

学 位 論 文 題 名

Studies on the Synthesis of Some Non-reducing Saccharides Using Glycosidases

（グリコシダーゼを用いた非還元糖の合成に関する研究）

学位論文内容の要旨

糖質は極めて重要な栄養源であると同時に、甘味料など食品添加物としても重要である。さらに近年は、小腸で消化されにくいオリゴ糖は、ビフィズス菌などの腸内細菌の増殖を促す機能性食品として盛んに用いられるようになってきた。このような中で、非還元性の糖質は、医薬、農薬、食品、化粧品等の加工過程において褐変反応を抑える物質としても注目されている。従来の還元性を有する糖類では、反応性の高い還元性のアルデヒドを持つため、アミノ基を持った活性成分とメイラード反応等の化学的相互作用によりアミノカルボニル結合を形成して着色するため、工業的利用範囲に制限があった。

本研究では、酵素を用いた還元末端を持たないオリゴ糖の合成を目的とし、 β -galactosidase を用いて lactose と trehalose から galactosyl trehalose を、 β -fructosidase を用いて sucrose と cellobiose あるいは cellotriose から cellobiosyl fructoside および cellotriosyl fructoside など幾つかの非還元性糖質の酵素合成を行った。

1. 非還元性ガラクトシルオリゴ糖の合成

基質として用いた 3% lactose と 3% trehalose に対し *Bacillus circulans* 由来の β -galactosidase (213U/530 ml) を 0.04 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、37°C、3 時間反応した。反応生成物を全糖および還元性糖発色の TLC で分析した後、非還元性の生成物をゲル濾過および分取用薄層クロマトグラフィーを用い分離精製した。本化合物は FDMS より分子量 527.4 $[M+Na]^+$ および 543.3 $[M+K]^+$ を与え、この結果から、分子量 504 の 3 糖類と推定された。さらに ^{13}C -NMR スペクトルによって生成物を *O*- β -D-galactosyl-(1,4)- α , α -trehalose (Gal-Tre) と同定し、この非還元性である 3 糖類の温度耐性および酸耐性を調べた。Gal-Tre は pH 2.0、100°C、30 分の条件において安定であることが確認された。

2. *Arthrobacter globiformis* IFO 3062 由来 β -fructosidase の精製

非還元性フラクトオリゴ糖を酵素により合成することを目的とし、fructose 転移活性の高い酵素の選抜を 12 種の *Arthrobacter* 菌株を用いて行った。4 菌株について目的の酵素活性が認められた。調べた菌株の中で最も高い糖転移活性を持つ *A. globiformis* IFO 3062 と *A. aurescens* IFO 12136 について、1% polypeptone、0.2% 酵母エキストラクト、0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ および 3% sucrose の培地を用いて詳細に酵素活性を調べた。得られた結果から *A. globiformis* IFO 3062 が酵素精製に最適な菌株と判断した。

糖転移活性を持つ酵素は DEAE-Toyopearl 650 M、Toyopearl HW-55 および Mono Q を用いて分離精製された。分子量は 60,000、温度に対しては 40°C まで、pH に対しては 5.5 – 9.5 の範囲で安定であった。また反応の最適温度および最適 pH は、それぞれ 37°C、6.8 であった。

3. 非還元性フラクトシルオリゴ糖の合成

sucrose を基質、cellobiose あるいは cellotriose を受容体として、上記の精製酵素を反応させた。反応生成物より非還元性の生成オリゴ糖を分取用薄層クロマトグラフィーで分離精製した。cellobiose を受容体基質とした場合、非還元性化合物は FDMS より分子量 528.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ を与え、cellotriose を受容体基質とした場合、分子量 690.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ を与えた。これらの結果から、得られた非還元性化合物はそれぞれ分子量 504 の 3 糖類と分子量 666 の 4 糖類と推定された。さらに ^{13}C -NMR スペクトルによって生成物を cellobiose を受容体基質とした場合には *O*- α -D-cellobiosyl-(1,2)- β -fructoside (Glc-Glc-Fru)、cellotriose を受容体基質とした場合には *O*- α -D-cellotriosyl-(1,2)- β -fructoside (Glc-Glc-Glc-Fru) であることを確認した。さらに後者は新規オリゴ糖であることが確認された。cellotetraose や cellopentose 等さらに重合度の高い基質を受容体とした場合には糖転移反応は認められなかった。

以上のように、galactosyl trehalose、cellobiosyl fructoside、cellotriosyl fructoside などの非還元性オリゴ糖を酵素を用いて合成することに成功した。これらは末端にアミノ基を持つ活性成分と化学的相互作用を起こさず、安定に組成物として配合できるオリゴ糖であるため添加物としての成分における機能低下の問題がなく、さらに酵素を用いた合成であるため、安全性の問題もないと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

Studies on the Synthesis of Some Non-reducing Saccharides Using Glycosidases

(グリコシダーゼを用いた非還元糖の合成に関する研究)

本論文は序論と結論を含めて5章で構成され、図38、表9、引用文献111を含む104頁の英文である。別に参考文献1編が添えられている。

糖質は極めて重要な栄養源であると同時に、甘味料など食品添加物としても重要であり、中でも小腸で消化されにくいオリゴ糖は、ビフィズス菌などの腸内細菌の増殖を促す機能性食品として盛んに用いられるようになってきた。このような中で、非還元性の糖質は、医薬、農薬、食品、化粧品等の固形製剤加工過程において褐変反応を抑える物質としても注目されている。従来の還元末端を持った糖類では、還元末端に反応性の高い還元基であるアルデヒドを持つため、末端にアミノ基を持った活性成分とメイラード反応等の化学的相互作用によりアミノカルボニル結合を形成して着色する場合があります、そのような活性成分を持った製剤中への糖添加を困難にしてきた。

本研究では、酵素を用いた還元末端を持たないオリゴ糖の合成を目的とし、市販の β -galactosidaseを用い lactose と trehalose から galactosyl trehalose を、新規に微生物より単離精製した β -fructosidaseを用い sucrose と cellobiose あるいは cellotriose から cellobiosyl fructoside および cellotriosyl fructoside など幾つかの非還元性糖質の酵素合成を行った。

1. 非還元性ガラクトシルオリゴ糖の合成

基質として用いた 3% lactose と 3% trehalose に対し *Bacillus circulans* 由来の市販の β -galactosidase (213U/530 ml) を 0.04 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、37°C、3時間反応した。反応生成物を全糖および還元性糖発色の TLC で分析した後、非還元性の生成物をゲル濾過および分取用薄層クロマトグラフィーを用い分離精製した。本化合物は FDMS より分子量 527.4 $[M+Na]^+$ および 543.3 $[M+K]^+$ を与え、この結果から、分子量 504 の 3 糖類と推定された。さらに ^{13}C -NMR スペクトルによって生成物を O- β -D-galactosyl-(1,4)- α ,

α -trehalose (Gal-Tre) と同定し、この非還元性である 3 糖類の温度および酸耐性性質を調べた。 O - β -D-galactosyl-(1,4)- α , α -trehalose は pH 2.0、100℃、30 分の条件において安定であることが確認された。

2. *Arthrobacter globiformis* IFO 3062 由来 β -fructosidase の精製

非還元性フラクトオリゴ糖を酵素により合成することを目的とし、fructose 転移活性の高い酵素の選抜を 12 種の *Arthrobacter* 菌株を用いて行った。4 菌株について目的の酵素活性が認められた。調べた菌株の中で最も高い糖転移活性を持つ *A. globiformis* IFO 3062 と *A. aureus* IFO 12136 について、1% polypeptone、0.2% 酵母エキストラクト、0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.4% $(NH_4)_2HPO_4$ および 3% sucrose の培地を用い詳細に酵素活性を調べた。得られた結果から *A. globiformis* IFO 3062 が酵素精製に最適な菌株と判断した。

糖転移活性を持つ酵素は DEAE-Toyopearl 650 M、Toyopearl HW-55 および Mono Q を用い分離精製された。分子量は 60,000、温度に対しては 40℃ まで、pH に関しては 5.5 - 9.5 の範囲で安定であった。また反応の最適温度および最適 pH は、それぞれ 37℃、6.8 であった。

3. 非還元性フラクトシルオリゴ糖の合成

sucrose を基質、cellobiose あるいは cellotriose を受容体として、上記の精製酵素を反応させた。反応生成物より非還元性の生成オリゴ糖を分取用薄層クロマトグラフィーで分離精製した。Cellobiose を受容体基質とした場合、非還元性化合物は FDMS より分子量 528.2 $[M+Na]^+$ を与え、cellotriose を受容体基質とした場合、分子量 690.8 $[M+Na]^+$ を与えた。これらの結果から、得られた非還元性化合物はそれぞれ分子量 504 の 3 糖類と分子量 666 の 4 糖類と推定された。さらに ^{13}C -NMR スペクトルによって生成物を cellobiose を受容体基質とした場合には O - β -D-cellobiosyl-(1,2)- α , β -fructoside (Glc-Glc-Fru)、cellotriose を受容体基質とした場合には O - β -D-cellotriosyl-(1,2)- α , β -fructoside (Glc-Glc-Glc-Fru) であることを確認した。さらに後者は新規オリゴ糖であることが確認された。Cellotetraose や cellopentoase 等さらに重合度の高い基質を受容体とした場合、糖転移反応は認められなかった。

以上のように、galactosyl trehalose、cellobiosyl fructoside、cellotriosyl fructoside などの非還元性オリゴ糖を酵素を用い合成することに成功した。これらは末端にアミノ基を持つ活性成分と化学的相互作用を起こさず、安定に組成物として配合できるオリゴ糖であるため添加物としての成分における機能低下の問題がなく、さらに酵素を用いた合成であるため、安全性に関しても何ら問題がないと考えられる。

以上の成果は、酵素を用いた新規非還元性オリゴ糖の合成を示したもので学術的に評価され、また今後、工業的に広く利用されるものと期待される。よって審査員一同は、Than Than Win が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。