

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3659985号
(P3659985)

(45) 発行日 平成17年6月15日(2005.6.15)

(24) 登録日 平成17年3月25日(2005.3.25)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 1/12

C 1 2 N 1/12

C

C 1 2 P 19/12

C 1 2 P 19/12

// (C 1 2 N 1/12

C 1 2 N 1/12

C 1 2 R 1:89)

C 1 2 R 1:89

請求項の数 6 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-350260
 (22) 出願日 平成5年12月28日(1993.12.28)
 (65) 公開番号 特開平7-246094
 (43) 公開日 平成7年9月26日(1995.9.26)
 審査請求日 平成12年11月29日(2000.11.29)

微生物の受託番号 ATCC 75630

(73) 特許権者 000175283
 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
 大阪府豊中市三和町1丁目1番11号
 (73) 特許権者 591030499
 大阪市
 大阪府大阪市北区中之島1-3-20
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (72) 発明者 北畑 寿美雄
 大阪府泉南郡熊取町野田621-440
 (72) 発明者 中野 博文
 大阪府豊中市服部西町3丁目14番3号
 (72) 発明者 鷺野 乾
 大阪府豊中市北緑丘3丁目1番16-30
 4号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トレハラーゼ及び該酵素を用いた糖類の製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) , ' -トレハロース、2, 2' -ジデオキシ- , ' -トレハロースおよび
 2 -デオキシ- , ' -トレハロースを、それぞれの構成糖に加水分解するが、ネオト
 レハロース、ラクトース、マルトース、セロピオース、スクロースには作用しない、

(2) 至適pHがpH5~6であり、

(3) 至適温度が65 であり、

(4) 65 まで熱安定性を有し、

(5) ゲル濾過法により測定した分子量は、400,000~500,000であり、ド
 デシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動法によるサブユニットの分子量は18 10
 0,000~250,000であり、

(6) 焦点電気泳動により測定した等電点は2.7であり、

(7) 糖タンパクである、

特性を有することを特徴とするトレハラーゼ。

【請求項2】

緑藻植物門緑藻綱クロレラ科ロボスファエラ属を由来とする請求項1記載のトレハラーゼ
 。

【請求項3】

請求項1記載のトレハラーゼを産生する能力を有する緑藻門緑藻綱クロレラ科ロボス
 ファエラ属TM-33(受託番号ATCC 75630)。

【請求項4】

グルコースの存在下、請求項1または2記載のトレハラーゼを作用させることを特徴とするトレハロースの製法。

【請求項5】

2-デオキシグルコースの存在下、請求項1または2記載のトレハラーゼを作用させることを特徴とする2,2'-ジデオキシ-,'-トレハロースの製法。

【請求項6】

2-デオキシグルコースとグルコースとの存在下、請求項1または2記載のトレハラーゼを作用させることを特徴とする2-デオキシ-,'-トレハロースの製法。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規のトレハラーゼ及び該酵素を用いた糖類の製法に関し、より詳細には、クロレラ科ロボスファエラ属藻類由来の新規なトレハラーゼ及び該酵素を用いてトレハロース、2,2'-ジデオキシ-,'-トレハロース(以下2,2'-ジデオキシトレハロースという)及び2-デオキシ-,'-トレハロース(以下2-デオキシトレハロースという)を製造する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

トレハロースは、2分子のD-グルコースが, '-1,1'結合した非還元性2糖類の一種である。昆虫類では血液やリンパ液中にあり、運動エネルギー源のための貯蔵血糖として存在する。また不凍剤としての効果を有する場合もあり、昆虫は季節により、その濃度を調節して耐寒性を得ると言われている。

20

【0003】

トレハラーゼは、トレハロースを2分子のグルコースに加水分解する酵素である。この酵素は、高等動物(ラット小腸、ブタ小腸など)、昆虫(カイコ等)、微生物等に分布している。トレハラーゼを生産する微生物としては、マイコバクテリウム属(Methods in Enzymology, (1972) 28, 996)、ストレプトマイセス属(J. Bacteriol., (1968) 96, 105)などの細菌及び放線菌、サッカロマイセス属(J. Biol. Chem., (1964) 239, 1671)等の酵母、あるいはアスペルギルス属(J. Bacteriol., (1966) 91, 1883)、ノイロスポラ属(J. Bacteriol., (1973) 115, 582)、フミコーラ属(Biochim. Biophys. Acta., (1978) 525,162)、フィコマイセス属(Biochim. Biophys. Acta., (1975) 391, 154)等の糸状菌等が知られている。これはいずれも菌体内もしくは孢子内にトレハラーゼを含有している。その他、菌体外にトレハラーゼを生産する微生物としては、トリコデルマ属(Can. J. Microbiol., (1978) 24, 1280)やケトミウム属(特公昭60-22917号公報)が報告されている。しかし、緑藻類由来のトレハラーゼに関する報告はない。

30

【0004】

トレハロースの用途としては、新規食品素材として、低う蝕性、抗う蝕性、かつピフィズス菌増殖促進作用を有する甘味料としての応用(特開昭63-240758号公報)が提案されている。また、水分を有する食品原料や飲料に所定量のトレハロースを添加すると、食品原料や飲料の蛋白質の変性が抑制できること(特表平2-503864号公報)も報告されている。さらに、医薬品の分野では、タンパク質保護剤として、酵素標識抗体を長期保存させて、酵素活性の低下を抑制するためにトレハロースを添加する方法が報告されている(特開昭60-149972号公報)。また、細胞の安定保存性を高めたり、ワクチンの安定化に使用する例や、トレハロース誘導体を抗がん剤として使用する報告例もある(特開昭62-174094号公報)。例えば、2-デオキシグルコースにおける生理活性は、グルコースやマンノースの代謝拮抗物質として、糖タンパク質や糖脂質の連鎖形成を障害することにより、遷移芽細胞などの成育を阻害し、抗癌作用があることが知られている。

40

【0005】

50

トレハロースの製造法としては、微生物の菌体内及び菌体外にトレハロースを蓄積させる方法の他、酵素反応により、インピトロで生成させる方法がある。微生物による生産法としては、多量にトレハロースを含有するパン酵母から得る方法が一般的である。例えば、圧搾酵母を95% (V/V) エタノールで抽出して、トレハロースを得たり (J. Am. Chem. Soc., (1950) 2059)、パン酵母を90% (V/V) エタノールで抽出してトレハロースを得る方法 (農化第27巻, (1953) 412) が知られている。酵素法としては、マルトースにマルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホスホリラーゼを作用させて、トレハロースを製造する方法が報告されている (特公昭63-60998号公報)。

【0006】

2, 2'-ジデオキシトレハロース及び2-デオキシトレハロースの製造法としては、化学的に合成する方法 (Nouveau Journal De Chimie., (1980) 4, 59) 及び酵母の代謝を利用する方法 (Biochimica et Biophysica Acta., (1984) 803,284及びBiochimica et Biophysica Acta., (1969) 184, 77) がある。

10

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、上記したような既知の、あるいは市販のトレハラーゼにおいては、微生物が産生する単位数が低く、グルコースからトレハロースへの逆反応による縮合反応率が極めて低いといった問題があった。

特に、トレハロースを、パン酵母からの抽出により得る方法では、多量の有機溶媒を必要とするとともに、夾雑物を取り除くために複雑な工程を必要とする。また、酵素を使用する方法として知られているマルトースにマルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホスホリラーゼを作用させてトレハロースを製造する方法でも、製造工程が複雑であるとともに、マルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホスホリラーゼの酵素の製造に多大な経費と手間がかかるなど問題点が非常に多い。

20

【0008】

さらに、菌体外のトレハロースを精製する方法もある (特開平5-211882) が、いずれの方法を採用しても製造経費が高くなり、よってその用途が限定されてしまう。また、化学的合成法による2, 2'-ジデオキシトレハロース及び2-デオキシトレハロースの製造にあっては、工程が煩雑で、製造歩留りが低く、酵母の代謝による製法においても、産生量も低く、かつ精製工程が複雑であるという問題があった。

30

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、トレハラーゼを生産する微生物を自然界に広く求めて検索した結果、緑藻植物門緑藻綱クロレラ科ロボスファエラ属の緑藻類に属すると認められる新株が、目的にかなうトレハラーゼを高力価に産生することを見出した。さらにこの酵素は、従来から報告されているトレハラーゼに比べて熱安定性の高い性質を有することを見だし、本発明に至った。

【0010】

本発明のトレハラーゼは、緑藻門緑藻綱クロレラ科ロボスファエラ属の微細藻類で産生され、その培養物から単離することができるものであり、以下の特性、(1) 2, 2'-トレハロース、2, 2'-ジデオキシ- , ' -トレハロースおよび2-デオキシ- , ' -トレハロースを、それぞれの構成糖に加水分解するが、ネオトレハロース、ラクトース、マルトース、セロビオース、スクロースには作用しない、(2) 至適pHがpH5~6であり、(3) 至適温度が65 であり、(4) 65 まで熱安定性を有し、(5) ゲル濾過法により測定した分子量は、400, 000~500, 000であり、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動法によるサブユニットの分子量は180, 000~250, 000であり、(6) 焦点電気泳動により測定した等電点は2.7であり、(7) 糖タンパクである、

40

【0011】

50

本発明者らは、大阪府八尾市の土壌から採取した藻体が、以下に示した形態学的性質及び培養的性質等を有することから、Komarek, J. & Fott, B. Chlorophyceae. In Huber - Pestalozzi (ed.) (1983) 1044 等を参考文献として、クロレラ科の各属種の藻体（保存株）と比較、同定を試みた。その結果、本藻体は、ロボスファエラ属チロレンシス（*Lobosphaera tirolensis*）にも類似するが、すでに発表されたものにおいて完全に一致しないため、本発明の藻体を、ロボスファエラ属の新種もしくは新変種と考え、ロボスファエラ属 T M - 3 3 と命名した。この藻体は、A T C C に寄託されている（寄託番号 75630; 1993 年 12 月 21 日）。本発明は、ロボスファエラ属 T M - 3 3 の野性株、変種及び同属で、上記の特質を有するトレハラーゼを産生する能力を有する藻体を含有する。なお、変種としては、自然に生じる変種及び公知の手段、例えば、ラジオアイソトープ照射、紫外線照射、ニトロソグアニジン、その他化学処理などの常法、さらに遺伝子組み換えにより酵素産生能を高める処理を施した人工的に生じる変種を包含するものである。

10

【 0 0 1 2 】

(1) 形態学的性質

ボールドの基本培地（Bold's Basal Medium, 以下 B B M という）の寒天培地で、2 週間培養後、光学顕微鏡を使用して観察した結果、本藻体は、深い切れ込みのあるカップ状の葉緑体を持っていた。また明確なピレノイドは観察されなかった。

(2) 培養的性質

B B M の培地では 4 日目より増殖が確認された。また、普通寒天培地では 1 日後より増殖が確認された。図 1 に、本藻体の顕微鏡写真を示す。

20

本発明のトレハラーゼを産生する緑藻門緑藻綱クロレラ科ロボスファエラ属の藻体は、独立栄養状態でも生育するが、従属栄養状態の方が生育速度も大きく、トレハラーゼ生産量も多い。

【 0 0 1 3 】

1 . ロボスファエラ属 T M - 3 3 の培養方法

本発明のトレハラーゼを生産するロボスファエラ属 T M - 3 3 の培養は、以下の方法によって行うことができるが、本発明はこれによって特に限定されるものではない。

【 0 0 1 4 】

好ましい基本培地としては、0 . 5 (W / V %) ポリペプトン（特に記載のない場合は以下、容量 % をいう）、酵母エキス 0 . 1 %、硫酸マグネシウム 7 水和物 0 . 0 5 %、食塩 0 . 0 5 %、リン酸一カリウム 0 . 1 %、リン酸二カリウム 0 . 1 % (p H 6 . 5) である。

30

【 0 0 1 5 】

(1) 炭素源の影響

表 1 に示した各種炭素源 0 . 2 5 % を含む上記基本培地を、常法に従って調製滅菌し、この培地にロボスファエラ属 T M - 3 3 を接種する。5 日間、2 7 ° C で暗室にて振盪培養する。

【 0 0 1 6 】

【 表 1 】

	活性 (単位/m l)	活性比較
無添加	0.78	24.4
グルコース	2.80	87.7
フルクトース	2.37	74.2
ガラクトース	1.84	57.6
ラクトース	0.79	24.7
スクロース	0.69	21.6
トレハロース	2.81	88.1
グリセリン	3.19	100.0
セロビオース	0.82	25.7
メリビオース	0.79	24.8
スターチ	0.6	18.8

10

20

表1から明らかなように、本藻体は、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、グリセリンなどを加えた培地で、トレハロース添加時と同等の活性が得ることができ、なかでも、グリセリンが最適である。添加するグリセリン濃度は0.25%~1%が好ましい。

【0017】

30

(2) 窒素源の影響

グリセリン0.25%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、食塩0.05%、リン酸一カリウム0.1%、リン酸二カリウム0.1%(pH6.5)ならびに表2に示した各種窒素源を使用し、5日間、27℃で振盪培養した後、酵素活性を測定した。その結果を表2に示す。

【0018】

【表2】

	活性 (単位/m l)	活性比較
硫酸アンモニウム	0. 0 0	0 0. 0
ポリペプトン	2. 1 4	6 2. 9
肉エキス	1. 4 1	4 4. 0
コーンスタープリカー	0. 9 3	2 7. 9
酵母エキス	2. 3 1	6 7. 9
酵母エキス0. 2%+ ポリペプトン1. 0%	3. 2 0	1 0 0. 0
肉エキス0. 2%+ ポリペプトン1. 0%	1. 7 0	5 0. 0

10

20

表2から明らかなように、ポリペプトン、酵母エキス、肉エキス、その他有機体窒素源を使用することにより、高活性のトレハラーゼを高産生する。

【0019】

以上の結果を総合すると、活性の高い培地組成として、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.2%、グリセリン0.75%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、食塩0.05%、リン酸一カリウム0.1%、リン酸二カリウム0.1%(pH6.5)の培地組成が挙げられるが、これに限られるものではなく、上記知見を参考として、供試藻株が目的とする酵素を大量に生産し得る成分を適宜変更したものも使用することができる。

30

【0020】

2. トレハラーゼ又はその含有物の製造方法

本発明のトレハラーゼを生産するために、選定した培地にロボスファエラ属TM-33を接種し、pHを3.5~7.5、好ましくはpHを5~7、温度を20~45、好ましくは25~35に保ちつつ、2日間から7日間振盪あるいは通気すればよい。

【0021】

このようにして得られた培養物より、藻体を遠心分離などの常法により採取したものが本発明のトレハラーゼを含有する。含有物の状態として、藻体そのもの、藻体のアセトンパウダー及び藻体の凍結乾燥品が挙げられる。また、藻体をフレンチプレス処理、超音波処理、マントンガウリ処理及びその他の方法で破碎し、遠心分離して得られた上清液、この上清液に85%飽和となるように硫酸アンモニウムを加えて得られる塩析物、遠心分離の上清液にアセトンもしくはエタノール等を加えて得られる沈殿物及びその乾燥パウダー等の状態で使用することも可能である。さらに、所望により酵素を精製することもできる。

40

【0022】

菌体破碎後の上清液の精製は、塩析、イオン交換樹脂、その他通常的手段を適宜組合わせて行うことができる。例えば、菌体破碎後の上清液に、固形の硫酸アンモニウムを加え、85%飽和で沈殿する画分を遠心分離機を使用して集める。そして、この沈殿物をpH5.5の50mM酢酸緩衝液に溶解し、透析チューブに入れた後、同緩衝液で十分に透析する。なお、この硫酸アンモニウム塩析での回収率は95%であった。次いで、常法に従って、市販の樹脂を用いて、イオンクロマトグラフィー及びゲル濾過等を実施した。なお、

50

上記樹脂としては、東ソー株式会社製のTSK gel SPトヨパール550、TSK gel Super Q - トヨパール650、TSK gel トヨパールHW、ファルマシア製のDEAE - セファロース CL - 6B、CM - セファロース Fast Flow、セファロース CL - 6B、セファロース CL - 4B等から選ばれる少なくとも1種以上の樹脂を用いることができる。

【0023】

最終的に、図2に示したように、スーパーロース12 (suprrose 12) のゲル濾過によるファーストプロテイン液体クロマトグラフィー (以下FPLCという) (10 × 300 mm、25 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)、50 mM NaCl、0.5 ml / 分、280 nm) により1ピークとなった。

10

【0024】

3. トレハラーゼの諸性質

上記精製された酵素を使用して調べた結果を次に示す。

(1) 酵素活性測定法

0.1 Mのトレハロース溶液125 μlに酵素液125 μlを加え、40℃で10分間作用させた後、生成するグルコースをソモギ - ネルソン法 (N. Nelson, J. Biol. Chem., 153, 375(1944)) で測定する。ここでの酵素活性1単位は1分間に2 μmolのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量と定義する。

【0025】

(2) 作用

(イ) トレハロース希薄水溶液に作用させると、トレハロースをグルコースに加水分解する。

20

(ロ) 高濃度、例えば50% (W/V) グルコース基質に本酵素を作用させると収率が5~20% (収率 = トレハロース濃度 / 初期グルコース濃度) でトレハロースを合成する。

【0026】

(3) 基質特異性

本酵素は極めて基質特異性が高く、トレハロース、2 - デオキシトレハロース及び2, 2' - ジデオキシトレハロースを加水分解するが、メチル - α - グルコシド、フェニル - α - グルコシド、マルトース、イソマルトース、スクロース、ラクトース、セロピオース、可溶性澱粉等は分解しない。

30

【0027】

(4) 至適pHとpH安定性

上記酵素活性測定法にて、各pHで活性を測定して至適pHを求める。その結果を図5に示す。これによると、本酵素の至適pHは5~6である。また、5℃において、各pHで20時間保持した後の残存活性を測定したところ、図6に示したように、活性はpH9までは変化せず、pH10でも83%の残存活性を有した。

【0028】

(5) 至適温度と温度安定性

上記酵素活性測定法にて、各温度で活性を測定して至適温度を求める。その結果を図3に示す。これによると、本酵素の至適温度は65℃である。また、pH5.5において、各温度で10分間保持した後の残存活性を測定したところ、図4に示したように、活性は65℃までは変化せず、70℃でも約70%の残存活性を有した。

40

【0029】

(6) 分子量

本酵素の分子量をスーパーロース12のカラムを使用したFPLCのゲル濾過法より測定したところ、40万~50万であった。また、サブユニット分子量は、SDS - PAGE法で、180,000~250,000であった。

【0030】

(7) 等電点

pH3.5~10.0アンフォライト (ファルマシア製) のカラム (110 ml) を使用

50

し、VesterbergとSvenssonの方法 (Acta Chem. Scand., (1966) 20. 820)により、等電点を測定した結果、2.7となった。

【0031】

(8) 糖染色

本酵素は、R.M.Zacharriusらの方法 (Anal. Biochem., (1969) 30, 148) による糖染色によって陽性になることから、糖タンパクである。

【0032】

(9) 阻害、活性化

種々の塩及び試薬を2.5 mMの濃度で、30、1時間保温した後、本酵素に反応させ、本酵素の活性を測定した。その結果、酵素活性は、対照区に比較して、三価の鉄イオンで88%阻害され、2.5 mMのアルミニウムイオンで50%以上阻害されたが、1価の水銀イオン、2価の鉛イオン、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA) によっては阻害されなかった。

また、マグネシウムイオン、カルシウムイオンでは、本酵素の安定性を高める効果は見られなかった。

【0033】

4. トレハラーゼによるトレハロースの製造方法

本発明のトレハラーゼは、トレハロースに作用して、グルコースに加水分解できると同時に、高濃度グルコース存在下では、可逆的にトレハロースを生成する。すなわち、トレハラーゼをグルコース液に加えて処理することにより縮合反応が生じ、安価なグルコースを原料として一工程で高収率で経済的にトレハロースを生成することができる。以下具体的な例を挙げて説明する。

【0034】

グルコースの濃度は5~80% (W/W)、好ましくは40~60% (W/W) を用いる。反応時の温度は20~80、好ましくは40~70 であり、pHはpH4~8の範囲が好ましい。また、酵素の必要単位数は、グルコースグラム重量当たり0.1~200単位である。反応時間は、酵素の使用量により変動するが、0.1~100時間の範囲が選ばれる。このような簡便な操作で、収率10~20% (収率=トレハロース濃度/初発グルコース濃度) のトレハロースを得ることができる。この際使用する酵素は特に精製する必要がなく、当該トレハラーゼを含有するのであれば、藻体そのもの、藻体の凍結乾燥物、藻体のアセトンパウダーもしくは粗酵素液などでもよい。また固定酵素も使用可能である。固定酵素の場合には、固定化基剤として、イオン交換樹脂や多孔性セラミックを使用することができ、固定化に際して、グルタルアルデヒド等の架橋剤を使用することもできる。

【0035】

上記処理を施した反応液は、トレハロースと未反応グルコース等を含有する。この反応液、この反応液の濃縮液、乾固したもの又は反応液を乾燥して粉末にしたものをトレハロース含有物として使用することができるが、反応液をさらにイオン交換樹脂処理、活性炭クロマトグラフィー、吸着樹脂等のクロマトグラフ操作、再結晶、その他一般的な方法から選ばれる1種もしくはこれらを組み合わせた方法により高純度に精製してもよい。

【0036】

5. 2, 2'-ジデオキシトレハロース、2-デオキシトレハロースの製造方法

本発明のトレハラーゼを使用して、グルコースからトレハロースを製造する場合と同様の方法を採用することにより、2-デオキシグルコースから2, 2'-ジデオキシトレハロースを製造することができる。

【0037】

一例を挙げて説明すると、2-デオキシグルコースの濃度は、20~80% (W/W)、好ましくは50~70%、温度は20~80、好ましくは40~60 がよく、pHは、pH4~8の範囲で反応させることができる。この際の酵素の必要単位数は、2-デオキシグルコースグラム重量当たり0.1~200単位がよく、反応時間は酵素の使用量に

10

20

30

40

50

より変動するが、0.1～100時間の範囲が選ばれる。このような簡単な操作で、収率20～50%（収率 = $2, 2'$ -ジデオキシトレハロース濃度 / 初発2-デオキシグルコース濃度）の2, 2'-ジデオキシトレハロースを得ることができる。

【0038】

また、2-デオキシトレハロースは、2-デオキシグルコースとグルコースとのモル比が10:1～1:1、好ましくは5:2～10:1から選ばれる配合比で、混合物としての糖濃度が10～80%（W/W）、好ましくは50～70%（W/W）、濃度は20～80、好ましくは40～60がよく、pHはpH4～8の範囲で反応させることができる。この際の酵素の必要単位数は、2-デオキシグルコースグラム重量当たり0.1～200単位でよく、反応時間は酵素の使用量により変動するが、0.1～100時間の範囲が選ばれる。このような簡単な操作で、収率10～30%（収率 = 2 -デオキシトレハロース濃度 / 初発2-デオキシグルコース濃度 + グルコース濃度）で2-デオキシトレハロースを得ることができる。

10

【0039】

なお、本反応により生成した物質は、公知の方法で精製し、機器分析により構造を確認することができる。例えば、反応生成物を活性炭カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、再結晶によって、単一物質とした後、Fast atom bombardment mass（以下F a b - M Sという）による分子量測定、 13 C核磁気共鳴法（NMR）により構造解析を行うことができる。

【0040】

20

【実施例】

本発明に係る新規のトレハラーゼ及びその製法を説明する。

実施例1

普通寒天斜面培地に、ロボスファエラ属TM-33株を接種し、27℃で5日間培養後、その1白金耳をとり、酵母エキス0.2%、ポリペプトン1.0%、グリセリン0.25%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%（pH6.5）の組成からなる液体培地500mlに接種し、27℃で5日間暗室で通気振盪培養した。培養終了後、酵素活性を測定すると、本液1ml当たり約3単位のトレハラーゼを含有していた。培養液を遠心分離して藻体を採集し、アセトンを200mlを添加して脱脂後、乾燥させることにより藻体のアセトンパウダー0.15gを得た。本パウダー1mg当たり10単位の酵素活性を含有していた。

30

【0041】

実施例2

普通寒天斜面培地に、ロボスファエラ属TM-33株を接種し、27℃で5日間培養後、その1白金耳をとり、酵母エキス0.2%、ポリペプトン1.0%、グリセリン0.25%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%（pH6.5）の組成からなる液体培地500mlに藻株を接種し、27℃で5日間暗室で通気振盪培養した。培養終了後、酵素活性を測定すると、本液1ml当たり3単位のトレハラーゼを含有していた。振盪培養後、培養液を遠心分離して藻体を採集し、フレンチプレス（1500Kgf/cm²）でその藻体を破砕し、90%飽和硫酸アンモニウムにより室温で塩析した。その後、塩析物を50mM酢酸緩衝液（pH5.5）に溶解し、50mM酢酸緩衝液中でアセテート透析チューブにておいて透析して、トレハラーゼ含有液10mlを得た。その酵素液は1ml当たり140単位のトレハラーゼを含有していた。

40

【0042】

実施例3

予め、グルコース2Kgを水3リットルに溶解し、クエン酸を加えてpHを5.5とした。この溶液に、50℃にて、実施例1の方法で得た酵素液をグルコース1g当たり50単位で加えて、同温度で12時間攪拌した。この反応を高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCとする：Column, Amido-80（東ソー（株））、溶媒：アセトニトリル/水 = 75%

50

(V/V)、流速：1.0 ml/min、温度：35℃、ポンプ：CCPD（東ソー（株））、検出器：RI-8012（東ソー（株））で分析したところトレハロース20%（W/V）含んでいた。

【0043】

反応液は90℃、10分間加熱して酵素を失活させた後、活性炭カラムクロマトグラフィー（10×150cm）に供して、トレハロースをカラムに吸着させた。そして、このカラムを60リットルの蒸留水で水洗することによってグルコースを除いた後、10%エタノール液20リットルでトレハロースを溶出させた。エタノール画分を濃縮することにより純度97%のトレハロース0.3Kgを得た。

【0044】

実施例4

予め、グルコース5Kgを水4リットルに溶解し、クエン酸を加えてpHを5.5とした。この溶液に、50℃にて、実施例2の方法で得た酵素液をグルコース1g当たり50単位で加え、同温度で12時間反応させ、実施例3と同じHPLCの条件で分析したところ、トレハロース20%（W/V）を含んでいた。

【0045】

反応液は90℃、10分間加熱して酵素を失活させた後、活性炭カラムクロマトグラフィー（10×150cm）に供して、トレハロースを活性炭カラムに吸着させた。そして、このカラムを40リットルの純水で水洗することにより未反応のグルコースを除いた後、10%エタノール液20リットルでトレハロースを溶出させた。溶出画分を濃縮することにより純度95%のトレハロースを0.8Kgを得た。

【0046】

実施例5

固定化酵素調製用の担体（三菱化成製、アニオン交換樹脂、VA-20）1Kgを50mMの酢酸緩衝液に浸漬し、十分に脱気後、実施例2の方法で調製した酵素溶液を添加（20万単位）し、一晩静置して、担体に酵素を固定した。固定化された担体を酢酸緩衝液で洗浄後、カラム（6×50cm）に充填するとともに、カラムジャケットに恒温水を循環させてカラム温度50℃とした。そして、固定化酵素カラムの後方に活性炭を充填したカラム（10×100cm）を継続させ、この活性炭カラムを、SV2（SV：1時間当たりの通液量/吸着剤）で30%グルコース（3Kgグルコース/10.0リットル蒸留水W/V）を循環させた。その結果、活性炭カラムに随時トレハロースが蓄積され、活性炭カラムを10%（W/V）エタノールで洗浄することによりトレハロースが溶出された。そして、10%エタノール画分を濃縮することにより、純度95%のトレハロースを1Kgを得た。

【0047】

実施例6

2-デオキシグルコース1.4gを50mM酢酸緩衝液（pH5.5）0.6mlに溶解させた後、実施例1で調製した酵素液を50単位与え、70℃にて48時間反応させた。100℃で5分間加熱し、酵素を失活させた後、反応液の一部を、実施例3と同一の条件下で高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果を図7に示す。

【0048】

反応終了後、蒸留水6mlで希釈した溶液を活性炭カラム（2×11cm）及びバイオラッド製のBio gel P-2（2.5×143cm）にかけて、99%純度の2,2'-ジデオキシトレハロース162mgを得た。この化合物の分子量を、図8に示したように、マスペクトル（Fab-MS）（機器：JEOL JMX-DX303H マスペクトルメータ、マトリックス：グリセロール）により測定し、図9に示した¹³C核磁気共鳴法（NMR）（機器：JEOL JMX-EX270 68.8MHz、内部標準：アセトン（31.4ppm）及び施光度（+153.80）により、図10に示す2,2'-ジデオキシトレハロースの構造決定をした。

【0049】

実施例7

10

20

30

40

50

2 - デオキシグルコース 500 mg 及びグルコース 200 mg を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1 ml に溶解させた後、ロボスファエラ属の産性するトレハラーゼを 50 単位加え、70 ℃にて 48 時間反応させた。反応液の一部を実施例 3 と同一の条件下で高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果を図 11 に示す。

【0050】

反応終了後、混合物を 100 ℃で 5 分間処理することにより酵素を失活させ、この反応液を 6 ml の蒸留水によって希釈した後、活性炭カラム (2 × 11 cm)、及びバイオラッド製の Bio gel P-2 (2.5 × 143 cm) のゲル濾過にかけて、99% 純度の 2 - デオキシトレハロース 40 mg を分取した。この化合物の分子量を、図 12 に示したように、マスマスペクトル (Fab-MS) により測定し、図 13 に示した¹³C 核磁気共鳴法 (NMR) 及び施光度 (+165.20) により、図 14 に示す 2 - デオキシトレハロースの構造決定をした。

10

【0051】

実施例 6 及び 7 に示す両物質は既に報告されているが、トレハラーゼを用いた合成法は知られていない。本発明のトレハラーゼを使用することにより、グルコースからトレハロース、2 - デオキシグルコースから 2, 2' - ジデオキシトレハロース、2 - デオキシグルコースとグルコースの混合物から 2 - デオキシトレハロースが高収率で生成し、また複雑な精製を必要とせず、高純度のものを、安価に製造することができる。

【0052】

実験例 1

本発明のトレハラーゼを FPLC で単一にまで精製した後、このトレハラーゼ 45 µl (トレハラーゼ酵素濃度 1 mg/ml、50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.6)) を 100 ℃にて 20 分加熱変性処理した。その後、加熱変性したトレハラーゼに、グリコペプチダーゼ F を 5 µl (0.5 単位/ml、宝酒造 (株) 製) 添加し、37 ℃にて 12 時間反応を行うことにより糖鎖を除去した。その結果、アクリルアミドのグラジエントゲル (第一化薬製、マルチプレートゲル 4/15) の SDS-PAGE より、分子量は 5 万 ~ 6 万、NATIVE-PAGE の測定により、約 10 万 ~ 12 万が確認された。また対照として、グリコペプチダーゼ F 未処理のトレハラーゼは、SDS-PAGE より分子量は 18 万 ~ 25 万、糖染色により赤色に染色した。

20

【0053】

【発明の効果】

本発明の新規なトレハラーゼを用いることによりトレハロースを製造すれば、菌体や培養液を抽出する方法に比べて、(1) グルコースからトレハロースを直接製造できるので、反応が単純で、副産物がなく、食品として安全に使用することができる。(2) 原料としては、酵素以外にグルコースのみでトレハロースを高収率に生産するので、コストが非常に安くなる。

30

【0054】

また、トレハロースは、食品においては冷凍保護、乾燥保護、抗う蝕のほか、他甘味料としての用途があり、酵素の冷凍保存など用途は非常に大きい。さらに、医薬の分野においても、トレハロース誘導体が制ガン剤等として利用されていることから、実用化を期待することができる。

40

【0055】

さらに、2, 2' - ジデオキシトレハロース、2 - デオキシトレハロースの製造に関しては、化学的に合成する方法に比べて、2 - デオキシグルコース及び 2 - デオキシグルコースとグルコースとにより、直接製造することができるので、精製工程が単純であり、工業的に利用することが可能となる。

従って、トレハラーゼ及び該酵素を用いてトレハロースを製造する方法は、産業上極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

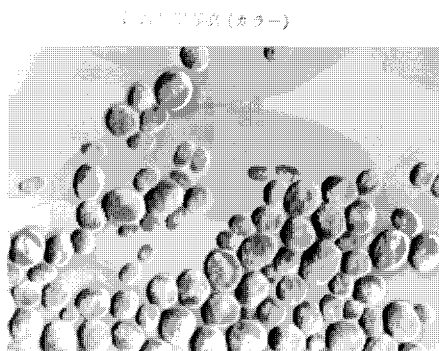
【図 1】本発明に係るトレハラーゼを産生する藻体の顕微鏡写真である。

50

- 【図2】本発明に係るトレハラーゼをFPLCに付した際のチャートである。
- 【図3】本発明に係るトレハラーゼの至適温度を示すグラフである。
- 【図4】本発明に係るトレハラーゼの温度安定性を示すグラフである。
- 【図5】本発明に係るトレハラーゼの至適pHを示すグラフである。
- 【図6】本発明に係るトレハラーゼのpH安定性を示すグラフである。
- 【図7】2-デオキシグルコースをトレハラーゼに作用させた際に生成した2,2'-ジデオキシトレハロースのHPLCチャートである。
- 【図8】本発明における実施例6の縮合生成物のFab-MS解析スペクトルである。
- 【図9】本発明における実施例6の縮合生成物の¹³C-NMR解析スペクトルである。
- 【図10】2,2'-ジデオキシトレハロースの構造式である。
- 【図11】2-デオキシグルコース及びグルコースをトレハラーゼに作用させた際に生成した2-デオキシトレハロースのHPLCチャートである。
- 【図12】本発明における実施例7の縮合生成物のFab-MS解析スペクトルである。
- 【図13】本発明における実施例7の縮合生成物の¹³C-NMR解析スペクトルである。
- 【図14】2-デオキシトレハロースの構造式である。

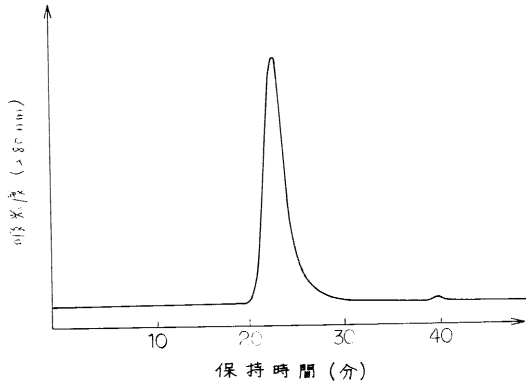
10

【図1】

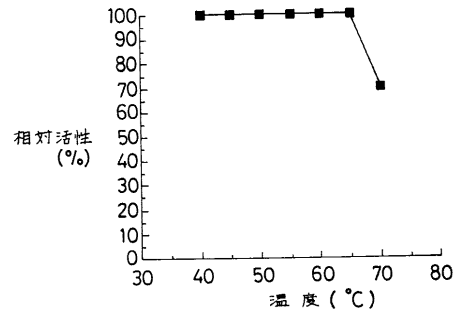


カラー写真

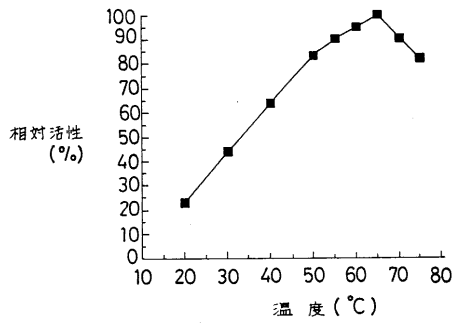
【 図 2 】



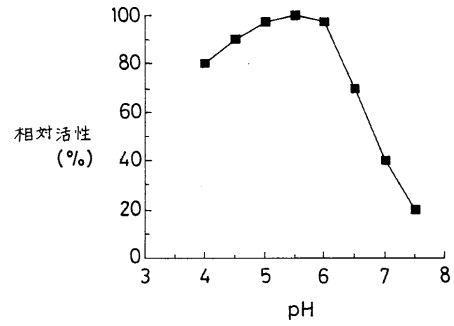
【 図 4 】



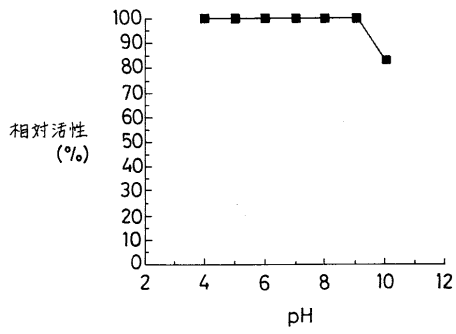
【 図 3 】



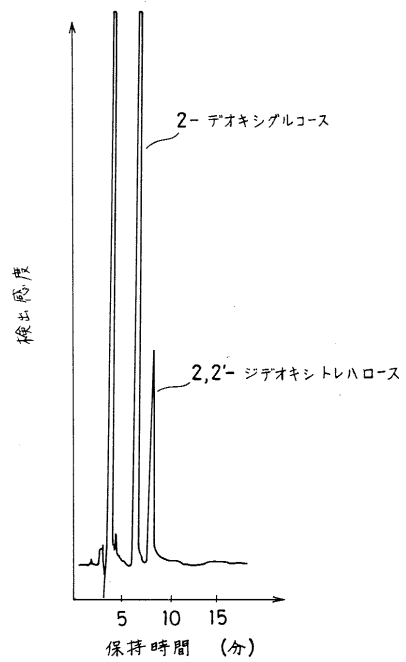
【 図 5 】



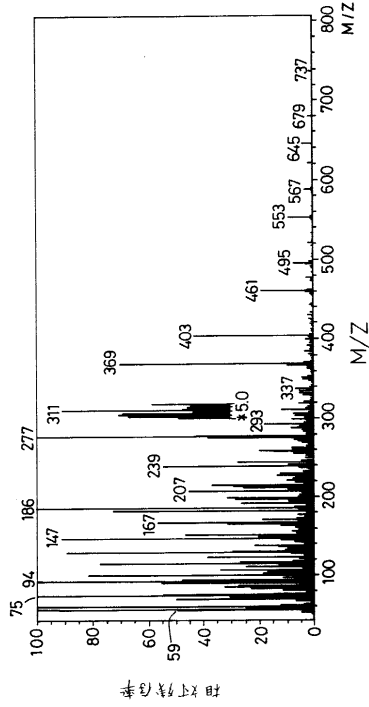
【 図 6 】



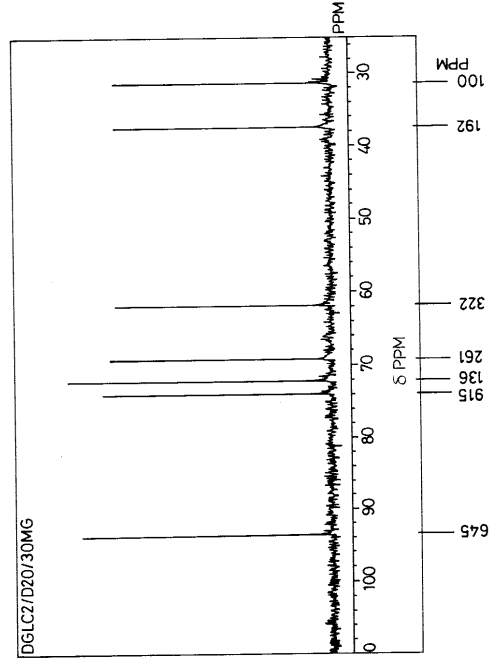
【 図 7 】



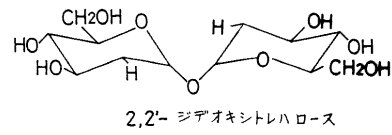
【 8 】



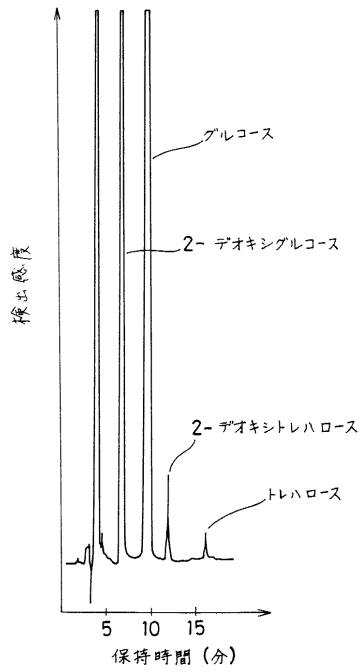
【 9 】



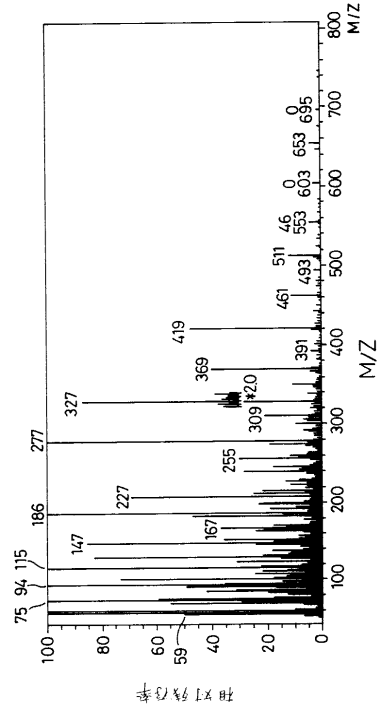
【 10 】



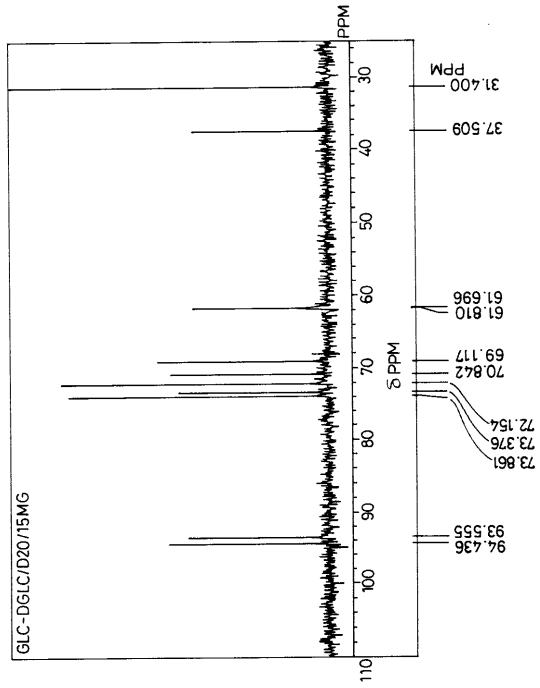
【 11 】



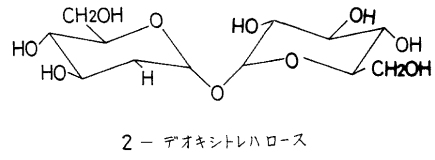
【 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I
(C 1 2 N 9/24 C 1 2 N 9/24
C 1 2 R 1:89) C 1 2 R 1:89

(72) 発明者 森脇 将光
大阪市東住吉区南田辺1丁目7番13号

審査官 高 美葉子

(56) 参考文献 特開昭55-9705(JP,A)
特開昭59-85289(JP,A)
特開昭62-275682(JP,A)
Experimental Mycology, 1986年, 10, p.131-143

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 9/00-9/99
C12P 1/00-41/00
C12N 1/12
BIOSIS/WPI(DIALOG)