



## Kobe Shoin Women's University Repository

Title	ショ糖とケストース共存下の納豆菌レバンスクララーゼによるレバンとオリゴ糖の合成について Synthesis of Levan and Oligosaccharides from the mixture of sucrose and kestose by Levansucrase of <i>Bacillus natto</i> .
Author(s)	飯塚 勝 (Iizuka Masaru)
Citation	神戸松蔭女子学院大学研究紀要人間科学部篇 Journal of the Faculty of Human Sciences, Kobe Shoin Women's University , No.2 : 27-35
Issue Date	2013
Resource Type	Bulletin Paper / 紀要論文
Resource Version	
URL	
Right	
Additional Information	

# シヨ糖とケストース共存下の納豆菌レバンスクララーゼによるレバンとオリゴ糖の合成について

飯塚 勝

神戸松蔭女子学院大学人間科学部

Author's E-mail Address: iizukaenzyme(a)yahoo.co.jp

---

## Synthesis of Levan and Oligosaccharides from the mixture of sucrose and keystone by Levansucrase of *Bacillus natto*.

IIZUKA Masaru

Faculty of Human Sciences, Kobe Shoin Women's University

### Abstract

納豆菌をはじめ類縁の枯草菌はシヨ糖を含む培地で培養すると高分子のレバンを合成するが、その途上でまずシヨ糖が酵素の転移作用でフルクトースを1つ受け取った3糖のケストース（受け取ったフルクトースが結合するシヨ糖の部位により3種類できる：1-kestose, 6-kestose, neo-kestose）を生成する。

それらは一般には高分子を作る酵素の性質からアクセプターとなりうる物質の分子量の大きいものの方が親和性が高いためか、順次フルクトースを転移して鎖長を伸ばすため、多量の高分子レバンの蓄積が認められ、オリゴ糖のケストース類の蓄積はわずかである。これらオリゴ糖のケストースは腸内細菌の成長促進因子として、ビフィズス菌や乳酸菌に優先的に利用され、腸内細菌叢の善玉菌を増やし、整腸作用や便秘改善などの働きをもつ。

そこでオリゴ糖の蓄積をコントロールする条件を探してみた。

まず3糖のケストースを合成・分離し、ケストースとシヨ糖共存下での反応を行って生成物を分析した。1-及び6-ケストースの場合にはレバンは合成されたが、相対的には少なく、小さい分子鎖長のオリゴ糖のシリーズの蓄積が認められた。しかし、ネオケストースの場合にはシヨ糖分子中のグルコース C6 位に結合したフルクトースはそのままであったが、シヨ糖分子を構成していたフルクトースが切断され、6-O-β-D-fructosyl-D-glucose となり、アクセプター分子となりにくいのかレバンの生成量は少なかった。生成したレバンは末端にグルコースを持っているもの（6-O-β-D-fructosyl-D-glucose）とネオケストースが末端にあるものが約3:1であった。

1-及び6-ケストースを共存させた場合のレバンはショ糖から新たにケストースが作られ、それがアクセプターとなるのではなく共存させたそれぞれのケストースが末端に認められた。このことはレバンビオース共存下に合成されたレバンの末端がレバンビオースのみであったことと同様であった。

キーワード：納豆菌レバンスクララーゼ、レバン、ケストース、6-O-β-D-fructosyl-D-glucose

## はじめに

納豆菌はショ糖を含む培地に生育すると粘性のある高分子のレバンを合成する。

その過程で、レバンを作る酵素、レバンスクララーゼはショ糖基質に作用し、ケストースを合成し、それにフルクトースを順次転移して鎖長を伸ばし数百万の分子量を持つレバンを合成する。しかし、オリゴ糖の蓄積は反応条件によるが、一般には少ない。

なので、アクセプター糖として、ケストースをはじめから共存させた場合にはどのような生成物が得られるか2, 3 検討してみた。

## 方法

**酵素の調製** レバンスクララーゼは脱脂大豆を熱水抽出し、得られた液にショ糖、リン酸アンモニウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、酢酸カルシウムを加えた半合成培地 (pH7.2) で16時間静置培養し、菌膜形成したものを集菌し、水道水で数回遠心洗浄し、2M NaCl 溶液に懸濁し、攪拌した後遠心分離して遊離した酵素溶液 (上澄) を用いた。

**ケストースの調製** 熱帯の果実 (図1. Palm; *Zalacca edulis*) の果肉を乳鉢で碎き、水を加え、遠心分離して得た溶液を DEAE-cellulose カラムに吸着させた後、1M の食塩水で溶出し、それを用いた。

ショ糖溶液と酵素溶液を加え、一定時間反応させ、HPLC で生成物を確認した後 Bio Gel P-2 のゲルクロマトグラフィーで分離した (図2-a,b)。

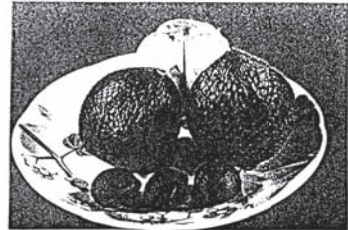


図1 *Zalacca edulis* (Palm)

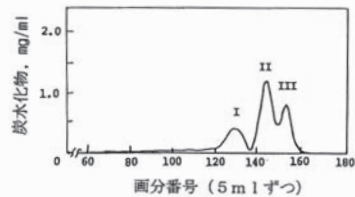
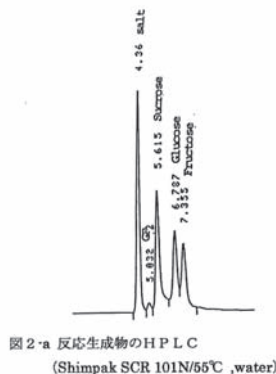


図2-b 反応生成物のゲルクロマトグラフィー (Bio Gel P-2, 4.5 X 51cm)  
I, 3糖 II, ショ糖及びグルコース  
III, グルコース及びフルクトース

3種ケストースの相互の分離 ケストースの混合液 (図3) を高速液体クロマトを繰り返し分離した (図4)。

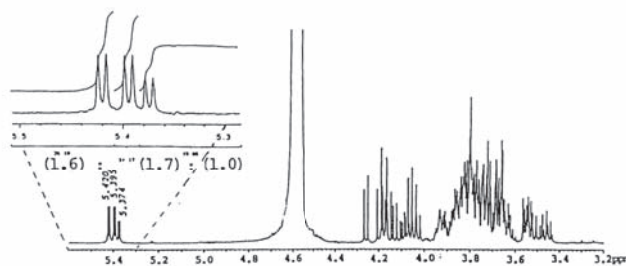


図3 *Zizania edulis* の酵素 (スクラーゼ) によるシヨ糖からの生成物 (GF<sub>2</sub>) のプロトンNMR

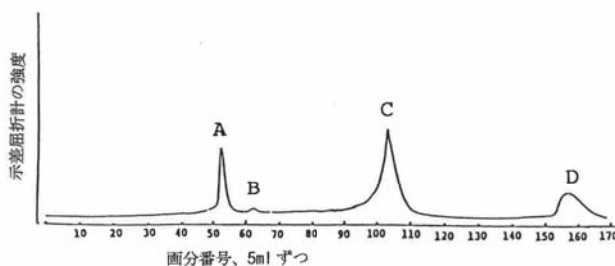


図4 分離用HPLC (DISOPAK SP-120-25-ODS B)によるケストースの分離

酵素反応 シヨ糖とケストース (1:1) の混合液に酵素を加え 30℃ で反応を行い、HPLC で生成物を確かめ、TLC と NMR で同定した。

酵素反応による生成物の同定 a.TLC (薄層クロマトグラフィー)、シリカゲルプレートを用い、n-ブタノール-ピリジン-水 (8:1:1) の溶液で ambient temp. (室温) で 5~6 時間展開し、乾燥後エタノール-concH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混液 (9:1,v/v) に浸し、乾燥後 110℃、5-10 分加熱発色させた。

b.HPLC (高速液体クロマト、島津製作所製クロマトパック LC3A に shimpack SCR101N (0.78 X 300mm) カラムを装備したもので、分離液は純水、カラム温度 55℃、検出器は示差屈折計で行った。

c.NMR (核磁気共鳴スペクトルメトリー) D<sub>2</sub>O に溶かした試料を Varian-Unity plus 500 の装置で内部標準物質に DSS (sodium-4,4-dimethyl-4-sila pentane sulfonate) を用いて 40℃ で測定した。

## 結果と考察

### 調製用の HPLC で分けた画分の同定

図 5-a に示すように画分 A, B, C はケストース成分はピークが重なることなく分離し、A は 6-ケストース、C は 1-ケストース、D はネオケストースと同定された。(図 5-b は TLC の結果を示す。)

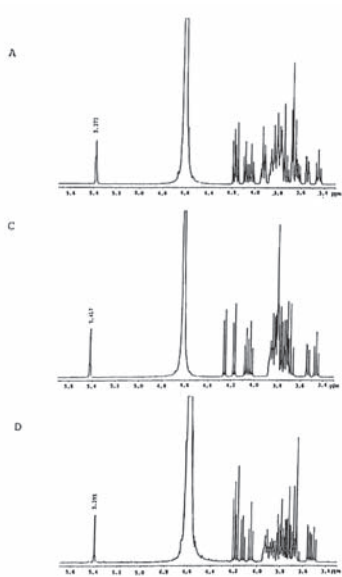


図 5-a 分離したケストースのプロトンNMR

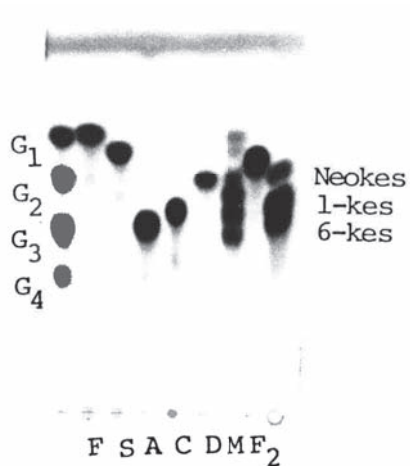


図 5-b 分離したケストースの薄層クロマトグラフィー

## シヨ糖と6-ケストース共存下のレバンスクララーゼの反応

シヨ糖と6-ケストースを共存させて納豆菌レバンスクララーゼを作用させた場合の生成物は図6-aで、経過時間を追うと一連の転移生成物が合成され小さい方から大きい方へ生成物の量が増えていくのが認められる。図6-bはゲルクロマトで分離したそれぞれの大きさのもののプロトンNMRで、末端のシヨ糖ユニット中のグルコースC1位のプロトンに基づくケミカルシフト(3.731ppm)のみが見られる。

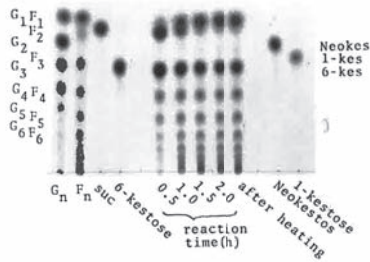


図6-a シヨ糖と6-ケストース(1:1)共存下の納豆菌レバンスクララーゼの反応生成物  
展開溶媒: n-butanol-ethylacetate-water (7:1:2)

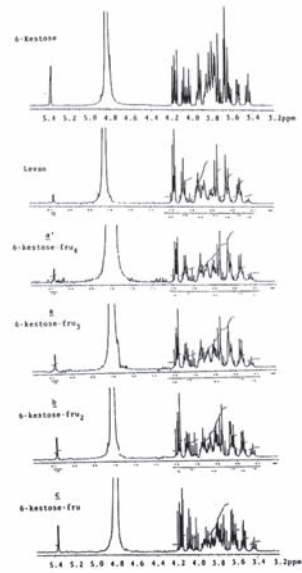


図6-b シヨ糖と6-ケストース共存下に合成された生成物

シヨ糖と1-ケストース共存下のレバンスクララーゼの反応

同様にして行なった反応の結果を示す。図 7-a に生成物の経時的变化を図 7-b にプロトン NMR を示す。この場合もシヨ糖から新たにケストースが合成されたものでなく、低磁場のピーク (5.4ppm 付近) は 1-ケストース中のグルコース C1 のプロトンによるケミカルシフトのみであった。

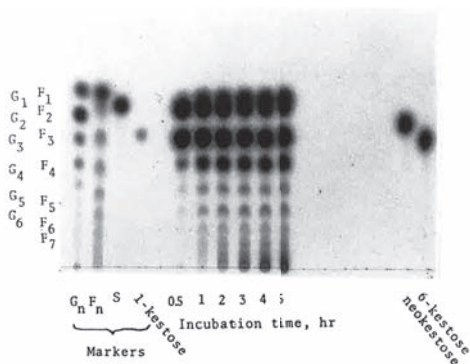


図 7-a シヨ糖と1-ケストース (1:1) 共存下の納豆菌レバンスクララーゼの反応生成物  
展開溶媒: n-butanol-ethylacetate-water (7:1:2)

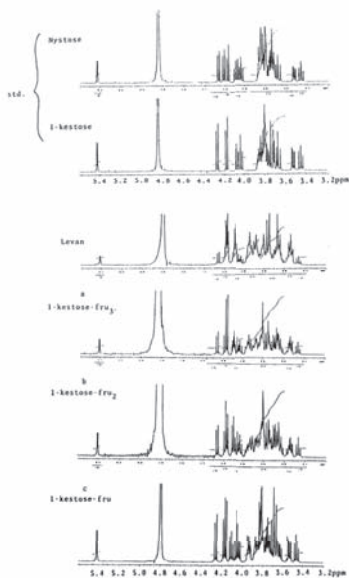


図 7-b シヨ糖と1-ケストース共存下に合成された生成物

ショ糖とネオケストース共存下のレバンスクララーゼの反応

この場合の転移生成物は極めて少なく、分離はできなかった。そこでネオケストースのみを基質としたレバンスクララーゼの反応をしらべてみた。

図8に生成物の薄層クロマト図を示したが、経時的に転移生成物のオリゴ糖シリーズの顕著な増加は見られず、長時間の後レバンの合成が認められた。

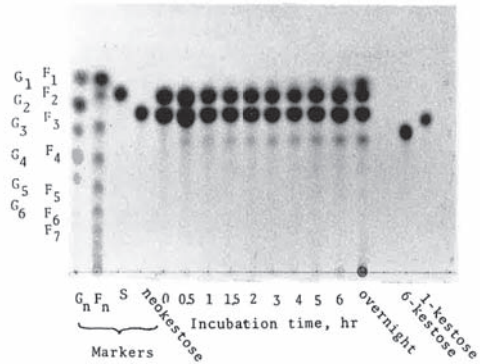


図8 ショ糖とネオケストース (1 : 1) 共存下の納豆菌レバンスクララーゼの反応生成物  
展開溶媒 : n-butanol-ethylacetate-water (7:1:2)

そこで、反応結果をHPLCで調べてみたものが図9-aで、分解生成物とレバン合成が認められた。ゲルクロマトによる生成物の分離結果は図9-bで、レバンと2糖がえられた。図9-cは2糖のNMR (GHMQC) で、ネオケストース中のショ糖ユニットのフルクトースが切り離されてできた6-O-β-D-fructosyl-D-glucoseであることが判明した。

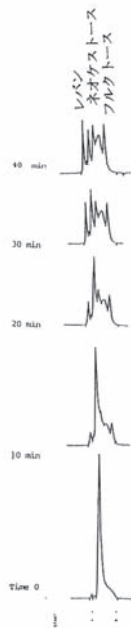


図9-a 納豆菌のレバンスクララーゼによるネオケストースからのレバンの合成

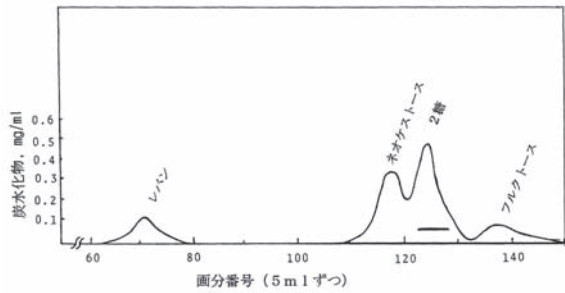


図9-b 納豆菌のレバンスクララーゼによるネオケストースからの反応生成物のBio Gel P-2(4.5 X 61cm)ゲルクロマトグラフィー

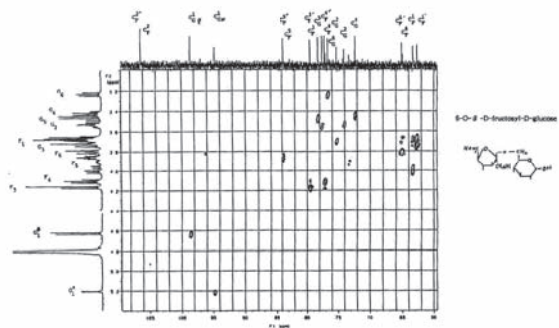


図9-c 分離したネオケストースからレバンスクララーゼにより分解生成した2糖の2D (GHMQC) NMR



### レバン合成の条件（基質の違い）による生成物の比較

図 10 はそれぞれの基質存在下に合成されたレバンのプロトン NMR を示す。

ショ糖のみの場合は 1- および 6- ケストースを末端に有するレバンがほぼ 1:1 に生成し、6- ケストース共存下では末端に 6- ケストースが認められ、それが出発アクセプターであることが判明した。

1- ケストース共存下の場合は 1- ケストースが出発アクセプターとなっている。ネオケストースのみの場合はネオケストース中のショ糖ユニットのフルクトースが切り離され、多くは 6- O -  $\beta$  -D-fructosyl-D-glucose が遊離し、アクセプターとなりにくい状態となっているような結果である。

しかし、合成されたレバンにはネオケストースを末端に有するものも量比では少ないが、6- O -  $\beta$  -D-fructosyl-D-glucose を末端に有するものも存在することが判明した。ショ糖のみの場合の末端にネオケストースが検出されるほど見当たらなかったのはこのことを反映しているものと思われる。

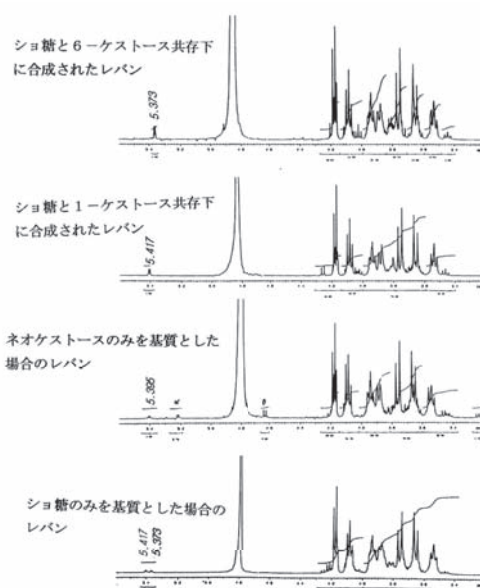


図 10 分離したレバンのプロトン NMR

結果として機能性を有するオリゴ糖作成にはある種条件（基質の種類選別）設定で、反応を行うと目的物質を多く作成することができることが判明した。

## 謝 辞

本研究の一部に参加された Dr. Trisanti Anindyawati (JI.Raya Bogor Km.46、RC for Biotechnology-LIPI Cibinong 16911) に感謝致します。

## 参考文献

- (1) M.IIZUKA, T.Mima, Y.Ben Ammar, K.Ito and N.Minamiura, Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* levansucrase, *J.Appl.Glycosci.*,49,pp.229-237 (2002)
- (2) 飯塚 勝、バイオポリマー - エキソポリサッカライド、微生物利用の大展開 (株) エヌ・ティ・エス、pp.1012 ~ 1020
- (3) 飯塚 勝、納豆菌のレバンスクララーゼによるレバンの合成 (分岐形成) のメカニズムについて、神戸松蔭女子学院大学研究紀要人間科学部編 No.1、pp.19-28 (2012年3月)

- (4) Yukiko Yamamoto, Yuko Takahashi, Mitsuyoshi Kawano, Masaru Iizuka, Takashi Marumoto, Shigeru Saeki, and Hidemasa Yamaguchi In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats, *J.Nutr. Biochem.*, **10**, 13-18, 1998 (Elsevier Science Inc.)

(受付日 : 2013. 1. 10)