Flavobacterium dormitator var. *glucanolyticae* の β -1, 3-グルカナーゼによる糖転移

枝 広 知 新・山 本 晋 平*
(池田糖化工業<株>, *高知大学農学部)

平成3年5月20日受理

Transglycosylation to Stevioside by β -1, 3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*

Synthesis of Stevioside Derivatives by Enzymatic Transglycosylation (Part 5)

Tomoyoshi EDAHIRO and Shimpei YAMAMOTO*

(Ikeda Tohka Industries Co., Ltd., 95-1 Minooki-cho, Fukuyama-shi, Hiroshima

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kochi University, Nankoku, Kochi)

Transglycosylation to stevioside by β -1, 3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5, in the presence of β -1, 3-glucans has been observed to give a series of glycosylated steviosides. One of the glycosylated steviosides derived from stevioside and laminaran by the β -1, 3-glucanase, ST-1, was purified by silicagel column chromatography. By chemical modification and ^{13}C -NMR spectroscopy, the ST-1 was identified as a β -1, 3-monoglycosyl stevioside which was glycosylated at the terminal glucose residue of C-13 sophorose side chain of stevioside molecule. Other products of the glycosylated steviosides were identified as a series of steviosides having different lengths of linear β -1, 3-linked glucose residues.

Key words : ステビオサイド・酵素的糖転移・ β -1, 3-グルカナーゼ

緒 言

南米パラグアイ原産のキク科多年生植物、ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI.) は、その葉中に、ステビオサイド^{1~3)}、レバウディオサイド-A^{4~6)}、-C⁷⁾、-D、-E⁸⁾、ダルコサイド-A⁹⁾などのジテルペン系配糖体甘味物質を含んでいる。わが国ではこれらの甘味成分が種々食品に利用されている^{10~12)}。一般に、ステビオサイドはステビア葉中の甘味物質のなかで含量が最も多く、ステビア抽出物中の甘味の主体をなしている^{13,14)}。ステビオサイドは甘味度が砂糖の約300倍で甘味質が比較的砂糖に近い反面、苦味や渋味を呈する^{15~17)}。このため、甘味質を改善する手段として *Bacillus* 属の生産する cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC. 2. 4. 1. 19, CGT-ase) によるステビオサイドへの酵素的糖転移^{18~24)}や、ステビオサイドからレバウディオサイド-A を化学合成する研

酵素的糖転移によるステビオサイド誘導体の合成 (第5報)

究がなされている^{19,25)}。

ここでは、*Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5^{26,27)} の生産する β -1, 3-グルカナーゼ^{28~30)} の糖転移反応を利用して、ステビオサイドへの酵素的 β -1, 3-糖転移を検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌株

供試菌株として山本・長崎が分離した *F. dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5^{26,27)} を使用した。

2. β -1, 3-グルカナーゼの生産と精製

山本・長崎の方法²⁷⁾ に準じて *F. dormitator* var. *glucanolyticae* を培養 (3,000 ml) し、酵素を生産した。酵素は、山本・長崎らの方法²⁸⁾ に準じて、ディスク電気泳動的に均一になるまで精製した。精製酵素の液量は、25 ml、 β -1, 3-グルカナーゼ活性は、125 unit/ml、タンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準品とし

て 280 nm の吸光度を測定した結果, 1.1 mg/ml であった。

3. β -1,3-グルカナーゼの活性測定方法

0.1 M コハク酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に溶解したラミナラン溶液 (5 mg/ml) の 0.5 ml に, 適当に希釈した酵素液 0.5 ml を加えて全量を 1.0 ml とし, 40°C, 10 分間反応させた。Somogyi 試薬 1.0 ml を加えて反応を停止させ, 生成した還元糖を Somogyi-Nelson 法で定量した。10 分間に 1 μ mole の還元糖当量 (グルコースとして) を生成させる酵素量を 1 単位とした。

4. 薄層クロマトグラフィー

前報²¹⁾の方法によった。

5. 糖転移ステビオサイドの調製

グルコース供与体としてラミナラン, パキマンおよび酵母グルカンを用いた。50 mg/ml 濃度のグルコース供与体水溶液または懸濁液 0.5 ml に 50 mg/ml 濃度のステビオサイド水溶液 0.5 ml を加え, これに 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 1 ml を加えた後, β -1, 3-グルカナーゼ酵素液を 60 μ l (7.5 unit) 加えて 40°C で 15 時間反応させた。沸騰水中で 10 分間加熱して反応を停止させた後, 13,000 $\times$ g, 10 分間の遠心操作で沈でん物を取り除いた。この反応液に水を加えて 20 ml とし, 吸着樹脂 (三菱化成製ダイヤイオン HP-20) 5 ml を加え, よく攪拌して未反応のステビオサイドおよび糖転移ステビオサイドを吸着させた。この樹脂を水 50 ml で 3 回洗浄した後, メタノール 50 ml で未反応ステビオサイドおよび糖転移ステビオサイドを溶出させた。溶出液を濃縮乾固した後, メタノール:水=1:1 の溶媒 1 ml に溶解した。

6. 糖転移ステビオサイドの精製

ステビオサイド 4 g, ラミナラン 4 g を 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 10 ml に溶解し, β -1, 3-グルカナーゼ酵素液 10 ml (1250 unit) を加えて 40°C で 24 時間反応させた。沸騰水中で 10 分間加熱して反応を停止させた後, 水を加えて 200 ml に希釈した。この希釈液を吸着樹脂 HP-20 カラム (5.0 $\times$ 60 cm) に通し, 未反応のステビオサイドおよび糖転移ステビオサイドを吸着させた。この樹脂を水 3 l で洗浄した後, メタノール 500 ml で未反応ステビオサイドおよび糖転移ステビオサイドを溶出させた。溶出液を濃縮乾固して 5.2 g の反応生成物を得た。

乾燥した反応物 3 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ワコーゲル C-200 カラム, 2.8 $\times$ 52 cm, 展開溶媒はクロロホルム:メタノール:水=30:20:4, 流速 6 ml/min) にて分画した。

7. 糖転移ステビオサイドの化学的加水分解

a. 酸加水分解物の調製

糖転移ステビオサイド 5 mg を水 1 ml に溶解し, その溶液 0.1 ml に 0.8 N 硫酸 0.9 ml を加えてガラス管に封入し, 100°C で 3 時間加水分解した。その後, 0.8 N 水酸化バリウムで中和し, 遠心分離して得た上澄み液を減圧濃縮した。

b. アルカリ加水分解物の調製

上記糖転移ステビオサイド溶液 (5 mg/ml) 0.1 ml に 0.8 N 水酸化カリウム 0.9 ml を加えてガラス管に封入し, 100°C で 1 時間加水分解した。その後, 0.8 N 塩酸で中和し, ガラスフィルターで濾過して得た上澄み液を減圧濃縮した。

8. メチル化とメチル化糖のガスクロマトグラフィー

糖のメチル化は箱守法³¹⁾によった。島津製 GC-6A ガスクロマトグラフによりメチル化糖を 2% OV-1 (0.3 $\times$ 200 cm) カラムを用いて 160°C の条件で, TMS 化糖を 3% ECNSS-M (0.3 $\times$ 200 cm) カラムを用いて 180°C の条件で測定した。内部標準はそれぞれ Methyl-2, 3, 4, 6-tetra-O-methylglucoside と TMS-2, 3, 4, 6-tetra-O-methylglucoside を用いた。

9. ¹³C FT-NMR スペクトルの測定

前報²¹⁾の方法によった。

10. 試薬類

ステビオサイドおよびレバウディオサイド-A は, それぞれメタノール-水の系にて 4 回以上再結晶し, 薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによってステビオサイドまたはレバウディオサイド-A 以外のスポットやピークが検出されなくなるまで精製したものをを用いた。イソステビオールは, ステビオサイドを硫酸で酸加水分解²⁾して調製した。ステビオールピオサイドとレバウディオサイド-B は, それぞれステビオサイドとレバウディオサイド-A をアルカリ加水分解¹⁾して調製した。ラミナランは, 東京化成工業(株)製を, パキマンは, 市販の伏苓を微粉末として使用した。酵母グルカンは MISAKI ら³²⁾の方法でパン酵母から調製した。

実験結果

1. β -1,3-グルカナーゼによるステビオサイドへの糖転移作用

実験材料および方法の項 5. に述べた条件で各種グルコース供与体を用いて糖転移反応させたものを部分精製し, 得られた溶解液を薄層クロマトグラフィーによって分析した。結果を Fig.1 に示す。ラミナラン, パキマンおよび酵母グルカンともにステビオサイドのスポット

Fig. 1 Thin-Layer Chromatogram of Steviosides Glycosylated with β -1,3-glucans by β -1,3-glucanase.

L, Laminaran; P, Pachyman; Y, Yeast glucan; ST, Stevioside; R-B, Rebaudioside-B; R-A, Rebaudioside-A and G, Glucose

より下に新たな複数のスポットが見られ、糖転移ステビオサイドの生成が認められた。また、ステビオサイドおよび糖転移ステビオサイドのそれぞれのスポットの R_f 値の対数とグルコース数の関係は Fig. 2 に示すように直線関係にあった。この French-Wild 解析³³⁾によって、生成した糖転移ステビオサイドは、ステビオサイドにグルコース 1~6 個が同配向、同結合で糖鎖延長された糖転移ステビオサイドのシリーズであることが認められた。

2. 糖転移ステビオサイドの精製

実験材料および方法の項 6. に述べた条件でステビオサイドとラミナラン各 4g から糖転移ステビオサイドを調製し、精製した。未反応ステビオサイドの画分の直後に溶出するグルコースが 1 個結合したと考えられる糖転移ステビオサイドを分画した。分画した溶出液を濃縮乾燥して薄層クロマトグラフィー的に単一の糖転移ステビオサイド ST-1 を 150 mg 得た。

3. 糖転移ステビオサイド (ST-1) の化学的加水分解物の TLC

実験材料および方法の項 7. に述べた条件で得た糖転移ステビオサイド ST-1 の酸およびアルカリ加水分解濃縮液を薄層クロマトグラフィーで分析した。結果を Fig. 3 に示す。酸加水分解物ではイソステビオールとグルコースの位置にスポットが現われた。アルカリ加水分解物では、レバウディオサイド-B に近いやや高い位置とグルコースの位置にスポットが検出された。

4. 糖転移ステビオサイド (ST-1) 等のメチル化糖の GLC

糖転移ステビオサイド ST-1, ステビオサイドおよび

Fig. 2 French-Wild Analysis of Glycosylated Steviosides.

$\ln(R_f)$ values of glycosylated steviosides were plotted against the number of glucose units in glycoside molecules.

Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of Acid Hydrolysate (A) and Alkaline Hydrolysate (B) of Purified Glycosylated Stevioside (ST-1).

Iso, Isosteviol; STB, Steviolbioside; ST, Stevioside; R-B, Rebaudioside-B; R-A, Rebaudioside-A and G, Glucose

レバウディオサイド-A を箱守法³¹⁾によって完全メチル化した後、加水分解して、メチル化糖の構成比率をガスクロマトグラフィーで測定した。結果を Table 1 に示す。糖転移ステビオサイド ST-1 の総グルコース数は 4 個であるから、2, 3, 4, 6-:3, 4, 6-:2, 4, 6-の各メチルグルコシドの比は 2:1:1 であった。

5. 糖転移ステビオサイド (ST-1) の ^{13}C FT-NMR スペクトル

糖転移ステビオサイド ST-1 の ^{13}C FT-NMR スペクトル測定結果を既知のステビア系配糖体とともに Table 2 に示す。

Table 1 Molar Ratio of Methyl and TMS Sugar of Stevia Glycosides and Glycosylated Stevioside, ST-1.

	Molar ratio of methyl and TMS sugar			
	2,3,4,6-	3,4,6-	2,4,6-	4,6-
Steviolbioside	1.00	0.77-0.89	0.00	0.00
	1.00	0.75-0.95	0.00	0.00
Stevioside	1.00	0.44-0.51	0.00	0.00
	1.00	0.38-0.46	0.00	0.00
Rebaudioside-A	1.00	0.00	0.00	0.27-0.30
	1.00	0.00	0.00	0.29-0.30
Rebaudioside-B	1.00	0.00	0.00	0.43-0.49
	1.00	0.00	0.00	0.41-0.55
ST-1	1.00	0.40-0.47	0.52-0.55	0.00
	1.00	0.44-0.47	0.57-0.61	0.00

Upper : Methyl sugar
Lower : TMS sugar

考 察

F. dormitator var. *glucanolyticae* FA-5^{26,27)} の生産する β -1,3-グルカナーゼ^{28~30)} の糖転移反応によるステビオサイドへの酵素的糖転移を検討した。本酵素は加水分解酵素でありながら、ラミナラン、バキマン、酵母グルカンを糖供与体としてステビオサイドに糖転移をした。糖転移ステビオサイドはグルコースが1~6個糖鎖延長された糖転移ステビオサイドのシリーズであった。これらの糖転移ステビアのシリーズのうち、ステビオサイドにグルコースが1個糖鎖延長された糖転移ステビオサイド ST-1 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。ST-1 のアルカリ加水分解物の薄層クロマトグラフィーではレバウディオサイド-B に近いがやや高い位置およびグルコースの位置にスポットが現われた。ステビア系配糖体はアルカリ加水分解によって、アグリコン部の C-19 位のエステル型グリコシド結合が加水分解される¹⁾ことから、これは ST-1 が加水分解された結果、レバウディオサイド-B に類似した物質とグルコースに分かれたものと考えられる。ST-1 を箱守法³¹⁾によって完全メチル化した後、加水分解して構成メチル化糖をガスクロマトグラフィーで分析したところ、2, 3, 4, 6-: 3, 4, 6-: 2, 4, 6-の各メチルグルコシドの比は2:1:1であった。この結果から、ST-1 の化学構造は、ステビオサイドの C-13 位ソホロースの末端グルコース残基に1個のグルコース残基が β -1,3-グリコシド結合した新規なモノグリコシルステビオサイドであると決定した。ST-1 の化学構造を Fig. 4 に示す。なお、この決定は、¹³C-NMR による解析結果からも支持されるものである。すなわち、ステビオサイドの C-

Table 2 ¹³C-NMR Chemical Shifts of Glycosylated Stevioside, ST-1 (in C₃D₅N) and Some Stevia Glycosides.

	Estimated	Values from Reference ^{5, 6, 25)}					
	ST-1	ST	R-A	STB	Sol	Sol-M	Rubs
C-1	41.5	40.7	40.9	40.9	41.1	41.0	40.7
2	20.2	19.2	19.4	19.7	19.8	19.7	19.3
3	39.1	38.1	38.3	38.5	38.6	38.4	38.2
4	44.7	43.9	44.0	43.8	43.9	43.8	44.0
5	58.0	57.3	57.4	56.9	57.1	56.9	57.3
6	22.9	22.0	22.2	22.4	22.6	22.5	22.0
7	42.3	41.5	41.8	41.5	41.8	41.6	41.6
8	43.3	42.5	42.4	42.4	41.8	42.1	42.4
9	54.6	53.8	54.0	54.1	54.3	54.1	53.9
10	40.5	39.7	39.8	39.6	39.8	39.7	39.8
11	21.5	20.6	20.7	20.5	20.8	20.6	20.7
12	37.4	36.6	37.3	37.2	40.7	38.4	37.1
13	86.7	85.9	86.1	86.1	79.8	86.4	85.8
14	45.1	44.3	44.5	44.7	47.4	44.6	44.4
15	48.2	47.5	47.9	47.9	48.1	48.2	47.8
16	154.9	154.3	153.9	154.0	157.6	153.7	154.3
17	105.6	104.5	104.5	104.9	102.9	104.9	104.5
18	28.9	28.2	28.3	29.2	29.3	29.2	28.2
19	177.7	177.0	177.1	180.1	180.0	180.0	176.9
20	15.9	15.4	15.5	15.9	15.9	15.7	15.5
G ¹ -1	96.4	95.6	95.6				95.7
2	74.5	73.8	73.8				73.8
3	78.7	79.0	78.8				78.9
4	70.1	70.8	70.8				70.9
5	(78.7)	79.0	78.8				78.9
6	62.7	61.9	62.3				61.9
G ² -1	98.3	97.7	97.9	97.6		99.4	99.5
2	85.0	84.3	80.7	84.1		75.3	75.2
3	77.5	77.9	87.8	(77.6)		78.5	78.5
4	(71.6)	(71.3)	70.5	71.1		71.5	72.1
5	(77.5)	77.9	(78.3)	(77.8)		77.9	77.8
6	63.1	62.5	(62.3)	62.3		62.5	62.9
G ³ -1	106.1	106.5	(104.5)	106.2			
G ⁴ -1	106.6		104.5				

ST : Stevioside R-A : Rebaudioside-A STB : Steviolbioside
Sol : Steviol Sol-M : Steviolmonoside and Rubs : Rubsioside
() : Assigned tentatively.

Fig. 4 Chemical Structure of Purified Glycosylated Stevioside (ST-1).

19 位にエステル型グリコシド結合しているグルコース残基 G¹-1 シグナルは、95.6 ppm、C-13 位ソホロース部の G²-1 シグナルは、97.7 ppm、G³-1 シグナルは、106.5 ppm である。レバウディオサイド-A の G¹-1 シ

グナルは, 95.6 ppm, G²-1 シグナルは, 97.9 ppm, G³-1 および β -1,3-グルコシル結合部の G⁴-1 シグナルは, 104.5 ppm である。これらの各 G-1 シグナルに対して, ST-1 に見られるそれぞれのシグナルは, G¹-1 が 96.4 ppm, G²-1 が 98.3 ppm, G³-1 が 106.1 ppm, G⁴-1 が 106.6 ppm であると判定された。一般に, グリコシド結合によるグルコースのアノマー炭素のシグナルは, α 結合よりも β 結合のほうが約 4 ppm 低磁場にシフトする³⁴⁾。よって, ステビオサイドに導入された新たなグルコースは, β -グリコシド結合であると解釈できる。一方, ステビオールモノサイドとステビオールビオサイドの ¹³C-NMR スペクトルを比較すると, G²-2 シグナルは, ステビオールモノサイドの 75.3 ppm からステビオールビオサイドの 84.1 ppm へと 8.8 ppm 低磁場側にシフトしている。ステビオサイドとレバウディオサイド-A を比較すると, G²-3 シグナルは, ステビオサイドの 77.9 ppm から 87.8 ppm へと 9.9 ppm 低磁場側にシフトしている。ST-1 では, G³-3 に新規の β -1,3-グリコシド結合を受けているから, G²-3 シグナルが 77.5 ppm で, G³-3 シグナルが 87.9 ppm にシフトしている。また, β -1,3-グルカナーゼによる糖転移ステビオサイドが, French-Wild 解析³³⁾によって, 糖鎖延長のシリーズになっていたことから, 本酵素による糖転移は, ステビオサイドの C-13 ソホロース部の末端グルコースに選択的になされて糖鎖延長しているものと考えられる。

要 約

1. *F. dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5 の生産する β -1,3-グルカナーゼの糖転移反応によってステビオサイドへの糖転移を行った。

2. 糖転移生成物の一つ (ST-1) を単離, 精製し, 化学的加水分解, メチル化糖のガスクロマトグラフィー, ¹³C-NMR による化学構造解析を行った。ST-1 はステビオサイドの C-13 ソホロース部の末端グルコース残基に1個のグルコース残基が β -1,3-グリコシド結合した新規なモノグリコシルステビオサイドであった。

3. 本酵素による糖転移は, ステビオサイドの C-13 ソホロース部の末端グルコースに選択的に β -1,3-型で糖鎖延長しているものと考えられた。すなわち, 本酵素は選択的かつ直鎖状にグルコース鎖を伸ばすものであり, 特異的な糖転移作用を示すものである。

文 献

- 1) H. B. WOOD, R. ALLERTON, H. W. DIEHL and H. G. FLETCHER : *J. Org. Chem.*, **20**, 875 (1955)
- 2) E. MOSETTIG and W. R. NESS : *J. Org. Chem.*,

- 20, 884 (1955)
- 3) E. VIS and H. G. FLETCHER : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4709 (1956)
- 4) 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治 : 薬学雑誌, **95**, 1507 (1975)
- 5) K. YAMASAKI, H. KOHDA, T. KOBAYASHI, R. KASAI and O. TANAKA : *Tetrahedron Lett.*, **13**, 1005 (1976)
- 6) H. KOHDA, R. KASAI, K. YAMASAKI, K. MURAKAMI and O. TANAKA : *Phytochem.*, **15**, 981 (1976)
- 7) I. SAKAMOTO, K. YAMASAKI, and O. TANAKA : *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 844 (1977)
- 8) I. SAKAMOTO, K. YAMASAKI and O. TANAKA : *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3437 (1977)
- 9) M. KOBAYASHI, S. HORIKAWA, I. H. DEGRANDI, J. UENO and H. MITSUHASHI : *Phytochem.*, **16**, 1405 (1977)
- 10) 前田安彦 : *New Food Industry*, **18**, No. 5, 19 (1976)
- 11) 阿部公昭, 園部 勝 : *New Food Industry*, **19**, No. 1, 67 (1977)
- 12) 藤田英雄, 枝広知新 : 食品工業, **22**, No. 20, 66 (1979)
- 13) Y. HASHIMOTO and M. MORIYASU : *J. Chromatog.*, **161**, 403 (1978)
- 14) Y. HASHIMOTO and M. MORIYASU : *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 209 (1978)
- 15) 石間紀男, 片山 修 : 食総研報告, **31**, 80 (1976)
- 16) 吉積智司, 伊藤 汎, 国分哲郎 : 甘味の系譜とその科学 p. 265, 光琳 (1986)
- 17) C. A. M. HOUGH, K. J. PARKER and A. J. VLIETOS : *Developments in Sweeteners-1*, p. 139 Applied Science Publishers, London (1979)
- 18) S. KITAHATA, and S. OKADA : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2185 (1975)
- 19) 笠井良次, 金田 宣, 田中 治, 山崎和男, 坂本征則, 森本一義, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 古川秀子 : 日化誌 (生理活性物質特集号), p. 726 (1981)
- 20) K. MIZUTANI, T. MIYATA, R. KASAI, O. TANAKA, S. OGAWA and S. DOI : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 395 (1989)
- 21) 枝広知新, 山本晋平 : 醸協, **86**, (3) 215 (1991)
- 22) 枝広知新, 山本晋平 : 醸協, **86**, (11) 869 (1991)
- 23) 枝広知新, 山本晋平 : 醸協, **87**, (1) 62 (1992)
- 24) 枝広知新, 山本晋平 : 醸協, **87**, (2) 139 (1992)
- 25) N. KANEDA, R. KASAI, K. YAMASAKI, and O. TANAKA : *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2466 (1977)
- 26) S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI : *J. Ferment. Technol.*, **50**, 117 (1972)
- 27) S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI : *J. Ferment. Technol.*, **50**, 127 (1972)
- 28) H. MORI, S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 611 (1977)
- 29) S. NAGASAKI, H. MORI and S. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2689 (1981)

- 30) S. YAMAMOTO, M. MIYAGI and S. NAGASAKI : 150 (1968)
Carbohydr. Res., **114**, 1 (1983)
 - 31) S. HAKOMORI : *J. Biochem.*, **55**, 205 (1964)
 - 32) A. MISAKI, J. JOHNSON, Jr. S. KIRKWOOD, J. V. SCALETTI and F. SMITH : *Carbohydr. Res.*, **6**, 150 (1968)
 - 33) D. FRENCH and G. M. WILD : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612 (1953)
 - 34) 藤原鎮男, 竹内敬人, 石塚英弘 : C-13 NMR 基礎と応用, p. 243, 講談社 (1976)
-