[農化 第 40 卷, 第 11 号, p. 401~405, 1966]

澱粉酵素糖化ハイドロールの糖組成について (第 2 報)

酵素剤による逆合成糖類の検討

渡辺敏幸, 川村杉生, 菅原敬子, 松田和雄

(東北大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 5 月 4 日 受 理

On the Sugar Composition of Hydrol from the Enzymatic Hydrolyzate of Starch

Part II. Reversion Product from D-Glucose by Crude Glucoamylase

By Toshiyuki WATANABE, Sugio KAWAMURA, Keiko SUGAWARA
and Kazuo MATSUDA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Sendai*

Product of reverse action of glucoamylase was prepared by incubating 40% D-glucose solution with 0.5% of crude glucoamylase at 55°C for 72~96 hrs, followed by inactivating the enzyme at 75°C for 10 min. By paper chromatography and paper ionophoresis, nigerose, maltose, isomaltose, laminaribiose, gentiobiose, panose, isopanose and isomaltotriose were detected in the reaction product. Reversion product from 650g of D-glucose was fractionated by a Carbon-Celite column using water and 25~15% ethanol as successive elution solvents. Further separation of sugar was carried out by thick paper chromatography and also by Magnesol-Celite column chromatography of the acetylated sugars. In this way, isomaltose, nigerose, maltose, gentiobiose and laminaribiose were identified as their crystalline octaacetates. Panose was identified as crystalline panitol dodecaacetate.

These results suggest that the glucobioses and glucotrioses in the hydrol were produced from D-glucose by the reverse action of crude enzyme. The enzyme used in this experiment showed no transglucosylase activity.

(Received May 4, 1966)

著者らは先に澱粉酵素糖化ハイドロールの分析, 糖のペーパークロマトグラフィー (PPC), 各糖の分離定量, 活性炭カラムクロマトグラフィー (Carbon CC) による糖類の分別, グルコ二糖類区分のマグネソール-セライトカラムクロマトグラフィー (Magnesol-Celite CC) による分別を行なった. その結果, ハイドロール中の糖類としてフルクトース, グルコース, ニゲロース, マルトース, イソマルトース, ラミナリビオース, ゲンチオビオース, マルトトリオース, パノース, イソパノース, イソマルトトリオースを認め, それらのうち, ニゲロース,

マルトース, イソマルトース, ラミナリビオースおよびゲンチオビオースをアセチル化物として, パノースをパニトールのアセチル化物としてそれぞれ結晶状に分離確認したことを報告した⁽¹⁾.

今回これらの糖類が酵素剤による逆合成の結果生成することを認めたので報告する.

実 験 の 部

1. 酵素力価の検定⁽²⁾

1% 可溶性澱粉 (和光純薬工業株式会社製) 溶液 5 ml, 1/10M pH 5.0 の酢酸-酢酸ソーダ緩衝液 4 ml の混合物

をあらかじめ 40° にし, 1ml の酵素液を加えて 40°, 30 分反応後, 反応液中のグルコース量をベルトラン-逸見法で定量し, グルコース 1mg を生成する時の酵素力を 1 単位とした. 生成グルコース量が 25 mg 近くまではほぼ直線になるので, 生成グルコース量が 25 mg 以下になるように酵素原液 (グルクザイム 1% 溶液) を適当にうすめ測定した結果, 実験に用いた粗酵素 (グルクザイム, 天野製薬株式会社製) の力価は 12,940 単位/g 酵素であった.

なおこの粗酵素には, 後で詳しく述べるが, トランスグルコシラーゼの作用を認めなかった.

2. 酵素剤による逆合成糖の検計

40% グルコース溶液 (グルコース 100g を蒸留水に溶解して 250ml とする. グルコースは小宗化学薬品株式会社製特級品, PPC ではグルコース以外のスポットは認められなかった) をつくり, pH 5.0 に調節し, 基質に対し 0.5% の糖化酵素 (グルクザイム) を加え, 55° で 72 時間反応後, 75°, 10 分加熱して酵素を不活性化させ, 約 10 倍に水で希釈して PPC でしらべた. その結果, グルコースのほかにもマルトース区分, イソマルトース区分およびパノース区分にスポットが認められた.

そこでこれらの逆合成糖類をペーパークロマトグラムから切り取り, ソモギー新法で分離定量を行ないグルコースとして算出した結果は, 第 1 表に示すとおりである.

第 1 表 酵素剤による逆合成糖類の分離定量

グルコース	96.82%
ニゲロース (ラミナリビオース)	1.38%
マルトース	
イソマルトース (ゲンチオビオース)	1.24%
マルトリオース	0.56%
パノース	
イソマルトリオース	

分離定量の結果, 約 3.2% の逆合成糖類が生成することがわかった.

3. 逆合成糖類の Carbon CC による分別

酵素剤による逆合成糖類をさらに詳細に検討するために Carbon CC による分別を行なった.

逆合成糖類の Carbon CC による分別は 3 回に分けて行ない, 第 1 回はグルコース 100g, 72 時間反応, 第 2 回はグルコース 300g, 96 時間反応, 第 3 回はグルコース 250g, 96 時間反応後分別した. 活性炭の量は第 1 回 (カラム I) 500g, 第 2 回 (カラム II) 800g, 第 3 回 (カ

ラム III) 800g で行なった. そのうち第 3 回目の分別について述べる.

グルコース 250g を三角フラスコにとり, 蒸留水を加えて 40% グルコース溶液をつくり, 基質に対し 0.5% の糖化酵素 (グルクザイム) を加え, 55° で 96 時間反応後, 75°, 10 分加熱して酵素を不活性化させた後, 反応液を糖濃度が約 10% になるように蒸留水で希釈し, pH 6.2 に調節した.

55×12.5 cm のガラス円筒に活性炭 (武田白鷺印精製品) 800g と同量のセライト (No. 545) を混合して充填し, 上部からグルコースからの酵素剤による逆合成糖類を注加し, 常法に従い, 水 (201), 2.5% (101), 5% (261), 10% (161), 15% (141) エタノールで溶出を行なった. 溶出液は 21 ずつ分取し, 減圧下に約 10ml に濃縮し, PPC で糖組成をしらべた結果は第 2 表に示すとおりである.

第 2 表 酵素剤による逆合成糖類の Carbon CC による分別

フラクション No.	溶出量 (1)	溶出剤	糖 組 成	収量* (g)
1~2	4	水		—
3~10	16	"	グルコース	239.9
11~15	10	2.5% エタノール	グルコース	0.3
16~17	4	5% エタノール	グルコース	0.1
18~22	10	"	イソマルトース	2.1
23~25	6	"	マルトース, イソマルトース	1.5
26~28	6	"	マルトース, ニゲロース	1.5
29~30	4	10% エタノール	マルトース, ニゲロース	
31	2	"	マルトース, ニゲロース	0.2
32	2	"	マルトース, ゲンチオビオース	0.1
33	2	"	マルトース, ゲンチオビオース	
34	2	"	イソマルトリオース	
35	2	"	ラミナリビオース, イソマルトリオース	0.06
36	2	"	ラミナリビオース	0.1
37~38	4	15% エタノール	ラミナリビオース, パノース	0.15
39	2	"	パノース	0.1
40~41	4	"	パノース	0.05
42~43	4	"		—

* 収量は各フラクションを減圧濃縮したものを熱メタノールに溶解し, 不溶物を除き再び濃縮乾固して秤量した.

以上の結果, 酵素剤による逆合成糖類としてニゲロース, マルトース, イソマルトース, ラミナリビオース, ゲンチオビオース, パノース, イソマルトリオースな

ど、ハイドロール中に存在する糖類が認められた。

4. イソマルトースの分離

Carbon CC で分別したカラム III のイソマルトース区分 No. 18~22, 5% エタノール溶出区分) を減圧下に濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、濾液を減圧下に濃縮して真空デシケーターで乾燥し白色粉末を得た。収量 2.1g

白色粉末 2.1g に無水酢酸ソーダ 1.3g, 無水酢酸 10.5ml を加え、常法に従ってアセチル化を行ない、シラップ状のアセチル化物 3.7g を得た。これに熱無水エタノールを加えて放置すると結晶が得られた。収量 1.66g, エタノールから 1 回再結すると m. p. 144°, β -イソマルトースオクタアセテートの純品 (m. p. 144°) と混融しても融点降下を示さなかった。

5. ニゲロースおよびマルトースの分離

Carbon CC で分別したカラム III のニゲロースおよびマルトース区分 (No. 26~30, 5~10% エタノール溶出区分) を集めて減圧下に濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、濾液を減圧下に濃縮して真空デシケーターで乾燥し白色の粉末を得た。収量 1.5g。白色粉末 1.5g に無水酢酸ソーダ 0.9g, 無水酢酸 7.5ml を加え、常法に従ってアセチル化を行ない、シラップ状のアセテート 2.8g が得られ、これを熱メタノールに溶解し放置すると結晶が得られた。収量 1.48g。エタノールから 1 回再結すると m. p. 159°, β -マルトースオクタアセテートの純品 (m. p. 159°) と混融しても融点降下を示さなかった。

β -マルトースオクタアセテートの結晶を濾別した母液を減圧濃縮してシラップ 0.9g を得た。これを約倍量の熱無水エタノールに溶解して放置したが結晶を生じなかったので Magnesol-Celite CC による分別を行なった。

アセテート 0.9g を 10ml のベンゼンに溶解し、30×4cm のマグネソール-セライト (5:1) のカラムに注加し、1,200ml のベンゼン: 第 3 級ブタノール (100:1) で展開を行なった。展開終了後カラムを管から押出し、アルカリ性 KMnO_4 溶液で呈色すると 2 つの帯が現われた。

上の帯 (上部から 1.0~7.8cm) をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.3g のシラップ状物質が得られ、熱無水エタノールを加えて放置すると結晶が析出した。収量 51mg。エタノールから 2 回再結すると m. p. 149°, β -ニゲロースオクタアセテートの純品 (m. p. 151°) と混融

しても融点降下を示さなかった。

下の帯 (上部から 18.8~26.5cm) をアセトンで溶出し、溶剤を除くと 0.3g のシラップ状物質が得られ、熱無水エタノールを加えて放置すると結晶が得られた。収量 45mg。m. p. 159°, β -マルトースオクタアセテートの純品と混融しても融点降下を示さなかった。

6. ゲンチオビオースの分離

Carbon CC で分別したゲンチオビオース区分 (マルトース, イソマルトトリオースなどを含む, カラム I No. 28~30, カラム II No. 30~33, カラム III No. 31~33, 10% エタノール溶出区分) を集めて減圧下に濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、減圧下に濃縮して真空デシケーターで乾燥し白色粉末を得た。収量カラム I 0.2g, カラム II 0.2g, カラム III 0.3g。

白色粉末 0.7g に無水酢酸ソーダ 0.4g, 無水酢酸 3.5ml を加え、常法に従ってアセチル化を行ない、シラップ状のアセテート 1.0g を得、これを用いて Magnesol-Celite CC による分別を行なった。

アセテート 1.0g を 10ml のベンゼンに溶解し 30×4cm のマグネソール-セライト (5:1) のカラムに注加し、1,200ml のベンゼン: 第 3 級ブタノール (100:1) で展開を行なった。展開終了後カラムを管から押出し、アルカリ性 KMnO_4 で呈色すると 2 つの帯が現われた。

上の帯 (上部から 1.0~5.5cm) をアセトンで溶出し、溶剤を除くと 0.3g のシラップ状物質が得られ、熱無水エタノールを加えて放置すると結晶が析出した。収量 22mg。エタノールから 1 回再結すると m. p. 190°, β -ゲンチオビオースオクタアセテートの純品と混融しても融点降下を示さなかった。

中央部の帯 (上部から 7.3~15.1cm) をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.3g のシラップ状物質が得られ、熱無水エタノールを加えて放置すると結晶が得られた。収量 154mg, エタノールから 1 回再結すると m. p. 159°, β -マルトースオクタアセテートの純品と混融して融点降下を示さなかった。

7. ラミナリビオースの分離

Carbon CC で分別したカラム III のラミナリビオース区分 (No. 36, 10% エタノール溶出区分) を減圧下に濃縮して得たシラップを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、濾液を減圧下に濃縮して真空デシケーターで乾燥し白色粉末を得た。収量 0.1g。

粉末 0.1g に無水酢酸ソーダ 0.06g, 無水酢酸 0.5 ml を加え, 常法に従ってアセチル化を行ない, シラップ状のアセチル化物 0.1g を得た. これに少量の熱エタノールを加え活性炭で処理し濾過, 放置すると結晶が得られた. 収量 7mg, m. p. 157°, β -ラミナリビオースオクタセテートの純品と混融しても融点降下を示さなかった.

8. パノースの分離

Carbon CC で分別したパノース区分 (カラム I No. 33~36, カラム III No. 37~38, 15% エタノール溶出区分, 少量のラミナリビオースを含む) を集めて減圧濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶解して不溶物を除き, 減圧下に濃縮して真空デシケーターで乾燥し, 白色粉末を得た. 収量 0.3g. この白色粉末を少量の水に溶解し, 厚手濾紙 (東洋濾紙 No. 514) にスポットし, ピリジン-ブタノール-水 (4:6:3) で上昇法 3 回多重展開し, パノース区分を濾紙から切り取り水溶出, 減圧濃縮し真空デシケーターで乾燥して白色粉末 0.2g を得た.

白色粉末 0.2g に 0.2% NaBH_4 溶液 100ml を加え, 室温で 1 晩放置して還元後, 氷酢酸で微酸性とし, 過剰の NaBH_4 を分解後 Amberlite IR-120 でカチオンを除去し, 減圧濃縮しシラップとしたものにメタノールを加えて減圧濃縮することを数回繰返し, パニトールを得た. 収量 0.2g.

パニトール 0.2g に無水酢酸ソーダ 0.1g, 無水酢酸 1.0ml を加え, 常法に従ってアセチル化を行ない, パニトールアセテートの結晶を得た. 収量 56mg, エタノールから 2 回再結して m. p. 148°, パニトールアセテートの純品と混融して融点降下を示さなかった.

9. パノース区分のペーパーアイオノフォoresis (PI)

Carbon CC で分別したカラム III のパノース区分 (No. 39~41) を東洋濾紙 No. 51 にスポットし, 硼酸緩衝液を用いる PI でしらべた結果, パノースの他にイソパノース (M_g 0.58) を認めた.

10. 酵素剤によるマルトースからの転移反応の検討

グルコースを基質とし粗酵素の逆合成反応生成物として各種のグルコ二, 三糖類を分離確認したが, ハイドロール中に認められたこれらの糖類は逆合成以外にマルトースからトランスグルコシラーゼ作用により生成する可能性も考えられる.

そこでマルトースを基質としてグルコースからの逆合

成反応の場合と同様の条件で粗酵素 (グルクザイム) を作用させ, 反応生成物を PPC および PI によりしらべた.

マルトース 1g を蒸留水 2.0ml にとかし, 55° 恒温槽に 5 分間保ち温度平衡に達した後, 1% 酵素液を 0.5 ml 加え, 反応を行なった.

反応液は 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間ごとに 0.1ml ずつ採取し, 80° 5 分間加熱し反応を停止させ, PPC および PI でしらべた.

反応生成物は未反応のマルトースと分解してできたグルコースのみで, 転移生成糖は認められなかった.

従って実験に用いた粗酵素剤は前記の条件ではトランスグルコシラーゼ作用は認められなかった.

考 察

酵素剤によるグルコースからの逆合成糖類については福本⁽³⁾が 40% グルコース溶液に *Rhizopus delemar* の結晶糖化型アミラーゼを作用させた反応液を PPC でしらべ, イソマルトースを主体とする α -グルコシド結合のオリゴ糖を生成することを認めている. 黒岩, 中村⁽⁴⁾は, 市販糖化酵素グルコチーム A がグルコースを二糖類およびオリゴ糖に逆合成する能力のあることを PPC による定性および定量の結果, 認めている. 田村ら⁽⁵⁾は, 現在市販されている *Rhizopus niveus* 菌から抽出分離した糖化酵素剤を用いて, その最適使用条件を検討し, 酵素剤によるグルコースからイソマルトースへの逆合成作用のあることを見出し, その反応は基質濃度に比例して増加することを認めている.

今回著者らが用いた酵素剤は粗酵素であるが, イソマルトース以外にニゲロース, マルトースおよび β -結合のラミナリビオース, ゲンチオビオースが認められたが, コージビオース, ソホロースなど 1,2-結合の糖類および 1,4- β 結合のセロビオースは認められなかった. 今後は酵素剤を精製してさらに検討したいと思っている.

また逆合成糖類のうちマルトース区分とイソマルトース区分を比較してみると酸糖化の場合には逆合成糖類としてイソマルトース区分がかなり多くなっているが, 酵素剤による逆合成糖類としてはマルトース区分の方がやや多くなっている.

なお用いた粗酵素剤ではマルトースからの転移反応は認められなかった.

要 約

40% グルコース溶液に酵素剤を作用させ, 逆合成糖類

としてニゲロース, マルトース, イソマルトース, ラミナリビオース, ゲンチオビオース, パノース, イソパノース, イソマルトトリオースを認め, それらのうち, ニゲロース, マルトース, イソマルトース, ラミナリビオース, ゲンチオビオースをアセチル化物として, パノースをパニトールのアセチル化物としてそれぞれ結晶状に分離確認した.

以上の結果から, 澱粉酵素糖化ハイドロール中のグルコ二, 三糖類は酵素剤による逆合成の結果生成されることを認めた. なお酵素剤によるマルトースからの転移反応は認められなかった.

終りに酵素剤を提供していただいた共和糖化工業株式会社および御助言をいただいた理化学研究所渡部一穂氏に深謝します.

なおこの報告の要約は昭和 41 年 4 月 4 日, 日本農芸化学会大会で発表した.

-
- (1) 渡辺敏幸, 川村杉生, 松田和雄: 本誌, **40**, 306 (1966).
 - (2) 渡部一穂, 富金原 孝: 理研報告, **40**, 327 (1964).
 - (3) 福本寿一郎: 澱粉糖技術研究会報, No. 24, 133 (1961).
 - (4) 黒岩城雄, 中村亦夫: 工化, **64**, 942 (1961).
 - (5) 田村太郎, 柴田茂久, 川瀬延也, 佐伯文夫, 鈴木繁男: 澱粉糖技術研究会報, No. 24, 45 (1961).