

Bacillus 属菌2228株からのエンド- β -1,4-グルカナーゼによる 配糖体の合成

宮武 宗利¹⁾・林 幸男²⁾

Synthesis of Glycosides of an Endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus* sp.2228

Munetoshi MIYATAKE, Sachio HAYASHI

Abstract

Endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus* sp.2228 was found to have an endo-type transglycosylation activity. The enzyme effectively transferred celooligosaccharide residues to various alcohol in the presence of cellobiose as the oligosaccharide donor. 1-Pentyl-cellobioside was synthesized effectively at 40 °C for 36 hours or at 50 °C for 24 hours in the reaction mixture which contained endo- β -1,4-glucanase (100 U/ml) and cellobiose (20 w/v %) - 1-pentanol (1:1~4).

Key words:

Bacillus sp.2228, Endo- β -1,4-glucanase, Transglycosylation, Alkylcellobioside

1. 緒言

配糖体は自然界に多数存在し、薬理効果を持つものや天然色素として知られるのも多く、食品や医薬品等への応用も期待されている。また、アルキル配糖体は広範な物理化学的特性と生分解性を有することから、界面活性剤や洗剤、乳化剤として極めて有望な素材である。さらに最近では、生理活性物質を配糖化することで難溶性であったものを可溶化することができる。最近では、その中でも効力が強く香気前駆体や液晶としての機能性を有する二糖配糖体が注目されている^{1)~3)}。

配糖化反応には化学合成法と酵素的合成法の二つがある。一般に化学合成法では数段階の操作を経なければ

ならず、合成プロセスの簡略化、省エネルギー、省資源化の観点からもより有効な合成法の開発が望まれている。一方、微生物酵素の糖転移反応を利用した酵素的合成法は、安価な糖供与体を利用でき、温和な条件で位置・立体特異的に配糖化できるという点で優れている。

これまで一般に、微生物からの酵素での配糖化反応では *Aspergillus niger* 由来の β -キシロシダーゼや *Trichoderma* 由来の β -グルコシダーゼなどエキソ型の酵素が数多く研究されてきた^{4),5)}。しかし、エキソ型の酵素では単糖配糖体しか合成することが出来ず、二糖配糖体は生成しない。本研究では、エンド型の酵素を用いてセロビオースを糖供与体し二糖配糖体の合成を行ったので報告する。

1) 宮崎大学工学部物質環境化学科助手

2) 宮崎大学工学部物質環境化学科教授

2. 実験

2.1 使用菌株

供試菌として、宮崎県内の森林土壌より分離した *Bacillus* 属菌 2228 株を使用した。

2.2 酵素溶液の調製

菌の培養はカルボキシメチルセルロース (CMC) 1 w/v %、ポリペプトン 0.5 w/v %、酵母エキス 0.1 w/v %、りん酸水素二カリウム 0.3 w/v %、硫酸マグネシウム 0.1 w/v %、炭酸ナトリウム 0.5 w/v % を含む培地にて前培養 (30°C, 24 hours, 110rpm)、本培養 (30°C, 48 hours, 110rpm) を行った。遠心分離 (4°C, 10 min, 10,000rpm) により菌体を取り除いた培養上清を用いて、硫酸沈殿 (80%飽和)、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Toyopeal 650S)、2回のゲルろ過クロマトグラフィー (TSK-gel Toyopeal HW-55F) により酵素精製を行った。タンパク質の定量は Lowry 法により行った。電気泳動により単一であることを確認したものを酵素溶液として酵素反応に使用した。

2.3 酵素の活性測定

1.0 w/v % カルボキシメチルセルロースを含む基質溶液 (pH 7.5) 0.45ml に酵素溶液 0.05ml を加え、50°C で 15 分間反応させた後、Somogyi-Nelson 法にて生成した還元糖を測定した。なお、酵素活性の単位は生成する還元糖をグルコースに換算して、1 分間に 1 μ mol のグルコースを遊離する力価を 1 単位 (U) とした。

2.4 生成物の確認

生成物の確認は、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて行った。TLC はプレートとして Kiesel gel 60、展開溶媒として酢酸エチル：酢酸：水=5：2：1を用いた。発色には 20 % 硫酸溶液を噴霧した後、120°C で 5 分間加熱した。

2.5 各種アルコールに対する反応

各種アルコール (エタノール、1-プロパノール、1-ブタノール、1-ペンタノール、1-ヘキサノール、1-ヘプタノール、1-オクタノール、1-ノナノール)、もしくはその他のアルコール (3-メチル-1-ブタノール、4-ペンテン-1-オール、シクロペンタノール、*p*-ニトロフェ

ノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエタノール) 0.1ml に 20 w/v % セロビオース溶液 0.025ml と 100 U/ml 酵素溶液 0.025ml を加え、40°C で 48 時間反応を行い、TLC により生成物を確認した。

2.6 1-ペンチルセロビオシドの合成

2.6.1 酵素濃度の影響

1-ヘプタノール 0.1ml に 20 w/v % セロビオース溶液 0.025ml と 10~100 U/ml 酵素溶液 0.025ml を加え、40°C で 48 時間反応を行い、TLC により生成物を確認した。

2.6.2 セロビオース濃度の影響

1-ヘプタノール 0.1ml に 1~20 w/v % セロビオース溶液 0.025ml と 100 U/ml 酵素溶液 0.025ml を加え、40°C で 48 時間反応を行い、TLC により生成物を確認した。

2.6.3 アルコール量の影響

1-ヘプタノール 0.025~0.200ml に 20 w/v % セロビオース溶液 0.025ml と 100 U/ml 酵素溶液 0.025ml を加え、40°C で 48 時間反応を行い、TLC により生成物を確認した。

2.6.4 反応時間・反応温度の影響

1-ヘプタノール 0.1ml に 20 w/v % セロビオース溶液 0.025ml と 100 U/ml 酵素溶液 0.025ml を加え、30~50°C で 3~72 時間反応を行い、TLC により生成物を確認した。

3. 結果および考察

3.1 各種アルコールに対する反応

8 種のアルコールを糖受容体、セロビオースを糖供与体として *Bacillus* 属菌 2228 株からのエンド- β -1,4-グルカナーゼによる配糖化反応を行った (Fig. 1)。その結果、1-ブタノールから 1-ヘプタノールまでスポットを確認することができた。1-ブタノールが一番発色しており 1-ヘプタノールが一番薄かった。炭素鎖が増えるごとにスポットの大きさが小さくなり、収量が少なくなっていることが分かった。

アルコール以外のアルコールを糖受容体として配糖化反応を行った (Fig. 2)。3-メチル-1-ブタノールと

4-ペンテン-1-オールについては、1-ペンタノールに対して炭素数が5つの側鎖を含むアルコール、または2重結合を含むアルコールを比較したものであり、シクロペンタノールは鎖状と環状を比較したものである。*p*-ニトロフェノールとベンジルアルコール、2-フェニルエタノールについては、ベンゼン環を持つアルコールへの反応を確認するためのものである。その結果、3-メチル-1-ブタノールと4-ペンテン-1-オール、シクロペンタノール、2-フェニルエタノールでスポットを確認することができた。この中で、4-ペンテン-1-オールが最もよく発色していた。また、ベンゼン環に直接ヒドロキシル基が付いているものより、間にアルキル基を挿んだものの方が反応していた。

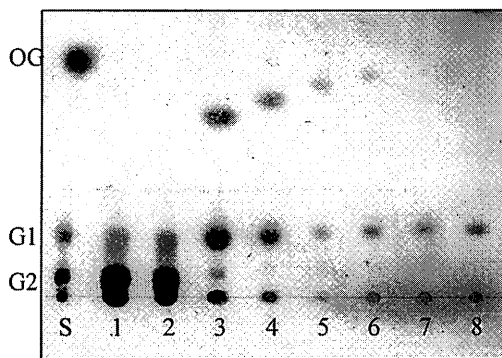


Fig.1. TLC analysis of reaction mixtures of endo-β-1,4-glucoamylase incubated with cellobiose and various 1-alcohols. Lanes: S, octyl-β-glucoside (OG), glucose (G1) and cellobiose (G2); 1, reaction mixture incubated with ethanol; 2, with 1-propanol; 3, with 1-butanol (butanol layer); 4, with 1-pentanol (pentanol layer); 5, with 1-hexanol (hexanol layer); 6, with 1-heptanol (heptanol layer); 7, with 1-octanol (octanol layer); 8, with 1-nonanol (nonanol layer).

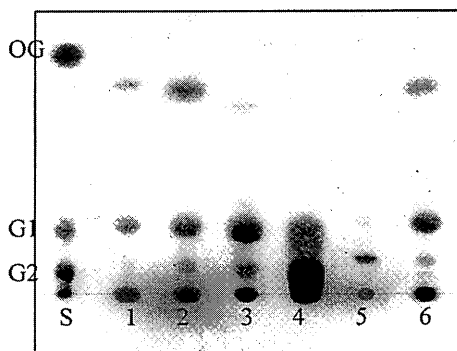


Fig.2. TLC analysis of reaction mixtures (alcohol layer) of endo-β-1,4-glucoamylase incubated with cellobiose and various alcohols. Lanes: S, octyl-β-glucoside (OG), glucose (G1) and cellobiose (G2); 1, reaction mixture incubated with 3-methyl-1-butanol; 2, with 4-penten-1-ol; 3, with cyclopentanol; 4, with *p*-nitrophenol; 5, with benzyl alcohol; 6, with 2-phenylethanol.

3.2 1-ペンチルセロビオシドの合成

1-ペンタノールを糖受容体、セロビオースを糖供与体として *Bacillus* 属菌 2228 株からのエンド-β-1,4-グルカナーゼによる 1-ペンチルセロビオシドの合成を行った。その配糖化反応において、種々の条件について検討した。

酵素濃度の影響については、10 U/ml ではセロビオースのスポットしか確認することができなかった。酵素濃度が 60~100 U/ml の間では配糖体の存在が確認することができ、酵素濃度が高いほど収量が多いことが分かった。

セロビオース濃度の影響では、1~20 w/v % であれば配糖体が合成され、セロビオースの濃度が高いほど発色が徐々に濃くなっていることが分かった (Fig. 3)。

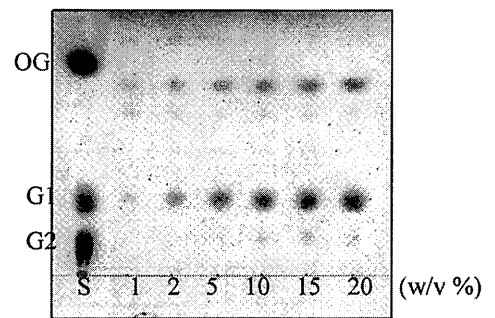


Fig.3. Effect of cellobiose concentration on transglycosylation activity of endo-β-1,4-glucoamylase with cellobiose and 1-pentanol. Lanes: S, octyl-β-glucoside (OG), glucose (G1) and cellobiose (G2).

アルコール量の影響では、0.025~0.200 ml の間で配糖体を確認することができた (Fig. 4)。また、アルコールの量が 0.200 ml のときはセロビオースのスポットを確認することができた。アルコールの量はセロビオース溶液を含む水相に対して、同量から 3 倍量までが最適であることが分かった。

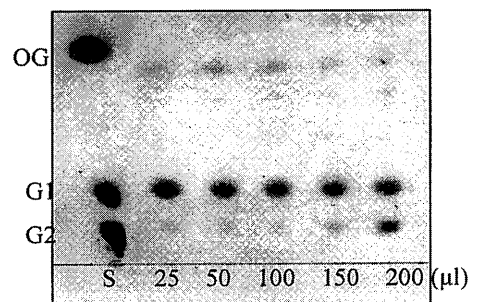


Fig.4. Effect of alcohol volume on transglycosylation activity of endo-β-1,4-glucoamylase with cellobiose and 1-pentanol. Lanes: S, octyl-β-glucoside (OG), glucose (G1) and cellobiose (G2).

反応温度の影響では、30°Cにおいてセロビオースのスポットが濃く発色しており、反応が余り進行していないことを示していた (Fig. 5)。

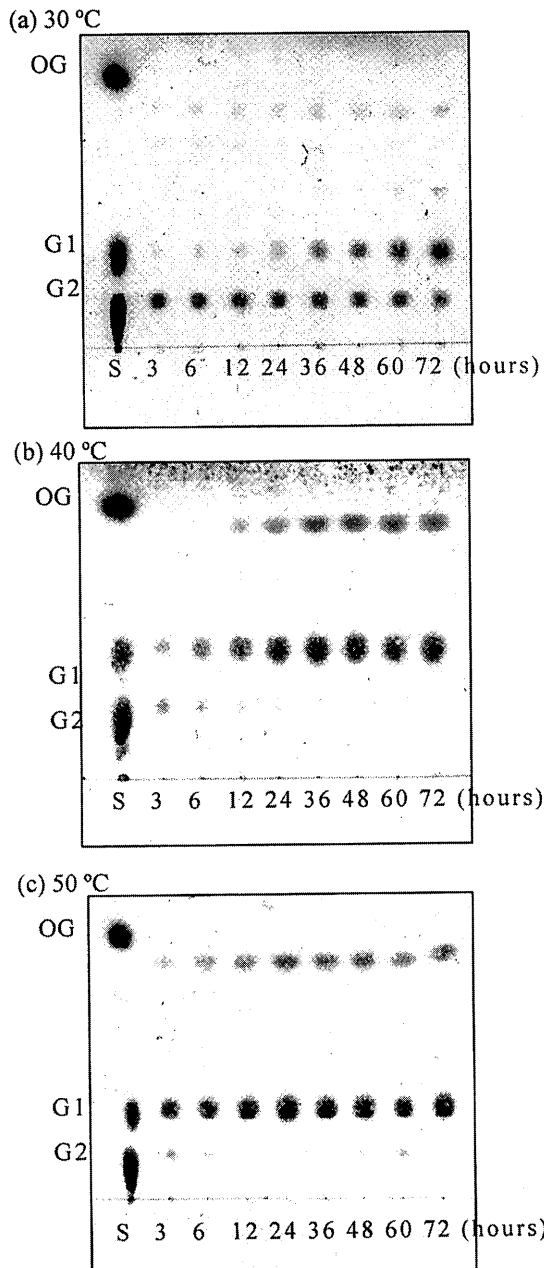


Fig.5. Time course of transglycosylation activity of endo- β -1,4- glucanase with cellobiose and 1- pentanol. Lanes: S, octyl- β -glucoside (OG) , glucose (G1) and cellobiose (G2).

40°Cにおいては12時間以降、50°Cにおいては3時間以降から配糖体のスポットが確認することができた。40°Cでは36時間以降、50°Cでは24時間以降は発色の濃さは変化しなかった。反応時間としては、40°Cで36時間、50°Cで24時間が最適であることが分かった。

4 まとめ

- (1) セロビオースを糖供与体として *Bacillus* 属菌 2228 株からのエンド- β -1,4-グルカナーゼは、炭素鎖4~8の1-アルカノールを糖受容体として二糖配糖体を合成することができた。
- (2) ベンゼン環に直接付いたヒドロキシル基については、あまり配糖化反応が起こらないことが分かった。
- (3) 1-ペンチルセロビオシドの合成において、酵素濃度とセロビオース濃度が高く、アルコールの量はセロビオース溶液を含む水相に対して、同量から4倍量までが最適であることが分かった。
- (4) 1-ペンチルセロビオシドの合成において、40°Cで36時間、50°Cで24時間が最適であることが分かった。

参考文献

- 1) T. Nishimura, T. Kometani, S. Okada, Y. Kobayashi, S. Fukumoto, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **45**(3), 186-191 (1998).
- 2) T. Kimura, M. Utida, H. Nakajima, M. Dombou, *J. Appl. Glycosci.*, **47**(1), 55-59 (2000).
- 3) Y.-D. Ma, A. Takada, M. Sugiura, T. Fukuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 346-351 (1994).
- 4) H. Shinoyama, K. Takei, A. Ando, T. Fujii, M. Sakaki, Y. Doi, T. Yasui, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1679-1681 (1991).
- 5) H. Shinoyama, A. Ando, T. Fujii, T. Yasui, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 849-850 (1991).