Penicillium oxalicum フラクトース
転移酵素によるシュクロースから
生成する 1-kestose の同定

伊東禧男*・志村 進*・安田英之*
市東武男*・山野利幸*

Isolation and Identification of 1-Kestose
Produced from Sucrose by Fructose-Trans-
ferring Enzyme of *Penicillium oxalicum*

Yoshio ITOH*, Susumu SHIMURA*,
Hideyuki YASUDA*, Takeo SHITOH* and
Toshiyuki YAMANO*

* Central Laboratory, Lotte Co., Ltd.,
Numakage, Urawa-shi, Saitama, 336

One of the oligosaccharides produced from sucrose by fructose-transferring enzyme from *Penicillium oxalicum* was identified. This oligosaccharide was isolated by column chromatographies on charcoal-celite (1:1) and Sephadex G-15. The saccharide was identified as 1-kestose by acid hydrolysis, enzyme hydrolysis, gas-liquid chromatography of partially methylated derivatives, mass spectrometry of trimethylsilylated derivative, and ^{13}C -NMR spectroscopy. (Received Jan. 24, 1986)

シュクロースを基質として微生物酵素により生成するオリゴ糖については多くの報告がある^{1)~8)}。カビの酵素では、*Aspergillus oryzae*⁴⁾ や、*Aureobasidium pullulans* のフラクトーストランスフェラーゼ⁵⁾ による 1-kestose、ニストース等の生成が知られている。

著者らは既に *Penicillium oxalicum* の粗酵素によるシュクロースからの数種のオリゴ糖生成とその培養条件について報告した⁶⁾。そして生成糖の 1 つが三糖類のネオケストースであることを報告した⁷⁾。今回、他の生成糖の 1 つが同じ三糖類の 1-kestose であることを同定したのでその結果を報告する。

1. 実験方法

(1) 試薬及び糖の標準：試薬類は市販の最純品のもの

を使用した。1-kestose はタマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎より塩見⁹⁾ の方法により単離し、標準品として使用した。

(2) オリゴ糖の生成：*P. oxalicum* の培養液⁷⁾ より得たアセトン沈殿酵素を用い、その溶液とシュクロース溶液とを混合した。これを一定条件で反応させた後、熱処理 (100°C, 10 min) により反応を停止させ、ついで遠心分離、上清を Amberlite IR-120 B, IRA-45 により処理した。これを減圧濃縮し、試料とした。

(3) オリゴ糖の単離：試料溶液 (固型分として 25 g 含有) を活性炭セライト (1:1) カラム (φ 3.6×90 cm) に吸着させ、脱イオン水 8 l で単糖を溶出後、5% エタノール溶液 3 l, 10% エタノール溶液 3.9 l で順次溶出した。流速は 4.7 ml/min とし、溶出液は 250 ml ずつ採取し、溶出した糖はフェノール硫酸法⁹⁾ 及び薄層クロマトグラフィーにより検出した。この活性炭セライトカラムクロマトグラフィーによる精製品を 40°C で減圧濃縮し、さらに Sephadex G-15 カラム (φ 3.6×120 cm) によるクロマトグラフィーにより精製した。試料の添加量は 20 ml (固型分として 0.5 g) とし、脱イオン水で溶出した。流速は 0.8 ml/min で行った。

(4) 定性及び定量分析：ジフェニルアミンテストは IHL の方法¹⁰⁾、フェーリングテストは FEHLING の方法¹¹⁾ に従った。糖の定量はフェノール硫酸法、還元糖の定量は SOMOGYI-NELSON 法^{12) 13)} に従った。グルコースは市販の Glucostat reagent (Worthington Biochemical Corp.) を用いて酵素法により測定した。フラクトース/グルコースの比はオキシム化後トリメチルシリル (TMS) 化¹⁴⁾、ガスクロマトグラフィー (GC) により分析した。GC 分析は Hitachi 073 (FID 検出器付)、カラムには 3% Silicone SE-30/Chromosorb W を充填したガラス製カラムを用いた。操作条件はキャリアガス (N₂) 40 ml/min, 注入口温度 300°C, カラム温度 170~250°C (5°C/min) で行った。

(5) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)：Shimadzu LC-5 A (Erma Optical Works LTD., ERC-7510 示差屈折計) を用いた。カラムにはスクレオシル 5 NH₂ (φ 4.6×20 cm) を用い、移動相にアセトニトル-水 (70:30, v/v) を使用し、1 ml/min の流速で行った。

(6) 薄層クロマトグラフィー (TLC)：TLC プレートは Merk 社製 Silica gel 60 を用い、溶媒にて展開し、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬¹⁵⁾ により発色させた。なお展開溶媒としてはつぎの組成のものを使用し

* (株) ロッテ中央研究所 (〒 336 埼玉県浦和市沼影 3-1-1)

た. I) n-ブタノール: メタノール: 水 (5:4:1), II) アセトニトリル: 水 (82:18)

(7) メチル化分析: 箱守の方法¹⁶⁾に従い, オリゴ糖を完全メチル化した. これを3% 塩酸メタノールで100°C, 30分間処理しメタノリシスを行い, 部分メチル化糖を得, Amberlite IR-120 B, IRA-400 により塩酸を除去後 GC 分析を行った. GC 分析は Shimadzu 4 CM (FID 検出器付), カラムには15% Butane-1,4-diol succinate polyester/chromosorb W AW DMCS を充填したガラス製カラム ($\phi 0.3 \times 100$ cm) を用いた. 操作条件はキャリアガス (N_2) 40 ml/min, 注入温度 250°C, カラム温度 170°C で行った.

(8) 加水分解: オリゴ糖 10 mg を 0.1 N 塩酸 1 ml に溶解し, 100°C で1時間加熱した. またメチル化した糖はその 10 mg を 1 N 硫酸 1 ml に懸濁させて, 100°C で8時間加熱した.

(9) 酵素分解: 1% オリゴ糖溶液 0.5 ml と McILVAIN 緩衝液 (pH 4.5) 0.2 ml, パン酵母 β -フラクトフラノシダーゼ (Sigma VII) 溶液 0.3 ml (100 Unit) とを混合し, 30°C で反応させた. 80分間反応後100°C で10分間加熱し, 反応を停止させた.

(10) オリゴ糖の TMS 誘導体の GC-MS 分析: TMS 誘導体は常法¹⁴⁾により調製した. GC-MS 分析は GC 部に Hewlett Packard 5790 を使い, カラムには Diasolid ZT を充填したガラス製カラム ($\phi 0.3 \times 30$ cm) を用いた. 操作条件はキャリアガス (He) 30 ml/min, カラム温度は100~360°C (10°C/min) で行った. MS は Hitachi M-80A を使用し, イオン化電圧 70 eV, イオン源温度 170°C, EI 法で行った.

(11) オリゴ糖の ^{13}C -NMR 分析: ^{13}C -NMR スペクトルは JEOL JNM-FX 90 Q で測定した. 測定条件は D_2O 中, 外部標準としてテトラメチルシランを用い, プロトン完全デカップリングで測定した.

2. 結果及び考察

試料溶液の HPLC のクロマトグラムを Fig. 1 に示す. Peak 1~3 はそれぞれフラクトース, グルコース, シュクロースである. Peak 4 (saccharide A), Peak 5 (saccharide B), Peak 6 及び 7 (saccharide C 及び D) は供試菌の酵素によって生成したオリゴ糖である. Saccharide A はネオケストースであることを同定した⁷⁾. HPLC の保持時間 (Rt) より, saccharide B は三糖類, saccharide C 及び D は四糖類と推定された. これらの糖の含量は, HPLC のピーク面積より, フラクトー

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of sample solution

1: Fructose, 2: Glucose, 3: Saccharide A (neokestose), 5: Saccharide B, 6: Saccharide C, 7: Saccharide D

Fig. 2 Carbon-celite column chromatogram of sample solution

1: Sucrose, 2: Saccharide B, 3: Saccharide A, 4: Saccharide C and D. Quantity of each component is indicated by the thickness of line.

ス 23.9%, グルコース 38.6%, シュクロース 7.9%, ネオケストース 11.0%, saccharide B (以下 S-B と略記) 11.1%, saccharide C 1.5%, saccharide D 6.0% であった.

試料溶液の活性炭セライトカラムクロマトグラフィーの結果を Fig. 2 に示す. S-B は5% エタノールによりシュクロースの次に溶出され, 一部は10% エタノール

Table 1 Gas-liquid chromatographic analysis of methanolizates from permethylated saccharides

Saccharide B	Relative retention time ^{a)}						
	0.82	0.98	1.27	1.42	2.57	—	6.96
Sucrose	0.83	0.99	1.29	1.44	—	—	—
1-Kestose	0.82	0.98	1.27	1.43	2.56	—	6.96
Methyl 2, 3, 4, 6-tetra- O-methyl- β -D-glucoside ^{b)}	—	1.00	—	—	—	—	—
Methyl 2, 3, 4, 6-tetra- O-methyl- α -D-glucoside ^{b)}	—	—	—	1.44	—	—	—

a) Retention time of methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl- β -D-glucoside=1.00

b) Reference methylated sugars.

によって溶出された。この画分 No. 37~39 を集め、減圧濃縮後、Sephadex G-15 カラムクロマトグラフィーによりさらに精製した。この様にして固型分 25 g を含む試料溶液より S-B を 1.11 g 得た。

S-B はフェーリングテストが陰性の非還元糖であり、ジフェニルアミンテスト陽性のことからケトースが含まれている。酸加水分解後、酵素法で定量したグルコース量に対し、SOMOGYI-NELSON 法で定量した還元糖量の比は 3.11 であり、また GC のピーク面積より求めたグルコースとフラクトースの量比は 1:2.01 であった。TLC の R_f 値は、0.40 (溶媒 I)、0.56 (溶媒 II) であり、試料溶液の HPLC の結果と合わせ、S-B は三糖類で、グルコース 1 分子、フラクトース 2 分子より成ることが判った。

S-B のメチル化糖のメタノリシスによって生成した部分メチル化糖の GC 分析の結果を Table 1 に示す。S-B からの部分メチル化糖は 6 つのピークを示した。これらは標準のメチル化糖、及びシュクロース、1-kestose からの部分メチル化糖のピークより、それぞれ methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-glucoside (0.98, 1.42), methyl 3, 4, 6-tri-O-methyl-D-fructoside (2.57, 6.96), methyl 1, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-fructoside (0.82, 1.27) に相当した。また S-B はパン酵母 β -フラクトフラノシダーゼにより分解され、グルコースとフラクトースを生成することから、フラクトースは β 型の結合であることが判った。先の実験結果から S-B が三糖類であることと考え合わせ、S-B は 1 β - β -fructofuranosyl sucrose (1-kestose) と推定された。

また S-B の TMS 誘導体の MS は、玉ねぎから単離した 1-kestose の TMS 誘導体の MS と一致し、さらに S-B の ^{13}C -NMR スペクトルも、玉ねぎから単離

した 1-kestose のものと一致した。

以上より S-B は 1-kestose (β -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-Glup) であることが確認され、*P. oxalicum* のフラクトース転移酵素によってシュクロースから生成する三糖類は、ネオケストース²⁾と 1-kestose であることが判った。

3. 要 約

P. oxalicum のフラクトース転移酵素によってシュクロースから生成する生成糖のうち、saccharide B (S-B) の同定を行った。S-B の単離は活性炭セライトカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-15 カラムクロマトグラフィーにより行った。構造解析は酸加水分解、酵素分解、部分メチル化誘導体のガスクロマトグラフィー、トリメチルシリル誘導体のマススペクトル、 ^{13}C -NMR スペクトルにより行った。その結果 S-B は三糖類の 1-kestose であると同定された。

本研究を行うにあたり、御懇篤なる御指導御鞭達を頂いた早稲田大学理工学部宇佐美昭次教授に深く感謝いたします。また ^{13}C -NMR による測定を行って頂いた日本電子(株)、松下和弘氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) AVIGAD, G.: *Biochem. J.*, **73**, 587 (1959).
- 2) CHIBA, S., MURATA, M., MATSUSAKA, K. and SHIMOMURA, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 775 (1979).
- 3) FUJII, S., KISHIHARA, S., KOMOTO, M. and SHIMIZU, J.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **30**, 339 (1983).
- 4) 友田正司・左藤訓子・鈴木陽子: 共立薬科大学研

- 究年報, 20, 1 (1975).
- 5) 日高秀昌: ネオシュガー研究会報告書, 2(1982).
- 6) 志村 進・伊東禎男・日食工誌, 32, 419 (1985).
- 7) YASUDA, H., SHITOH, T., YAMANO, T., ITOH, Y. and SHIMURA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 777 (1986).
- 8) SHIOMI, N.: *J. Facul. Agric. Hokkaido Univ.*, 58, 548 (1978).
- 9) HODGE, J.E. and HOFREITER, B.T.: *Methods in Carbohydrate Chem.* 1, 338 (1962).
- 10) IHL, A.: *Chem. Ztg.*, 2, 451 (1885).
- 11) FEHLING, H.: *Ann.*, 72, 106 (1849).
- 12) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- 13) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, 160, 69 (1945).
- 14) ZURCHER, K., HADORN, H. and STORACK, C.H.: *Mitt. Gebeite Lebensm. Hyg.*, 66, 92 (1975).
- 15) BAILEY, R.M. and BOURNE, E.J.: *J. Chromatogr.*, 4, 206 (1960).
- 16) HAKOMORI, S.: *J. Biochem.*, 55, 205 (1964).
(昭和61年1月24日受理)
-