 (NH_2OH) 、塩化ヒドロキシアンモニウム、硫酸ヒドロキシアンモニウムなどの化合物が例示される。さらに、これらの化合物のいずれかによって処理された陽イオン交換樹脂を用いてもよい。

アンモニウム化合物イオンを結合させるイオン交換樹脂としては、特に限定されないが、例えば、アンバーライト (Amberlite) IR-120、アンバーライト IRC-50 (以上、ローム&ハース社製)、ダウエックス (Dowex) 50-X8 (ダウ・ケミカル社製) などの陽イオン交換樹脂や陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂との混合樹脂などが適用される。

これらの陽イオン交換樹脂の処理方法はとくに限定されないが、陽イオン交換樹脂を水酸化ナトリウムでNa型または塩酸でH型とした後、前記のアンモニウム塩またはヒドロキシアンモニウム塩で処理し、水洗する方法が例示される。また、陽イオン交換樹脂の大きさ等は、とくに限定されないが、メッシュが小さいほど樹脂あたりの基質量を多くすることができ、効率的にマンノースを製造することが可能となるため好ましい。

このようにして得られたアンモニウム化合物結合陽イオン交換樹脂を、フラクトースとマンノースイソメラーゼを含む反応液に接触させる方法としては、種々の方法が考えられる。例えば、アンモニウム化合物結合陽イオン交換樹脂をカラムに充填し、反応液を通過させてもよいし、反応液中にアンモニウム化合物結合陽イオン交換樹脂を浸漬させてもよい。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、還元性のイオウ酸素酸化物やアンモニウム化合物以外にも、ヒドラジンまたはこれにより処理された陽イオン交換樹脂を使用してもマンノースの収率を

高めることができる。しかし、前記の還元性のイオウの酸素酸化合物やアンモニウム化合物は、食品添加物として使用されており、安全性において優れているためより好ましい。

これらの化合物の添加量は、その種類、反応時の原料基質の濃度、あるいは目的とするマンノースへの異性化率により異なる。すなわち、原料基質に対する化合物の添加量が多くなるにつれて、マンノースへの異性化率が増加するのである。例えば、原料基質濃度10%以上では、当該化合物を基質モル濃度の約1~2倍モル濃度添加することにより、反応液中のマンノース含量を、これまでの約25%程度から40~90%まで増加することができる。

この出願の発明のマンノースの製造方法においては、以上のとおりの化合物を添加するタイミングは、反応開始時であっても、反応開始後、マンノースがある程度(10~25%)生成した時点であってもよい。この出願の発明のマンノースの製造方法では、添加される化合物によるマンノースイソメラーゼ反応の阻害はあまり大きくないため、化合物を反応の最初から添加しても高い収率でマンノースを得ることができるのである。

さらに、反応のpHは、とくに限定されないが、還元性のイオウの酸素酸化合物を使用する場合には、pHがマンノースの収率に著しく影響する。マンノースイソメラーゼの最適pHは、pH8付近であるが、種々の還元性のイオウの酸素酸化合物を使用する場合には、最適pHは、生成する複塩の安定性と関連していると考えられ、添加する化合物によって異なるため、基質濃度や目標とするマンノースの収率に応じて適宜設定できる。好ましくは、pH5~8付近とする。

一方、アンモニウム化合物を使用する反応においては、pHによ

る顕著な影響は認められておらず、その値はとくに限定されないが、好ましくはpH 5.5～9とする。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、反応温度もマンノースの収率に影響する。したがって、高い収率を与える40～60℃で反応が行うことが好ましい。もちろん、これ以外の温度範囲で行なってもよい。

さらに、この出願の発明のマンノースの製造方法においては、還元性イオウ酸素酸雰囲気では酸素の存在によってマンノースの収率が低下する可能性があるため、できるだけ不活性雰囲気下で反応を行うことが好ましい。例えば窒素ガスやヘリウムガス雰囲気下で反応を行うこともできる。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、添加した還元性のイオウ酸素酸化合物やアンモニウム化合物などの化合物を除去し、精製することにより、より純度を高めることができる。

これまでに、マンノースが重亜硫酸ナトリウム(NaHSO_3)と複合体を形成する性質を利用したマンノースの分離精製法が報告されている(特公昭63-21678)。これは、重亜硫酸ナトリウムが示す強い酸性(pH 3.5以下)条件下で、安定な結晶性複合体が形成される性質を利用したもので、遠心分離により結晶を分離し、過酸化水素により重亜硫酸を硫酸に酸化することにより、遊離マンノースを与える。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、従来のような強酸条件を用いることなく、高い収率でマンノースを得ることが可能となる。具体的には、pH 6付近で認められる還元性のイオウ酸素酸化合物とマンノースとの弱い親和性を利用し、マンノースイソメラーゼの存在下で、フラクトースをマンノースに変換しながら、マン

ノースの収率を高めることができるのである。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、生成されたマンノースと添加した還元性のイオウ酸素酸化合物やアンモニウム化合物等の塩を分離精製する方法としては、例えば、塩化カルシウムを添加して塩をカルシウム塩として沈殿させ、不溶性の塩として除去する方法、陽イオン交換樹脂や陰イオン交換樹脂、またはイオン交換膜を用いた電気透析法によって除去する方法、カルシウムなどの金属イオンを結合した陽イオン交換樹脂や、亜硫酸 (SO_3^-) 型または重亜硫酸 (HSO_3^-) 型の陰イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーによる方法などが例示される。また、一般に、イオウ酸素酸化合物の塩 (亜硫酸塩) はアルコールに溶解難いことから、イオウ酸素酸化合物の塩を含む反応液にアルコールを添加して塩を分離除去することもできる。以上例示された種々の精製方法の中でも、とくに亜硫酸型、または重亜硫酸型の陰イオン交換樹脂を用いる方法が分離効率が高く、好ましい。

亜硫酸型、または重亜硫酸型の陰イオン交換樹脂と反応液を接触させる方法としては、反応液に添加した化合物と同じ化合物で処理した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに反応液を通してよいし、該イオン交換樹脂を反応液に浸漬させてもよい。さらには、該イオン交換樹脂と固定化マンノースイソメラーゼをカラムに充填し、pHを調整し、連続的にフラクトースまたはフラクトース含有液を流してもよく、このような方法を用いることにより、フラクトースからのマンノースへの転換を高めることも可能となる。

さらに、この出願の発明のマンノースの製造方法では、反応において、アンモニウム化合物として揮発性の高い炭酸アンモニウムや重炭酸アンモニウムが使用される場合には、反応液を加熱すること

により、反応液からアンモニウム化合物のみを除去、回収することができる。しかし、フラクトースなどの糖は、加熱により分解、着色しやすいため、処理は減圧下で行うことが好ましい。減圧することにより、40℃のような比較的低温下においても、短時間で、完全にアンモニウム化合物を気化させ、除去することが可能となる。このとき、アンモニウム化合物の除去効率は減圧の程度によっても異なるが、必ずしも高度の減圧は必要でなく、30 mmHg 程度の減圧でも十分目的を達成することができる。

この出願の発明のマンノースの製造方法では、以上とおりの方法によって分離された亜硫酸塩、アンモニウム塩、および残存した原料のフラクトースは再利用することができる。また、反応液は、そのままマンニトール製造の原料として使用することができる。

さらに、この出願の発明のマンノースの製造方法では、原料基質としては、フラクトースのみならず、フラクトースとマンノースの混合糖液（フラクトース75～100%、マンノース0～25%）や異性化糖や転化糖などのフラクトース含有液も使用できる。

また、この出願の発明のマンノースの製造方法では、酵素としてマンノースイソメラーゼだけでなく、グルコースイソメラーゼを組み合わせて反応を行うことも可能である。つまり、原料基質として、グルコースや、異性化糖、転化糖のようなグルコース含有液を使用し、直接マンノースを得ることもできるのである。

以下、実施例を示し、この出願の発明をより詳しく説明する。なお、この出願の発明は以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

実施例

以下の実施例において、酵素活性は、次の方法により測定した。
<酵素活性の測定方法> 0.1 Mのリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した0.2 Mのマンノース液0.5 mlに、適当量の酵素を加え、水で全量を1.0 mlとし、50°Cで反応した。0.5 M過塩素酸溶液を加えて反応を止め、生成したフラクトースをシステイン-カルバゾール法で定量した。この条件で、1分間に1 μMのフラクトースを生成する酵素量を1単位とした。

<実施例 1 >

ポリペプトン2%、グルコース1%、酵母エキス0.2%、 K_2HPO_4 0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%からなる培地 (pH 6) 200 mlを1 Lの三角フラスコに入れ、121°Cで15分間加圧殺菌後、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) IF012664 (ATCC-4718) を接種し、30°Cで3日間振盪培養した。

培養後、菌体を遠心分離により回収し、水洗後、蒸留水に懸濁した。その一部について20 K C超音波細胞破碎機で細胞を破碎し、抽出されたマンノースイソメラーゼ活性を測定したところ、懸濁液1 ml当たり0.7単位の該酵素が含まれていた。

以下、この菌体懸濁液を用いて実験を行った。

試験例 1

調製したマンノースイソメラーゼを用い、亜硫酸ナトリウム存在下の反応における、マンノースの収率と反応pHの関係について調べた。

40%フラクトース溶液0.45 ml (160 mg、0.9 M) に亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) 100 mg (0.8 M) と上記のマンノースイソメラーゼ0.1 ml (0.07単位) を加え、蒸留水

で全量約 1 ml とし、50℃で 20 時間反応を行った。反応液中のマンノース含量は高速液体クロマトグラフィーにより定量した。結果を表 1 と図 1 に示す。

表 1

反応pH	マンノース収量 (%)
4.6	26.1
5.2	43.6
6.0	56.3
6.3	54.1
6.6	44.9
6.8	41.5
7.4	36.1
8.1	31.2
8.4	28.7

表 1 と図 1 から明らかなように、マンノースの収率は反応時の pH に著しく影響を受け、マンノースの収率が最大となる最適 pH は 6 付近であることが確認された。

なお、亜硫酸ナトリウムを存在させなかった反応 (pH 7.0、50℃) のマンノース収率は 25.4% であった。

試験例 2

試験例 1 と同様に、亜硫酸ナトリウムを存在させ、マンノースイソメラーゼによるフラクトースからのマンノースの異性化反応を行ない、マンノースの収率と反応温度の関係について調べた。

試験例 1 で使用した 40% 基質溶液 0.40 ml (160 mg、0.9 M) に亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) 100 mg (0.8 M 量) とマンノースイソメラーゼ 0.1 ml (0.07 単位) を加え、蒸

留水で全量約 1 ml (pH 約 6.0) とし、各温度で 20 時間反応を行った。

生成したマンノースを高速液体クロマトグラフィーにより定量した。結果を表 2 と図 2 に示す。

表 2

温度 (°C)	マンノース収量 (%)
31	39.5
35	42.6
40	44.2
45	47.6
50	47.6
55	47.2
60	44.4

実施例において使用したマンノースイソメラーゼの活性については、最適温度が約 60°C であったものの、表 2 および図 2 から、マンノースの収率は反応温度にも影響を受け、この反応においては、45~55°C の温度が最適であることが示された。

試験例 3

前記試験例 1 および 2 と同条件で、亜硫酸ナトリウムを存在させたマンノースの生成反応を行ない、原料基質（フラクトース）濃度の影響を試験した。

フラクトースと亜硫酸ナトリウムを、表 3 に示した各濃度になるように加え、これにマンノースイソメラーゼ 0.2 ml (0.14 単位) を加えた後、pH を約 6.0 に調整し、蒸留水で全量約 1 ml として 50°C で 20 時間異性化反応を行った。

反応液中のマンノース量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した。結果を表3に示す。

表3

基質濃度 (M)	亜硫酸ナトリウム (M)	マンノース収量 (%)
0.1	0.1	38.6
0.5	0.5	42.4
1.0	1.0	46.8
1.8	1.8	49.2

いずれも原料基質（フラクトース）と亜硫酸ナトリウムが等モル濃度存在する反応であるが、反応液中のマンノース含量は、基質濃度が高くなるにしたがい増加する傾向にあった。すなわち、高基質濃度下で反応を行う方が、亜硫酸ナトリウム当たりのマンノース収率を高めることができることが示された。

<実施例2>

実施例1と同様の方法で、亜硫酸ナトリウムの代わりに、メタ重亜硫酸ナトリウム（ピロ亜硫酸ナトリウムまたは二亜硫酸ナトリウムともいう： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ）を使用して、pH 5.6から8.2で異性化反応を行った。

実施例1で使用した基質溶液0.45ml（180mg）に、メタ重亜硫酸ナトリウム270mg、マンノースイソメラーゼ0.1ml（0.07単位）を添加し、50℃で45時間反応を行った。

得られた結果を表4と図1に示す。

表 4

反応pH	マンノース収量 (%)
5.6	62.4
5.9	73.3
6.6	65.0
7.3	53.2
7.6	44.3
8.2	43.2

表 4 と図 1 から明らかなように、メタ重亜硫酸塩存在下での反応においても、亜硫酸ナトリウムと同様に、最適 pH は 6 付近に認められた。

<実施例 3 >

原料基質（フラクトース）に対する亜硫酸ナトリウム量を変化させ、実施例 1 および 2 と同様の方法で反応を行った。

実施例 1 で使用した 40% フラクトース溶液 0.45 ml (180 mg) に、亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) を表に示した各量添加し、マンノースイソメラーゼ 0.1 ml (0.07 単位) を加えて全量約 1 ml とし、pH 約 6.0、50°C で 20 時間反応を行った。

反応液中のマンノース量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した結果を、表 5 および図 3 に示した。

表 5、および図 3 より、原料基質に対する亜硫酸ナトリウム量が多くなるに従い、マンノース量が増加することが示された。基質に対し亜硫酸ナトリウムを 1.5 倍量（モル濃度）添加したときには、フラクトースの約 55% がマンノースに異性化され、2.0 倍量添加したときには、フラクトースの約 59% がマンノースに異性化

された。

表 5

Na ₂ SO ₃ /基質濃度 (M/M)	マンノース収量 (%)
0	25.4
0.25	34.2
0.50	47.0
1.00	51.3
1.25	53.5
1.50	55.0
2.00	58.7

< 実施例 4 >

実施例 3 と同様の反応を、亜硫酸ナトリウムの代わりに、メタ重亜硫酸ナトリウムを用いて行った。

実施例 1 で使用した 40% フラクトース溶液 0.45 ml (180 mg) にメタ重亜硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₅) を表に示した量添加し、実施例 1 で調製したマンノースイソメラーゼ 0.1 ml (0.07 単位) を加え、pH 約 6.0 に調整して、50℃で 20 時間反応を行った。

反応液中のマンノース含量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した結果を表 6 と図 3 に示した。

原料基質に対するメタ重亜硫酸ナトリウム添加量が多くなるに従い、反応液中のマンノース含量は次第に増加し、1 モル量の基質に対し、メタ重亜硫酸ナトリウムを、それぞれ 1.5 倍、1.75 倍、および 2.0 倍モル量添加したとき、反応液中のマンノース含量は、それぞれ、約 75%、約 80%、約 83% となった。

表 6

Na ₂ S ₂ O ₅ /基質濃度 (M/M)	マンノース収量 (%)
0	25.4
1.00	66.9
1.25	70.5
1.50	75.4
1.75	79.7
2.00	83.1

以上の結果より、メタ重亜硫酸ナトリウムは亜硫酸ナトリウムよりも高い異性化率でフラクトースをマンノースに異性化できることが示された。

<実施例 5 >

実施例 1 で使用した 40% フラクトース溶液 0.2 ml (80 mg)、0.4 ml (160 mg)、あるいは 0.8 ml (320 mg) に、マンノースイソメラーゼ 0.1 ml (0.07 単位) と蒸留水を加え、全量約 1 ml とした後、それぞれに亜硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₅) で処理した亜硫酸型ダウエックス (Dowex) 1-X8 を各 1 g (湿量) 添加し、pH 約 6.0、40°C で 20 時間反応を行った。

反応後、反応液中のマンノース量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、結果を表 7 に示した。

亜硫酸型陰イオン交換樹脂存在下での反応においても、マンノースの増加が認められた。

表7

ダウエックス1-X8 (湿 g)	基質濃度 (mg)	マンノース収量 (%)
無添加	160	25.0
1	80	49.5
1	160	38.0
1	320	30.2

<実施例6>

強酸性陽イオン交換樹脂と強塩基性陰イオン交換樹脂の等量混合物であるアンバーライト MB-1 イオン交換樹脂（ローム&ハース社製造、オルガノ株式会社販売）をメタ重亜硫酸ナトリウムで処理し、カラムに充填（径2.0cm×長さ2.5cm）し、これに、実施例1で使用した40%フラクトース溶液2.5mlとマンノースイソメラーゼ0.5ml（0.35単位）を加え、pHを6.0～6.2に調整しながら、50℃で反応を行なった。

5時間反応後、反応液中のマンノース含量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した結果、フラクトースの38.5%がマンノースに異性化されていた。

なお、該イオン交換樹脂は再生せずに再利用することができた。

<実施例7>

グルコースを原料基質とし、マンノースイソメラーゼとグルコースイソメラーゼの存在下で、マンノースの生産を行った。

グルコース180mg（1M量）、亜硫酸ナトリウム189mg（1.5M量）、0.1M MgSO₄ 0.05ml（0.005M量）、市販の固定化グルコースイソメラーゼ剤（ナガセ生化学工業株式会社製造）20mg、実施例1で調製したマンノースイソメラーゼ0

1 ml (0.07 単位) を加え、蒸留水で全量約 1 ml とし、pH 6.0 ~ 6.2、50 °C で 20 時間反応を行った。

反応液中のマンノース、フラクトース、およびグルコースの含量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した結果、それぞれ、29.5%、26.7%、43.8% であった。すなわち、亜硫酸ナトリウム無添加の場合のマンノースの収率 12.0% に比べ、2 倍以上 (29.5%) のマンノースを含む糖液が得られた。

< 実施例 8 >

実施例 4 で調製したマンノース約 75% とフラクトース約 25% の割合で含む約 1 M の糖液 1 ml を 40 °C に保温した亜硫酸 (SO_2) 型ダウエックス 1-X8 カラム (径 1.5 cm × 長さ 25 cm) に供給し、水で溶出した (流速約 8 ml/時、分画容量、約 2 ml)。得られた結果を図 4 に示した。

図 4 から明らかなように、塩と糖をほぼ完全に分離することができた。

図 5 は、前記亜硫酸型ダウエックス 1-X8 の代わりに重亜硫酸 (HSO_3) 型ダウエックス 1-X8 カラム (径 1.5 cm × 長さ 25 cm) を用いて、塩と糖の分離を行った (流速約 8 ml/時、分画容量約 2 ml) 結果を示した図である。

図 5 から明らかなように、マンノースをフラクトースと塩からほぼ完全に分離することができた。

亜硫酸 (SO_2) 型の陰イオン交換樹脂カラムを用いた場合よりも、重亜硫酸 (HSO_3) 型の陰イオン交換樹脂を用いた場合の方が、より完全な分離が達成できることが確認された。

また、亜硫酸塩や重亜硫酸塩以外のイオウの酸素酸塩やアンモニウム塩を含む糖液からも同様にそれぞれを分離することができた。

<実施例 9>

64%フラクトースと16%マンノースからなる80%の糖液（マンノース含量20%、フラクトース含量80%）0.2ml（160mg）に、塩化アンモニウム、磷酸アンモニウム、または炭酸アンモニウムを各々50mg、および酵素液を0.15ml（0.11単位）加え、蒸留水で全量約1mlとした後、45℃で20時間反応を行った。

反応液中のマンノース含量を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、結果を表8に示した。

表8

アンモニウム塩	マンノース収量 (%)
無添加	25.5
塩化アンモニウム	29.5
硫酸アンモニウム	41.0
磷酸一アンモニウム	35.0
炭酸アンモニウム	36.1

表8から明らかなように、アンモニウム化合物無添加の場合のマンノースの収率が25.5%であるのに対し、いずれのアンモニウム化合物を添加した場合も、マンノースの収率が顕著に増加した。

<実施例 10>

実施例9で使用した基質溶液0.22ml（180mg、1.0M量）に、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムを、無添加、0.25M、0.5Mまたは1M量と、酵素液（0.15ml、0.11単位）を添加し、蒸留水で全量約1ml（pH約7.0）とし、50℃で20時間反応を行った。反応後

、生成したマンノースを高速液体クロマトグラフィーにより定量し、結果を表 9 に示した。

表 9

アンモニウム塩	添加量 (M)	マンノース収量 (%)
対照(無添加)		25.5
硫酸アンモニウム	0.25	27.6
	0.50	31.5
	1.00	32.1
重碳酸アンモニウム	0.25	28.4
	0.50	30.1
	1.00	36.7
炭酸アンモニウム	0.25	31.2
	0.50	35.5
	1.00	42.0
	1.50	54.8
	2.00	53.4

表 9 から明らかなように、試験したいずれのアンモニウム化合物も添加量が増加するにつれて、マンノース収率が増加し、基質濃度の 1.5 倍量の炭酸アンモニウムを添加した場合のマンノースの収率は約 55% であった。

<実施例 11>

本実施例においては、アンモニア化合物として、ヒドロキシアンモニウム塩を使用した場合について記す。

実施例 9 で使用した基質溶液 0.2 ml (160 mg) に、塩化ヒドロキシアンモニウムまたは硫酸ヒドロキシアンモニウムを 0.5 M または 1.0 M 量と、該マンノースイソメラーゼ液 0.15 ml

l (0.11 単位) 加え、蒸留水で全量約 1 ml とし、45 °C で 20 時間反応を行った。

反応液中のマンノース含量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した結果を表 10 に示した。

表10

ヒドロキシアンモニウム塩	添加量 (M)	マンノース収量 (%)
無添加	0.0	25.5
塩化ヒドロキシアンモニウム	0.5	47.3
	1.0	61.5
硫酸ヒドロキシアンモニウム	0.5	74.0
	1.0	55.3

表 10 から明らかなように、ヒドロキシアンモニウム塩添加によりマンノース収率は顕著に増加し、マンノース含量 60 ~ 75 % の糖液が得られた。

<実施例 12>

アンモニウム化合物として、塩化アンモニウム、ヒドロキシアンモニウムまたはヒドラジンで処理した陽イオン交換樹脂を用いて反応を行なった。

アンバーライト IR-120 (ロームアンドハース社製造、約 30 メッシュ) を 1 N 塩酸で H 型とし、塩化アンモニウム、ヒドロキシアンモニウムまたはヒドラジンで処理した後、蒸留水で洗浄した樹脂、それぞれ 1 g (湿量) を試験管に採り、実施例 9 で使用した原料基質溶液 0.2 ml (160 mg) とマンノースイソメラーゼ液 0.15 ml (0.11 単位) 加え、全量約 1 ml とし、45 °C で 20 時間反応を行った。結果を表 11 に示した。

表11

使用イオン交換樹脂の種類	マンノース含量 (%)
対照(樹脂無添加)	25.8
塩化アンモニウム処理	34.8
ヒドロキシアンモニウム処理	58.0
ヒドラジン処理	56.9

表11から明らかなように、アンモニウム型、ヒドロキシアンモニウム型、ヒドラジン型陽イオン交換樹脂のいずれにおいても、反応液との接触により、マンノース収率の顕著な増加が見られた。

<実施例13>

実施例12で使用したヒドロキシアンモニウム処理アンバーライト IR-120 各1g(湿量)、原料基質溶液0.1ml(80mg)、0.2ml(160mg)、0.3ml(240mg)、0.4ml(320mg)または0.5ml(400mg)、および酵素液0.15ml(0.11単位)を加えて、全量約1mlとし、45℃で20時間反応を行った。

得られた結果を表12に示した。

表12

イオン交換樹脂量 (g. 湿量)	基質量 (mg)	マンノース含量 (%)
対照(無添加)		25.8
1	80	58.5
1	160	53.1
1	240	53.8
1	320	44.3
1	400	29.0

表 1 2 から、樹脂当たりの基質量を適量（樹脂湿量 1 g 当たり基質約 8 0 m g）とすることにより、マンノース含量約 5 9 % の糖液が得られることが確認された。

<実施例 1 4 >

アンバーライト IRC-50（約 3 0 メッシュ、ローム&ハース社製造）を 1 N 塩酸で H 型とし、塩化アンモニウムまたはヒドロキシアンモニウム塩酸塩でそれぞれ処理した後、蒸留水で洗浄したもの各 1 g（湿量）を試験管に採り、実施例 1 で使用した原料基質溶液 0. 2 m l（1 6 0 m g）と該酵素液 0. 1 m l（0. 1 1 単位）を加えて、全量約 1 m l とし、4 5 °C で 2 0 時間反応を行った。

結果を表 1 3 に示した。

表 1 3

イオン交換樹脂の型	マンノース含量 (%)
対照（樹脂無添加）	25.6
アンモニウム型	30.7
ヒドロキシアンモニウム型	74.7

表 1 3 から、アンモニウム型またはヒドロキシアンモニウム型弱酸性陽イオン交換樹脂を使用した場合もマンノースの収率を顕著に増加できることが確認された。

<実施例 1 5 >

マンノース 6. 8 %、フラクトース 2. 2 % と炭酸アンモニウム 1 0. 0 % を含む反応液 2 m l を試験管（径 1 4 m m × 長さ 1 0 0 m m）に採り、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、8 0 または 1 0 0 °C の各温度で加熱した。経時的に、一定量を採り、密度計により残存している炭酸アンモニウム量を求めた。得られた結果を表 1 4 と

図 6 に示す。

表 1 4 と図 6 から、60℃以上の温度で加熱することにより、炭酸アンモニウムを気化させ、生成物（マンノース）溶液から分離、除去できることが確認された。

表 14

処理時間(分)	残存している炭酸アンモニウム量(%)						
	処理温度						
	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃	80℃	100℃
0	100	100	100	100	100	100	100
5							56
10							49
30	99	97	90	77	89	77	34
60	96	96	86	67	86	67	
90	92	89	79	57	78	57	
120	86	87	72	56	74	54	

<実施例 1 6 >

実施例 1 5 で使用したマンノース 6.8%、フラクトース 2.2% と炭酸アンモニウム 10.0% からなる反応液 5 ml を 100 ml 容の濃縮フラスコに入れ、40、50、60、70、および 80℃の各温度のもと、30 mmHg の減圧下で濃縮処理した。

水分が蒸発したところで、同容量の蒸留水を加え、濃縮を繰り返した。各処理時（3～5分）に、採取した試料について、密度計により残存している炭酸アンモニウム量を求めた。

得られた結果を表 1 5 に示した。

表 1 5 から、この方法により、炭酸アンモニウムを、比較的低温で、短時間に、かつ効果的に気化させ、反応液から完全に分離除去できることが明らかになった。

表 15

処理温度 (°C)	残存している炭酸アンモニウム量(%)		
	1回目処理	2回目処理	3回目処理
40	34	16	4
50	40	16	6
60	19	4	0
70	4	0	0
80	4	0	0

産業上の利用可能性

以上、詳しく説明したとおり、この出願の発明のマンノースの製造方法によって、従来のマンノースイソメラーゼを用いた反応においては、約25%という低い収率でのみ製造可能であったマンノースの収率を、90%以上まで高めることができる。

したがって、この出願の発明のマンノースの製造方法を用いることにより、フラクトースからマンノースやマンニトールを大量に、安価に、製造することが可能となる。

請求の範囲

1. 還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化することを特徴とするマンノースの製造方法。
2. 炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムのいずれかのアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化する請求項1のマンノースの製造方法。
3. 請求項1のマンノースの製造方法において、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物の存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化した後、反応液を亜硫酸型または重亜硫酸型のいずれかの陰イオン交換樹脂と接触させることにより、還元性のイオウ酸素酸化合物またはアンモニウム化合物を除去し、精製するマンノースの製造方法。
4. 請求項2のマンノースの製造方法において、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムの存在下で、マンノースイソメラーゼを用いてフラクトースをマンノースに異性化した後、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウムを気化させることにより反応液から除去し、精製するマンノースの製造方法。

図 1

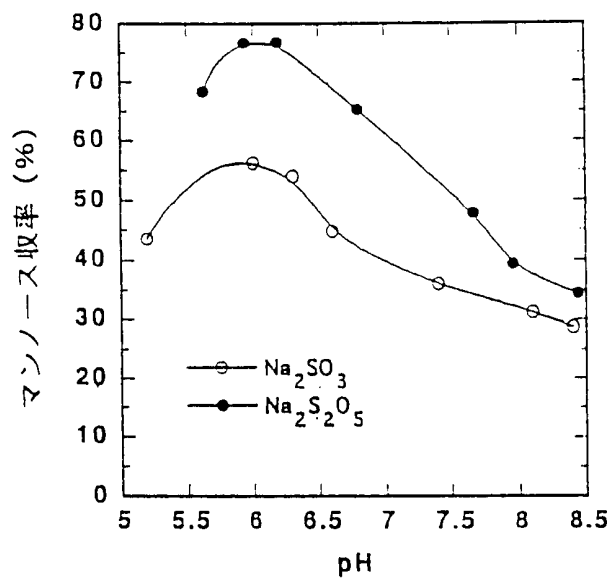


図 2

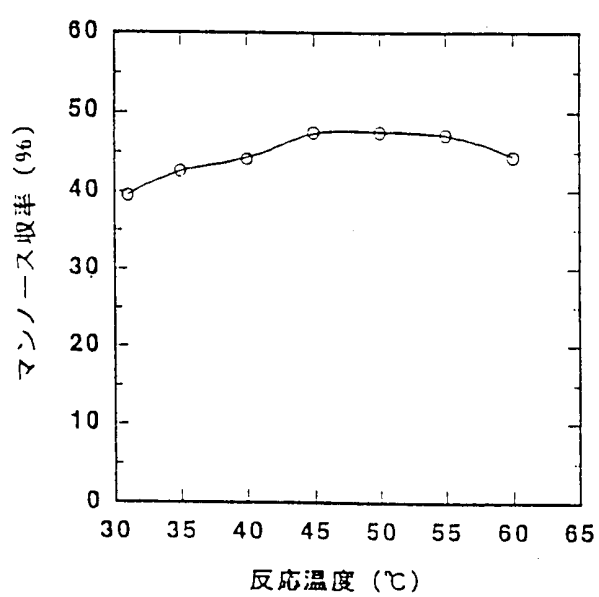


図 3

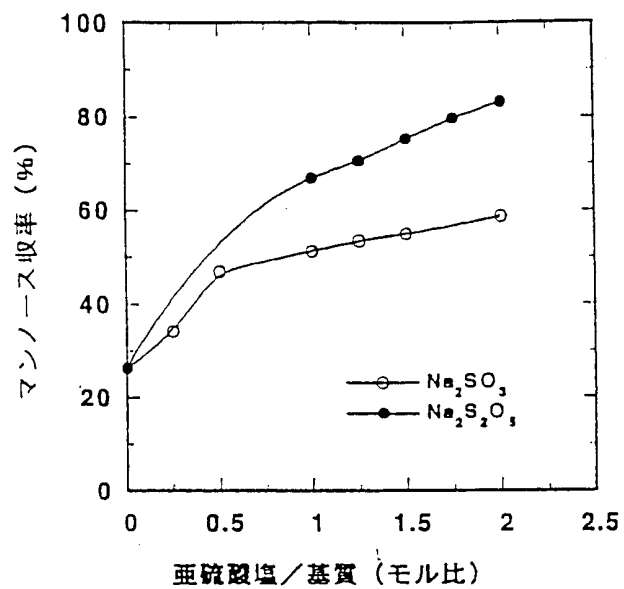


図 4

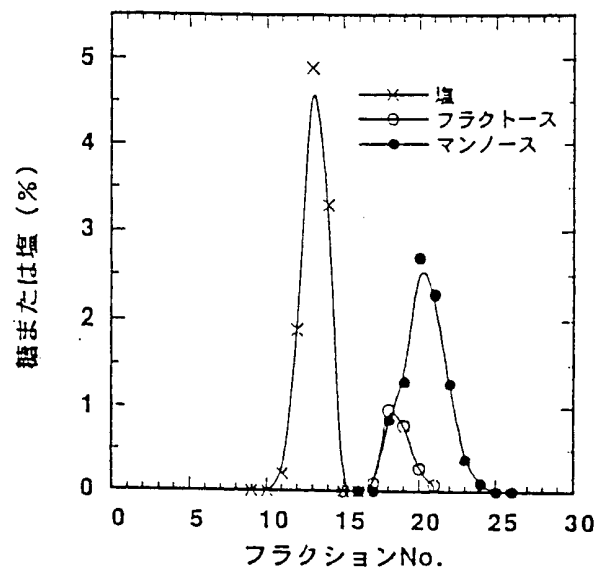


図 5

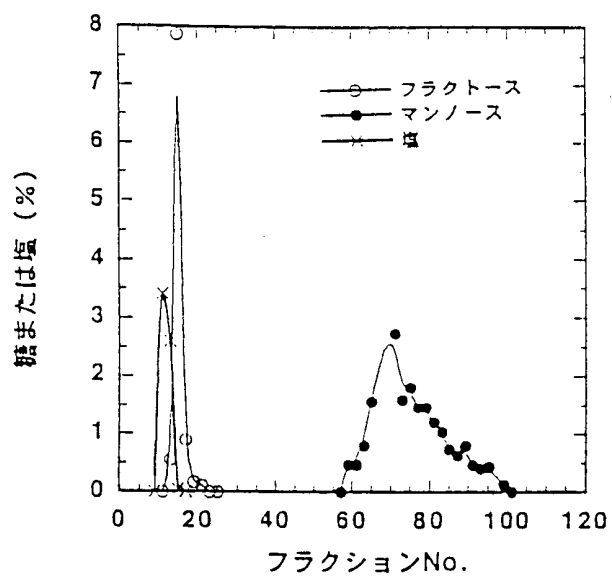
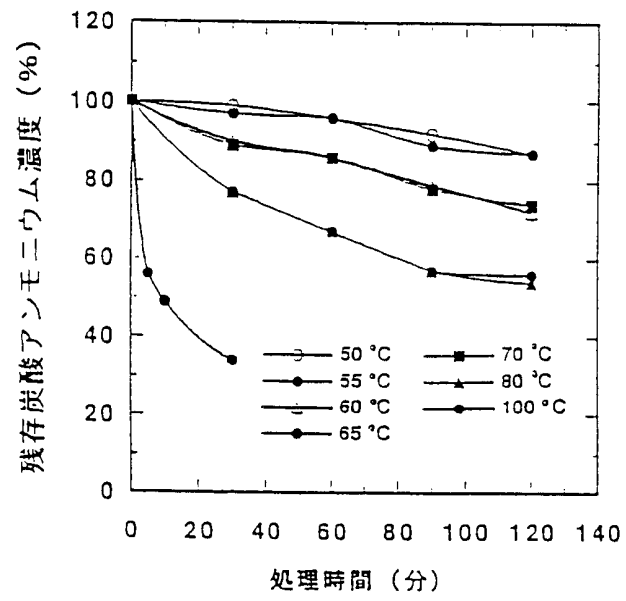


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P19/24

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.Cl⁷ C12P19/00-19/64

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)
WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-218370, A (Amano Pharmaceut. Co., Ltd.), 07 August, 1992 (07.08.92) (Family: none)	1-4
A	JP, 6-292578, A (Amano Pharmaceut. Co., Ltd.), 21 October, 1994 (21.10.94) (Family: none)	1-4
A	JP, 63-21678, B (Towa Chemical Industry Co., Ltd.), 09 May, 1988 (09.05.88) (Family: none)	1-4
A	JP, 9-191894, A (Amano Pharmaceut. Co., Ltd.), 29 July, 1997 (29.07.97) (Family: none)	1-4

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
27 October, 2000 (27.10.00)

Date of mailing of the international search report
07 November, 2000 (07.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C 1 2 P 1 9 / 2 4

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. Cl⁷ C 1 2 P 1 9 / 0 0 - 1 9 / 6 4

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 WPI (DIALOG)、
 BIOSIS (DIALOG)

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, 4-218370, A (天野製薬株式会社) 7.8月. 1992 (07.08.92) ファミリーなし	1-4
A	JP, 6-292578, A (天野製薬株式会社) 21.10月. 1994 (21.10.94) ファミリーなし	1-4
A	JP, 63-21678, B (東和化成工業株式会社) 9.5月. 1988 (09.05.88) ファミリーなし	1-4

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。

<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 27. 10. 00	国際調査報告の発送日 07.11.00
--------------------------	-------------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 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) 甲斐 順子 印	4N 9641
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

C (続き) . 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, 9-191894, A(天野製薬株式会社)29.7月.1997 (29.07.97) ファミリーなし	1-4