

糖転移酵素により合成された配糖体連続生産モデル

北 尾 悟

要旨

スクロースホスホリラーゼ (sucrose phosphorylase, SPase) の糖転移反応によって合成されるオリゴ糖や配糖体など各種糖質関連物質を工業化するため、生成比率と生成物の分離効率を高め、連続生産が可能なシステムの可能性を検討した。スクロースを糖供与体、(+)-catechin を受容体にした場合に生成される (+)-catechin-glucoside (CG) を想定して、基質および生産物の増減に関する経時変化を調べ、また、フラクトースなどの副生成物を抑える有機溶媒の検討の結果、アセトンを選択した。さらに、反応液から未反応基質と目的生産物を効率良く分別できる吸着樹脂として HP-1MG を選んだ。そして、平膜限外濃縮装置 (350 ml 容) を用い、反応液 300 ml 規模の連続生産を行なった。反応毎に不足分のスクロースと SPase を新たに添加する方法を採用したところ、CG 生成と回収率はモル比換算で約 65% であった。このことより、連続生産システムモデルを構築することができた。

I. 緒言

これまでスクロースホスホリラーゼ (sucrose phosphorylase, SPase) の糖転移反応を利用して、オリゴ糖や配糖体など各種糖質関連物質合成を報告してきた¹⁻⁶⁾。最近、この SPase が種々のカルボキシル基へグルコース転移する⁷⁾ことが明らかとなり、そのユニークな反応特性が注目されている。これら糖質関連物質は、食品素材をはじめとして化成品や医薬品分野への応用も可能である。これらの生産を実用化するためには、生成比率と生成物の分離効率を高めるシステムの構築が重要となる。また、システム全体の効率を考慮すると、連続生産を念頭に置かねばならない。実際、SPase による配糖体合成では、受容体である各種アグリコンより、糖供与体であるスクロース濃度が高い方が転移効率が良いことが、これまでの検討で判っている。この場合、大部分のスクロースは未反応物として残存するという問題点が残る。そしてスクロースのグルコース部分は糖転移に用いられるが、残り半分のフラクトースは反応液中に蓄積する。また、効率は低い加水分解によるグルコースやフラクトースの生成も認められるなど、改善すべき課題が多い。

そこで、スクロースを糖供与体、(+)-catechin を糖受容体にした場合に生成される (+)-catechin-glucoside (CG) 生産量の向上を目指して、工業生産可能なシステムの検討を始めた。最初に、基質および生産物の消長を正確に把握し、フラクトースなどの副生成物を抑えることを目標として、有機溶媒の選択を行なった。次に、反応液から効率良く再利用可能な未反応基質と目的生産物を分別できる吸着樹脂の検討を行なった。そして、将来、固定化菌体あるいは固定化

酵素技術を利用することを見据えて、連続生産の可能性を検討することとした。

II. 実験材料および方法

1. 酵素・試薬

SPase は、乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* からクローニングした SPase 遺伝子を大量発現する大腸菌 1100 (slp-spl-1) 由来⁸⁾ の精製酵素を用いた。精製は古賀らの方法⁹⁾ に準拠した。

全ての試薬は、特級グレードを用いた。

2. 酵素活性の測定

SPase 活性測定は、基本的に Silverstein らの方法¹⁰⁾ に準じて行った。すなわち、スクロースと無機リンを基質とし酵素反応により生成する α -D-glucose-1-phosphate (G-1-P) 量を、phosphoglucomutase と α -D-glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase の共存下で、nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidized form (NADP⁺) から生じる nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) 量を反映する 340 nm の吸光を測定した。基本的な酵素反応液 (3.3 ml) の組成は、50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 140 mM sucrose, 1 mM EDTA-2Na, 150 mM MgCl₂, 1 mg NADP⁺, 1 μ g glucose-1,6-diphosphate, 100 μ g phosphoglucomutase, 20 units G-6-P dehydrogenase と 20 μ l の酵素液である。25℃の反応温度において 340 nm の吸光度を測定した。1 unit は上記反応条件における 1 分間に 1 μ mol の NADP⁺を減少させ NADPH を生成させる酵素量として定義した。なお、NADPH の 340 nm における吸光係数は、 $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。

3. HPLC 測定条件

糖の分析および定量は、順相系の HPLC を使い、以下の条件で行った。

カラム：TSKgel Amide-80 (250×4.6 mm, i.d.) (TOSOH Co.,Ltd.)

カラム温度：35℃

検出：refractive index

移動相：acetonitrile-water (60:40, v/v)

流速：1.0 ml/min

また、(+)-catechin と CG の分析および定量は、逆相系の HPLC を使い、以下の条件で行った。

カラム：CAPCELLPAK C18 SG120 (250×4.6 mm, i.d.) (Shiseido Co.,Ltd.)

カラム温度：室温

検出：280 nm

移動相：acetonitrile-ethyl acetate-0.05% (v/v) phosphoric acid (12:2:86, v/v/v)

流速：1.0 ml/min

4. 吸着樹脂

Sephadex LH-20 は、ファルマシアから購入した。また、SP-800、HP-20、および、HP-1MG

は、三菱化成工業から購入した。

Ⅲ. 結果および考察

1. 基質および生成物の経時変化

配糖体の連続生産を設定するには、基質の消長を正確に把握し、次のサイクルの基質の添加時期および添加量を決めなければならない。また生産物である CG の消長も確認し、1つのサイクル時間を設定せねばならない。そこで、CG の合成反応における (+)-catechin、CG や各種糖類の経時の変化を HPLC で定量した。この時の反応液は、10 mM の Tris-HCl (pH 7.5) 1 ml に 300 mg の sucrose、6 mg の (+)-catechin、10% (v/v) のメタノール、そして 38 units の SPase を含む組成であった。ここでメタノールを加えた理由は、(+)-catechin の溶解性を高めるためである。

その結果、10 時間で (+)-catechin の 90%以上が消費され、CG へ変換された。また、この時点でスクロースは、約 30%消費され、フラクトース、グルコース、グルコ二糖が生成されていくことが判った (Fig. 1)。これらのことより、1 サイクルを 10 時間とし、次のサイクルでは、(+)-catechin は1回目と同じ量を、また、スクロースは約 30%添加すれば良いことが判明した。

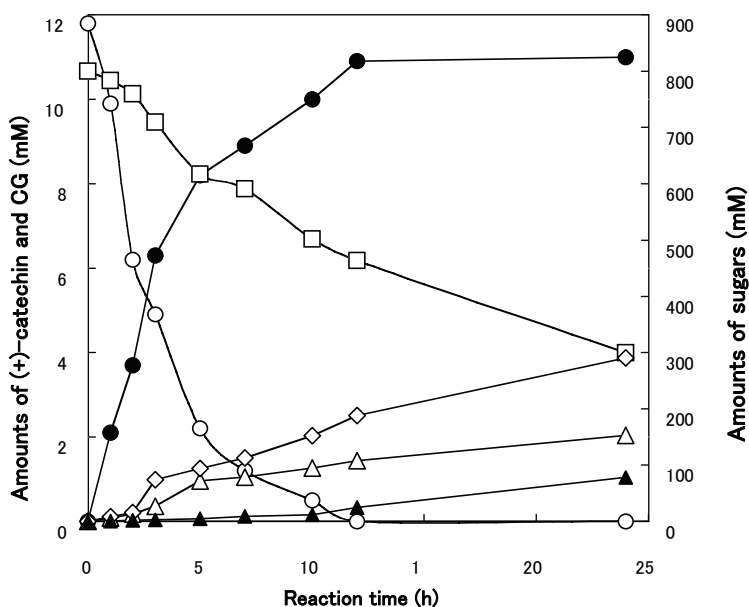


Fig. 1 The course of transglucosylation with SPase on the mixture of sucrose as a donor and (+)-catechin as an acceptor.

Reaction mixture (1 ml) containing 300 mg of sucrose, 6 mg of (+)-catechin, 10% (v/v) methanol, and SPase (30 units) was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 6.9), at 42°C for the indicated time. All substances were measured by HPLC. Symbols used were: ○, (+)-catechin; ●, CG; □, sucrose; △, D-glucose; ◇, D-fructose; ▲, glucobiose.

2. 有機溶媒の検討

前項での経時的变化の検討試験では、メタノールを反応液に用いた。しかし、反応 10 時間後で著量のフラクトース、グルコース、グルコ二糖が生成されていくことが判った。そこで、これら副生成物の生産を抑え、効率良く CG 生産を行なうために、有機溶媒の検討を行なった。

まず、種々の溶媒が最終濃度 10% (v/v) となるような反応液を作製し、10 時間後の CG 生成量を比較した。その結果、プロパノール類、特に 1-プロパノールにおいて CG の生成量が低く酵素を不活性化するようであったが、他の溶媒では、これまで用いたメタノールとほぼ同程度の生成量を示した (Fig. 2)。次に、1-プロパノール以外の溶媒について、同じく最終濃度 10% (v/v)、10 時間反応でのフルクトースとグルコースの生成量をどの程度抑えるかを調べた (Fig. 3)。縦軸にこれら二つの単糖に対するスクロースの比で表し、この数値が大きいほど副生成物の生産を抑制していることを意味している。この結果、メタノールより他の溶媒のほうが副生成物の生産を抑え、特にアセトンを用いた時に一番良い結果を得た。しかし、アセトン濃度が 10% (v/v) の場合には、少し反応時間が長くなると、酵素が失活する傾向があることを別の試験結果で得たため、アセトン濃度は 5% (v/v) に設定して以後の試験を行なうことにした。

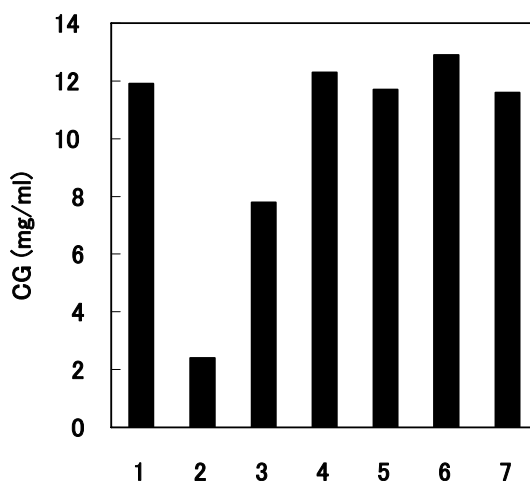


Fig. 2 Effects of various solvents on CG production.

Reaction condition was described in Fig. 1, except for methanol. Solvents used were: 1, methanol; 2, 1-propanol; 3, 2-propanol; 4, DMF; 5, DMSO; 6, ethanol; 7, acetone.

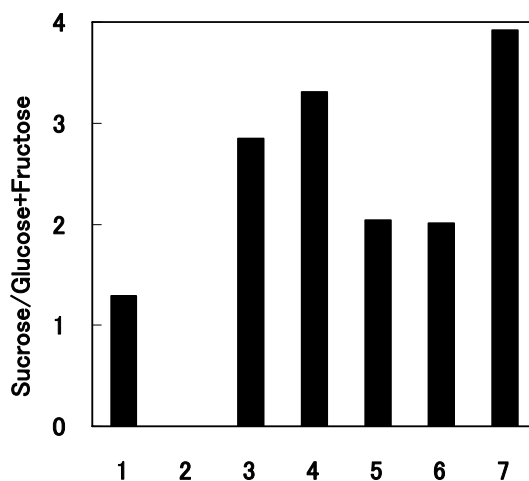


Fig. 3 Effects of various solvents on sugar ratio.

Reaction condition was described in Fig. 1, except for methanol. Solvents used were: 1, methanol; 2, 1-propanol; 3, 2-propanol; 4, DMF; 5, DMSO; 6, ethanol; 7, acetone.

3. 吸着樹脂の検討

効率の良い生産システムを構築するためには、反応終了液から効率良く CG を回収し、再利用可能な未反応基質と分別することが必要である。そこで Table に示した四つの吸着樹脂による CG と (+)-catechin の回収試験を行なった。これらの樹脂は、糖類（スクロース、フラクトース、グルコース、グルコ二糖）を吸着せず、水洗いで溶出させる。

また吸着・溶出条件は、

樹脂容量：2 ml

吸着量：10 mg CG, 10 mg (+)-catechin in 10 ml water

流速：SV=2.5

溶出：5.0% (v/v) ethanol stepwise である。

その結果、Table に示すように、HP-1MG 樹脂が最も分別効率が良く、10% (v/v) エタノール濃度で約 97% の CG が得られることが判った。数% の (+)-catechin が溶出されるが、エタノール濃度を 6~9% (v/v) と細かく設定すれば、完全に CG と (+)-catechin を区別して分画回収できるであろう。また、未反応の (+)-catechin は Table においては 15% (v/v) エタノール濃度までの結果しか示していないが、20% (v/v) 濃度で完全に溶出されることは判っている。これらのことより、HP-1MG 樹脂に酵素反応液を供し、まず水溶出により糖類を洗い流し、次に 6~9% (v/v) エタノール溶液にて目的産物である CG を回収、最後に 20% (v/v) エタノール溶液を用いて未反応の (+)-catechin を得、次の反応に用いるという反応システムを構築することができた。

Table Effects of various adsorbents on CG production

Adsorbent	Recovery (%)		CG		
			(+)–Catechin		
	Ethanol (%)	0	5	10	15
Sepadex LH-20		77	23	0	0
		0	66	34	0
SP-800		13	70	17	0
		34	60	3	3
HP-20		0	18	36	46
		0	37	35	28
HP-1MG		0	72	25	3
		0	0	5	38

4. 連続生産とモデル系の構築

これまでの、基質および生成物の経時変化、有機溶媒や吸着樹脂の検討の結果を踏まえて、300 ml 規模の反応液から CG を分取するための連続生産を検討することにした。この検討により、反応毎に不足するスクロースや SPase の量を把握し、次の反応に添加する量を明らかにすることを目的とした。

反応液は、10 mM の Tris-HCl (pH 7.5) 300 ml に 90 g の sucrose , 2.4 g の (+)-catechin, 5% (v/v) acetone,そして 12,000 units の SPase を含む組成であった。反応装置は、アミコン平膜限外濃縮装置 (350 ml 容) を用い、反応終了液を YM10 膜 (分画分子量 10,000) により酵素のみを装置内に残し、膜を通過した糖類・カテキン類は、吸着樹脂 HP-1MG (3×38 cm) カラムに供した。水洗により糖類画分を別に集め、10% (v/v) のエタノール水溶液で目的産物である CG を得た。また、未反応の (+)-catechin は 20% (v/v) のエタノール水溶液にて回収した。

連続3回反応を行ない、反応毎に Fig. 4 に示したように不足分のスクロースと SPase を、そして、(+)-catechin に関しては、毎回 2.4 g ずつ新たに添加することにした。その結果、各反応において、2.4 g の (+)-catechin より 1.7-1.8 g の CG が、回収された (Fig. 4-A)。転移物の回収率は、モル比換算で約 65%だった。残存するスクロース量は反応毎にばらつきがあったが、Fig. 4-B のように平均して 70-80%であった。また、SPase 活性は、1 回目終了時は約 90%残っていたが、2 回目以降は約 70%となった (Fig. 4-C)。

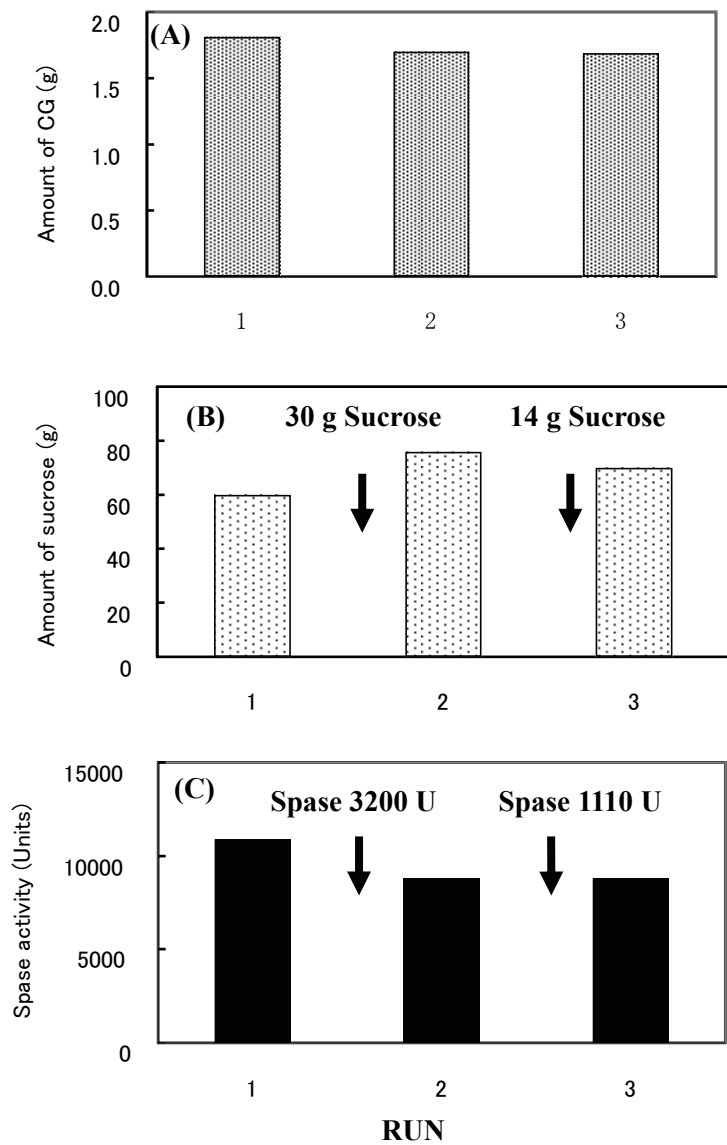


Fig. 4 Continuous production of CG.

Reaction mixture (300 ml) containing 90 g sucrose, 2.4 g (+)-catechin, 5% (v/v) acetone, and SPase (12,000 units) was incubated for 15 h, at pH 7.5 of 10 mM Tris-HCl, at 42°C.

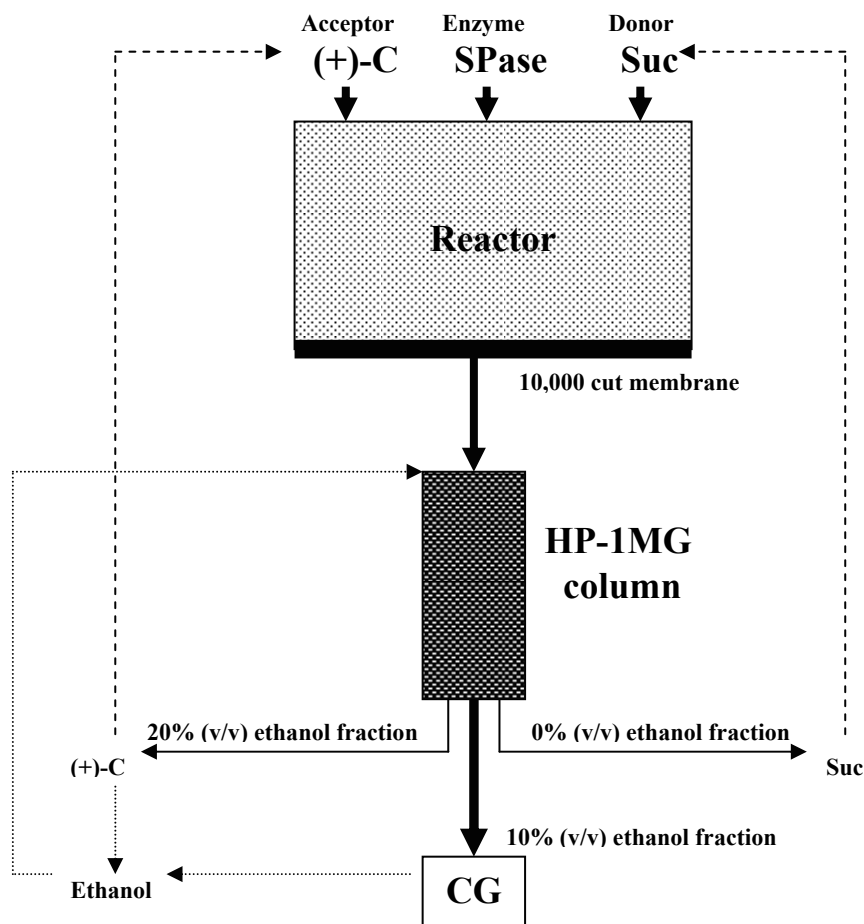


Fig. 5 Proposed model of continuous production of CG.

Abbreviations were as follows: (+)-C; (+)-catechin, CG; (+)-catechin-glucoside, Suc; sucrose, SPase; sucrose phosphorylase.

以上の結果、反応規模の拡大および連続合成により、若干 CG の分離回収効率の低下が見られるが、Fig. 5 に示すような連続生産システムを構築することができた。つまり、反応終了液は、分画分子量 10,000 の限外濾過膜を通過させ、酵素 (SPase) のみ反応槽内に留めた。一方、反応系外に糖類やカテキン類を排出させ、吸着樹脂 HP-1MG カラムに供した。水洗により集めたフラクションは、主にスクロースであるので、糖供与体として再利用した。また、10% (v/v) のエタノールにより集めたフラクションに目的の CG を得た。そして、20% (v/v) のエタノールにより集めたフラクションは、主に未反応の (+)-catechin であり、糖受容体として再利用した。このように、酵素は系内に留め、基質であるスクロースと (+)-catechin を再利用する効率良い生産システムを完成した。副生するスクロース以外の糖類の生成が問題となるが、これらを抑制するためには、溶媒の濃度を高め加水分解させないことも必要と思われる。実際、SPase は水への

受容体特異性があり、スクロースを加水分解しグルコース、フラクトースが生成する。そして、遊離したグルコースが受容体となりグルコ二糖も生成する。加水分解反応を防ぐには反応液の水をいかに少なくするか、つまり、有機溶媒の割合をどれだけ高められるかにかかっている。その点、SPase は有機溶媒に対する耐性が若干弱く、溶媒耐性の酵素が望まれる。また、スクロースを基質に用いているので、反応効率が高まれば、当然、グルコース部分が反応に使われフラクトース部分が残るので、この副生するフラクトースを除去する系の検討も必要であろう。今回、平膜限外濃縮装置を用い、一種のメンブランリアクター、つまり膜固定化酵素に近いシステムであるが、酵素の安定化などの面で、他の単体やシステムを用いた固定化菌体あるいは固定化酵素システムなどの検討が最終的には必要となろう。

今回示した配糖体連続生産システムに応用される糖転移酵素は SPase に限ったものではない。これまでに様々な糖転移酵素が発見され、配糖体合成反応に絞っても多くの報告例がある。SPase 以外の糖転移酵素を用いた反応生成物の生産や回収に今回のシステムが応用可能であると考ええる。

参考文献

- 1) S. Kitao and H. Sekine; Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2011-2014 (1992).
- 2) S. Kitao, T. Ariga, T. Matsudo, and H. Sekine; The syntheses of catechin- glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2010-2015 (1993).
- 3) S. Kitao and H. Sekine; α -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 38-42 (1994).
- 4) S. Kitao and H. Sekine; Syntheses of two kojic acid glucosides with sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 419-420 (1994).
- 5) S. Kitao, T. Matsudo, M. Saitoh, T. Horiuchi, and H. Sekine; Enzymatic syntheses of two stable (-)-epigallocatechin gallate glucosides by sucrose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2167-2169 (1995).
- 6) S. Kitao, T. Matsudo, T. Sasaki, T. Koga, and M. Kawamura; Enzymatic synthesis of stable, odorless, and powdered furanone glucosides by sucrose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 134-141 (2000).
- 7) K. Sugimoto, K. Nomura, H. Nishiura, K. Ohdan, T. Nishimura, H. Hayashi, and T. Kuriki; Novel transglucosylation reaction of sucrose phosphorylase to carboxylic compounds such as benzoic acid., *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 22-29 (2007).
- 8) S. Kitao and E. Nakano; Cloning of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* and its overexpression using a 'Sleeper' bacteriophage vector., *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 179-184 (1992).
- 9) T. Koga, K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, and M. Kikuchi; Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1805-1810 (1991).
- 10) R. Silverstein, J. Voet, D. Reed, R. H. Abeles; Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1338-1346 (1967).