

アルコール溶液中での糖転移反応による高級アルコール β-キシロシドの酵素合成†

安井 恒 男

Enzymatic Synthesis of High Molecular Alcohol β-Xylosides by
the Transfer Reaction of β-Xylosidase in The Presence of Alcohol

Tsuneo YASUI

Seitoku Junior College of Nutrition

(1-4-6, Nishi-shinkoiwa, Katsushika-ku, Tokyo, 124, Japan)

Among several fungal β-xylosidases, *Aspergillus niger* β-xylosidase had the highest hydrolytic activity and stability in the presence of water miscible solvents such as acetone and alcohols. The enzymatic synthesis of alkyl β-xylosides from xylobiose and alcohols through the transxylosylation reaction of the enzyme was studied. Various alkyl β-xylosides were effectively synthesized from xylobiose and water miscible alcohol such as methanol, ethanol and 2-propanol. Water immiscible alcohol such as 1-butanol, 1-hexanol, benzyl alcohol and 2-butanol, also acted as effective acceptors for transxylosyl reaction, where a great part of synthesized β-xylosides were found in the insoluble alcohol layer. Therefore, the synthesized β-xyloside, such as *l*-hexyl β-xyloside, could be readily separated from the reaction mixture and crystallized.

Xylooligomers and xylan hydrolyzates acted as an effective xylosyl donor. Accumulation factors of alkyl β-xyloside produced enzymatically in the transxylosylation and superiority of *Asp. niger* β-xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl β-xylosides were also described.

I. はじめに

糖質の加水分解酵素も他の加水分解酵素と同様に加水分解反応以外に転移反応・縮合反応を触媒することができる。最近、少糖類の生理活性に興味が持たれるようになり、手法が簡単であることから酵素の転移作用・縮合作用による少糖類の合成が注目されている。

酵素は基質と反応して酵素基質複合体を形成するが、さらに中間体として glycosyl 酵素を経て最終産物が形成されると考えられる。glycosyl 酵素に水が acceptor として作用すれば加水分解反応となり、アルコールや糖が acceptor となる場合、転移反応となる。

われわれはこれまでに多くの起源の β-キシロシダーゼを単一蛋白にまで純化し、その加水分解酵素としての性質を比較検討してきた。その結果、1) 転移作用が少

なく、生成糖のアノマー型が inversion 型のグルコアミラーゼ様の酵素、2) 転移作用が顕著でアノマー型が retention である α-グルコシダーゼ様の酵素の二つのグループが存在すること、また、3) 各グループの酵素の種類(起源)によって特異性、性質にかなりのちがいのあることが明らかにされた¹⁾。

そこでわれわれはさらに次の三つの項目、すなわち1) β-キシロシダーゼの加水分解以外の転移作用・縮合作用の面からの観察、2) 有機溶媒が glycosidase の諸酵素反応に及ぼす影響、3) 転移反応、縮合反応による有用物質の生産等を目的として研究を進めた。

まずはじめにわれわれの研究から十分性質が明らかにされている、しかも転移作用の強い β-キシロシダーゼを生産する数株の糸状菌を選び、この粗酵素を用いて、加水分解作用に及ぼす有機溶媒の影響、またこれら溶媒中の酵素の安定性等につき検討した。*Aspergillus niger* の酵素は最も安定で、全般的にアセトンが加水分解反応に最も影響が少なく、メタノール、エタノール、

† "Proceedings of the Amylase Symposium, 1991"
聖徳栄養短期大学 (124 東京都葛飾区西新小岩 1-4-6)

2-プロパノールではむしろ加水分解の促進効果が認められた。そこで *Asp. niger* の粗酵素を用いキシロピオースを xylosyl donor とし、転移反応に及ぼすアセトンの影響を観察した。アセトン 25~50% (v/v) の存在はキシロトリオースの生成に有利に作用することが認められたが、とくに転移反応が顕著に進行することはなかった。一方 1-プロパノールの存在下ではキシロトリオースの生成はほとんど認められず、未知物質の生成が認められた。この未知物質は 2-プロピル β -キシロシドと同定された。種々のアルコール類につき転移反応を調べた結果、 C_1 ~ C_3 の直鎖 1 級アルコールに効果的に転移し、 C_3 , C_4 , C_8 の 2 級アルコールや 3 級ブチルアルコールも acceptor となり *Asp. niger* の酵素は広範な acceptor に転移しうる事が明らかになった。Water miscible アルコールの場合、理論収率に近いアルキル β -キシロシドが得られた。とくに興味があったのは、 C_4 以上の直鎖 1 級アルコール、 C_4 , C_8 の 2 級アルコールなど水に対する溶解度が低く、2 液層をなす反応系でも、かなりよい収率でキシロシドが得られたことである。とくにある場合には転移生成物が溶媒層に濃縮されることが認められた。

本稿では高級アルコール (water immiscible) の β -キシロシドの酵素合成を中心とし、これまでの研究経過、acceptor の範囲、実用性ある xylosyl donor、高級アルコールキシロシドの応用面の可能性、転移反応系におけるアルキルキシロシドの蓄積要因、glycoside の酵素合成に好適な酵素の特性等について述べる。また alkyl β -

xylopyranoside は単にアルキルキシロシドと省略して用いた。

II. これまでの研究

有機溶媒中で酵素反応を行うことが有利な実験例が数多く見られている。とくにプロテアーゼやリパーゼの縮合反応・交換反応について有効な例が多い。この一般的な理由の一つとして反応系における水の存在が加水分解の逆反応である縮合反応には不向きであり、また転移反応や交換反応においても水の存在は副反応を増すことになることである。しかし、これらの反応にもある程度の水は必須である。また反応基質として水に難溶性の化合物を対象とした場合、反応を有効に進めるためには反応系に有機溶媒を添加し均一系にすることが考えられる。

しかし糖質の反応を有機溶媒中で行った研究はこれまでプロテアーゼやリパーゼに比し非常に少なかった²⁾。

1. β -キシロシダーゼ活性および安定性に及ぼす有機溶媒の影響³⁾

酵素源としてはわれわれの研究からその酵素化学的性質がよくわかっており、しかも転移作用の強いものを選んだ (*Aspergillus niger* IFO 6662, *Penicillium wortmanni* IFO 7237, *Trichoderma viride* N-35, *Emmericella nidulans* IFO 4340)。水溶性の有機溶媒としてはアセトン、DMSO、ジオキサン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールを用いた。各酵素の加水分解活性に及ぼす影響は各溶媒 25% (v/v)、50°C の条件で測定した (Table 1)。また

Table 1. Enzymatic (Hydrolytic) activity of various β -xylosidases in the presence of 25% (v/v) of water miscible solvents at 50°C.

The reaction mixture consisted of 0.25 ml of 0.02 M phenyl β -D-xyloside, 0.25 ml of various organic solvents and 0.5 ml of enzyme solution [*Asp. niger* (0.06 U/ml), *P. wortmanni* (0.05 U/ml), *T. viride* (0.04 U/ml), *E. nidulans* (0.05 U/ml)]. The enzyme activity is expressed as a percentage of the control (substituted 0.25 ml of 0.1 M acetate buffer for solvent).

Organic solvents	Relative activity (%)			
	<i>Asp. niger</i>	<i>P. wortmanni</i>	<i>T. viride</i>	<i>E. nidulans</i>
Control	100	100	100	100
Acetone	69	42	22	9
Dimethylsulfoxide	48	56	53	42
Dioxane	45	38	16	13
Acetonitrile	17	5	4	4
Methanol	118	102	117	26
Ethanol	131	114	78	16
1-Propanol	44	19	14	10
2-Propanol	143	72	35	11

Table 2. Stability of various β -xylosidases in the presence of 25% (v/v) of water miscible solvents at 30°C after 24 hr.

A quarter ml of β -xylosidase solutions [*Asp. niger* (0.10 U/ml), *P. wortmanni* (0.10 U/ml), *T. viride* (0.09 U/ml), *E. nidulans* (0.09 U/ml)] were mixed with 0.25 ml of 50% (v/v) of water miscible solvents. After the mixtures were incubated for 24 hr at 30°C, the residual activities were measured by the same method as described in the text. The residual activity is expressed as a percentage of the control (without thermal treatment).

Solvents	Residual activity (%)			
	<i>Asp. niger</i>	<i>P. wortmanni</i>	<i>T. viride</i>	<i>E. nidulans</i>
Distilled water	103	96	99	96
Acetone	75	N. T.	N. T.	N. T.
Methanol	105	27	22	16
2-Propanol	80	22	20	16

N. T., not tested.

溶媒中の安定性についてはアセトン、メタノール、2-プロパノール 25% (v/v) 中、30°C、24時間の条件で残存活性を測定した (Table 2).

一般的にアセトニトリル、1-プロパノールの共存で加水分解活性の低下が見られた。*Asp. niger* の場合は、アルコール共存下でも比較的高い活性を示し、アセトンに共存下でも活性の低下は著しくなかった。安定性においても *Asp. niger* の酵素は他の3菌株由来のものより優れていた。したがって以後の研究はすべて *Asp. niger* の β -キシロシダーゼを用いて行った。さらに詳細に検討した結果、アセトンを含む系では30°C~50°Cで比較的活性低下は著しくなく、30°C、アセトン 50% (v/v) の存在下でも通常の50%の活性を保持していた。一方水溶性アルコールでは、どのアルコールの存在下でも50°Cでは濃度の増加とともに活性の著しい減少が見られた。30°Cではアルコール間に多少の差が見られたが、アルコール 50% (v/v) 濃度でも高い β -キシロシダーゼ (加水分解) 活性が認められた。

2. *Asp. niger* β -キシロシダーゼの糖転移反応に及ぼす水溶性有機溶媒の影響³⁾

まず加水分解活性への影響が比較的少なかったアセトンについてキシロビオースを基質とし転移反応への影響を検討した。アセトンが高濃度になる程 (50% (v/v)) キシロトリオースの生成率が高くなり、また反応の経時的変化を見るとキシロトリオースの生成に傾きながら進行することがわかった。しかし長時間の反応ではキシロビオースは完全に水解され、キシロトリオースが効果的に蓄積することはなかった (Fig. 1).

次に水溶性のアルコールとして2-プロパノールについて検討した。アルコール無添加の場合、反応液の HP-

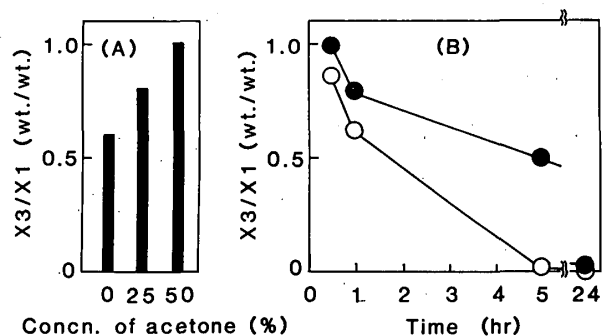


Fig. 1. Effect of concentration of acetone on transxylosyl reaction.

Effect of concentration of acetone (A). The reaction mixture, containing 0.25 ml of 10% xylobiose (0.1 M acetate buffer, pH 4.0) and 0.5 ml of acetone in various concentrations and 0.25 ml of *Asp. niger* β -xylosidase (10 U/ml), was incubated for 1 hr at 30°C. Aliquots of reaction mixture were withdrawn and analyzed by HPLC.

Time course of transxylosyl reaction in 25% (v/v) acetone (B). The reaction mixture with the same composition as in (A), was incubated for the periods indicated at 30°C. Aliquots of reaction mixture were withdrawn and analyzed by HPLC as mentioned in the text. ●, Presence of 25% acetone; ○, absence of acetone. Symbols: X1, xylose; X3, xylotriol.

LC分析でキシロトリオースの生成が認められたが2-プロパノールの添加の場合にはキシロトリオースの生成はほとんど認められず、キシロース、キシロビオース以外に未知ピークが観察された。のちにこの未知物質は2-プロピール β -キシロシドと同定された。

Asp. niger の酵素の転移反応によるオリゴ糖の合成を目的とした場合、アセトンはあまり効果がなかった。

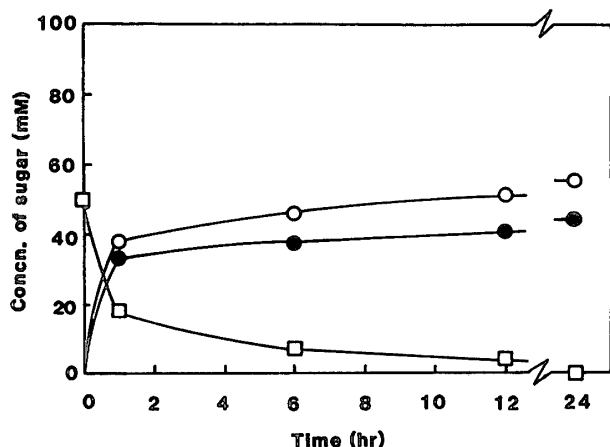


Fig. 2. Time course of formation of 2-propyl β -xyloside.

Reaction mixture (5.0 ml) containing xylobiose (50 mM in final concentration), 2-propanol (25%, v/v) and *Asp. niger* enzyme solution (12.5 units/5.0 ml of β -xylosidase activity) was incubated at 30°C. Two hundred μ l of samples were taken out at the times indicated, and analyzed by HPLC. ●, 2-propyl β -xyloside; ○, xylose; □, xylobiose.

水溶性アルコールを用いた場合にはアルコールが acceptor となり、オリゴ糖の生成はほとんど起らず、かわりにアルキルキシロシドが生成した。しかし、アルキルキシロシドの合成を目的とするならば、本酵素はアルコール溶液中で比較的安定であり、反応条件を検討すれば、これまで化学的に合成されていたアルキル β -キシロシドを酵素的に1段階の反応で、簡単に、しかも効率的に合成しうることが考えられた。

III. *Asp. niger* β -キシロシダーゼの転移反応によるアルキルキシロシドの合成

1. 2-プロピルキシロシドの生産条件の検討⁴⁾

酵素の安定性、加水分解反応に対する影響、生成アルキルキシロシドの収率等の点からアルコールとして2-プロパノールを選びキシロシド生産条件の検討を進めた。

まずアルコール濃度 25% (v/v), 50 mM キシロビオースを基質とし 2-プロピルキシロシド生産の経時的変化を調べた (Fig. 2)。キシロビオースの減少につれ、これに対応する量のキシロシド、キシロースがほぼ等モル生成され、生成された2-プロピルキシロシドは反応液中で安定に存在し、減少は観察されなかった。この反応条件で24時間後、キシロシドは45 mM, キシロースは55 mM 生成し、キシロビオースは検出されなかった。メタノール、エタノール、1-プロパノールの結果もほぼ同様であった。また2-プロピルキシロシドの生成量はこのような反応条件で基質キシロビオース濃度 (0~100 mM) に比例し増大した。2-プロパノール濃度 (5, 10, 25, 35, 50% (v/v)) を検討したところ 25~35% (v/v) が最適で、それ以上でもキシロシドの収率が低下することはないが基質キシロビオースの残留が認められるようになった。

Table 3. Production of various alkyl β -xylosides. Reaction mixture (2 ml) containing xylobiose (50 mM in final concentration), various alcohols (25%, v/v), *Asp. niger* enzyme solution (5 Units/2 ml) and additional distilled water were incubated for 24 hr at 30°C. After emulsifying by the addition of 6 ml of acetonitrile, the samples were separated on TLC, and alkyl β -xylosides and xylose spots were visualized and the amount of the sugars was estimated by densitometry.

Alcohol	Concentration of sugar (mM)	
	Xyloside (Yield, %)	Xylose
Primary		
Methanol	42 (84)	52
Ethanol	42 (84)	44
1-Propanol	45 (90)	41
1-Butanol	41 (82)	46
<i>iso</i> -Butanol	50 (100)	44
1-Pentanol	41 (82)	60
1-Hexanol	29 (58)	58
1-Heptanol	22 (44)	68
1-Octanol	10 (20)	72
Benzyl alcohol	50 (100)	60
β -Phenyl ethyl alcohol	57 (114)	58
Secondary		
2-Propanol	47 (94)	50
2-Butanol	44 (88)	61
2-Hexanol	8 (16)	91
Cyclohexanol	21 (42)	73
Tertiary		
<i>tert</i> -Butanol	12 (24)	68

転移反応で基質 (xylosyl donor) キシロビオースの xylosyl 基がすべてアルコールに転移したとすると生成するキシロシドとキシロースのモル比はほぼ 1:1 となる。*Asp. niger* 酵素 (5 U), 25% (v/v) のアルコール (メタノール, エタノール, 1-プロパノール, 2-プロパノール), 50 mM キシロビオース濃度で、生成するアルキルキシロシドとキシロースのモル比はだいたい 1:1

となり、理論収率に近いことを示している。

2. Xylosyl acceptor となるアルコールの範囲⁴⁾

キシロビオースを xylosyl donor とし種々のアルコールと反応させ、反応液を TLC により分離し、硫酸炭化後、デンストメトリーで生産物を定量した (Table 3)。表にあげた C₁~C₈ の直鎖 1 級アルコール, C₃, C₄, C₆ の 2 級アルコール, シクロヘキサノール, ベンジルアルコール, 3 級ブチルアルコール等に転移生成物が認められ、1-オクタノール, 2-ヘキサノール, 3 級ブチルアルコールの収率はいくぶん低かったが、それ以外のアルコールのキシロシドはかなり好収率で得られた。

Water immiscible アルコールの場合反応系は 2 液層となる。それで反応終了後アセトニトリルを加え均一溶液とし TLC で分離、生成物を確認した。

この結果からわかるようにメタノール, エタノール, 1-プロパノール, 2-プロパノールのような water miscible アルコールのみならず, C₄~ 以上の直鎖 1 級アルコール, 2 級アルコール等 water immiscible アルコールの場合も好収率でキシロシドが得られたことは興味深い。

3. 1-ヘキサノール β-キシロシドの酵素合成⁴⁾

1-ヘキサノールは水にほとんど溶けないので反応系は

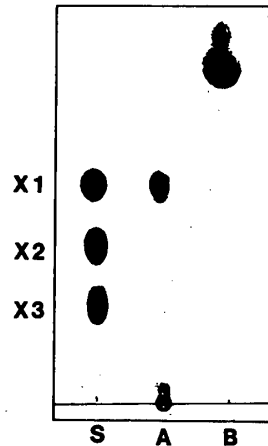


Fig. 3. Thin layer chromatogram of reaction products of the transxylosyl reaction in 1-hexanol.

Reaction was carried out as described in Fig. 4. S, standard (X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose); A, water layer; B, 1-hexanol layer.

2 液層となる。

500 ml の酵素液 (3.2 U/ml *Asp. niger* β-キシロシダーゼ), 125 ml の 1-ヘキサノール, 5 g のキシロビオースよりなる系を 30°C, 24 時間, 回転振とう機上で反応させ、反応後 1-ヘキサノール層と水層を分離する。

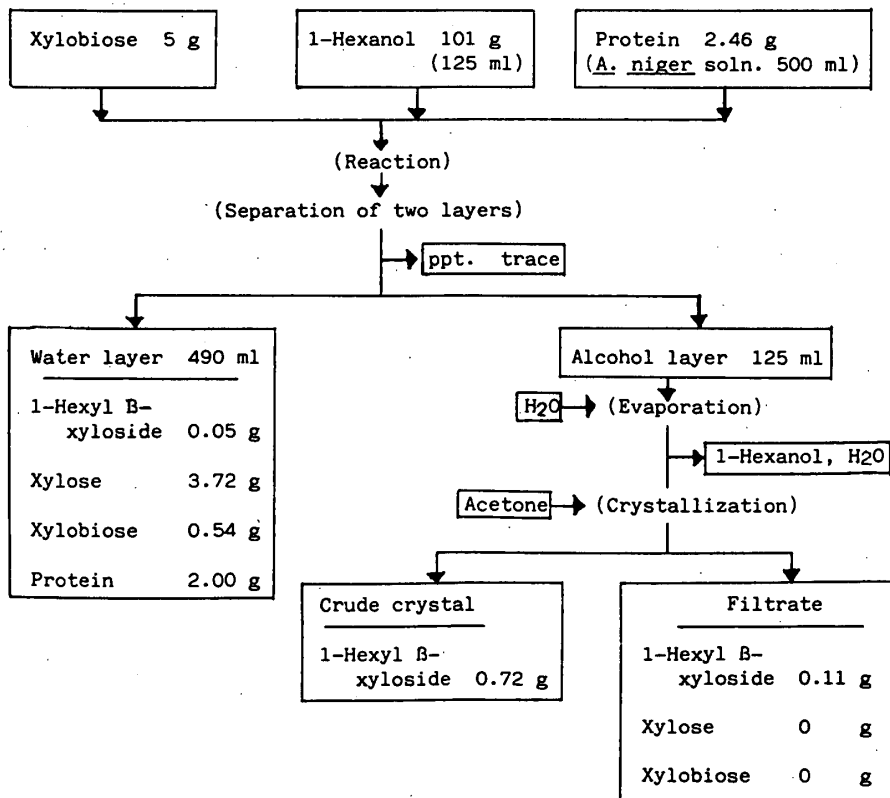


Fig. 4. Procedure for enzymatic preparation of 1-hexyl β-xyloside from xylobiose.

各層の成分を TLC で分析すると水層にはキシロースのみ、ヘキサノール層には 1-ヘキサノールキシロシドのみが検出された。1-ヘキサノール層に水を加え、減圧濃縮するとヘキサノールは共沸混合物を作り溜去され、1-ヘキサノールキシロシドの結晶 (0.72 g) が得られた (Fig. 3, 4)。

アセトン 2 回再結後の標品は TLC で単一のスポットを示し、 $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$ ($c=1$, MeOH), m. p. = 88.5°C (文献値 $[\alpha]_D^{20} = -50.9^\circ$ ($c=1$, MeOH), m. p. = 88~89°C) であった。

一般に疎水性の水に難溶性のアルコールの場合、酵素転移反応はむずかしいとされているが、この β -キシロシダーゼの例では 1-ヘキサノール、ベンジルアルコールの場合にも反応は進行する、1-ヘキサノールの場合には、都合のよいことに、生成されたキシロシドはすべて溶媒層に移り、水層には存在しない。このことは分離、結晶化を非常に有利にしている。

2 層系で、不均一系反応であるため攪拌などにより反応速度を高めることができると思われるが、反応工学的検討は今後の課題である。この系にアセトン等を加えて系を均一化することを試みたが、キシロシドの収率に特別な改善はみられなかった (未発表)。

IV. 実用性ある xylosyl donor⁵⁾

これまでの実験では xylosyl donor としてフェニルキシロシド、キシロビオースが用いられている。フェニルキシロシドは合成も容易で市販されているが、工業的に用いるとなれば高価である。キシロビオースは現在試薬として市販されており利用可能であるが、いまだ高価である。しかし、最近キシロビオースやキシロオリゴ糖の食品化学的特性、生理活性の興味が高まり、とくにキシロビオースを主成分とするキシロオリゴ糖シロップが 2~3 の会社から販売されており、これらは近い将来、工業的に利用可能な xylosyl donor となるものと考えられる。

一方キシロシダーゼによる転移反応機構を考えると、酵素はキシロオリゴ糖の非還元末端に作用し、酵素基質複合体を形成して、次にキシロース残基一つ減ったキシロオリゴ糖と xylosyl 酵素が生成されると考えられる。実際にキシロトリオースを基質として使用した場合、キシロビオースの場合と同様アルキルキシロシドが生成し、反応の終点ではキシロビオースの場合と同様、反応液中には TLC でキシロシドとキシロースのみが検出された。キシロトリオースを基質として用いた場合、キシロシド

の理論収率はキシロビオースの場合より高いはずであるが、現在定量的検討を行っている。キシロトリオースが xylosyl donor となるので、キシロオリゴ糖シロップ、キシランの酵素部分水解物も xylosyl donor として十分作用できるはずである。実際にこれらは十分 xylosyl donor として作用することが明らかにされている。市販キシロオリゴ糖シロップの糖組成の 1 例を示すとキシロビオース 42.3%、キシロトリオース 37.2%、キシロテトラオース以上 20.4% となっておりキシロース含量は少ない。しかしキシランの酵素部分水解物中にはキシロースが含まれている。そこで 1-ヘキシルキシロシド生成に及ぼすキシロースの影響を検討した。キシロースが 5% 以上存在するとキシロシドの生成はかなり抑制されたが 2.5% 以下の濃度ではほとんど影響は見られなかった。この研究の実験条件ではほとんど影響はないことになる。

キシロオリゴ糖シロップやキシランの酵素部分水解物が xylosyl donor に利用することができれば十分安価にキシロシド酵素合成が可能となるものと思われる。

V. キシロオリゴ糖より高級アルコール β -キシロシドの酵素合成⁵⁾

キシラン標品に放線菌由来のキシラナーゼを作用させて得られるキシロオリゴ糖混合液、または市販キシロオリゴ糖シロップに *Asp. niger* β -キシロシダーゼをアルコール存在下で作用させ高級アルコールキシロシドの合成を試みた。

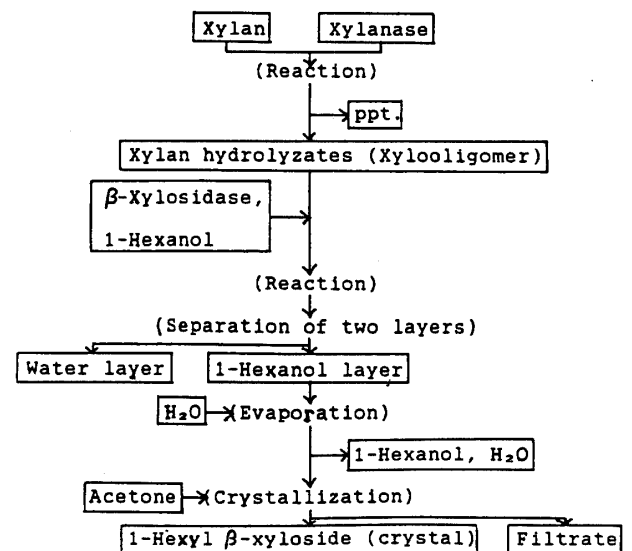


Fig. 5. Procedure for the enzymatic preparation of 1-hexyl β -xyloside from xylan hydrolyzates.

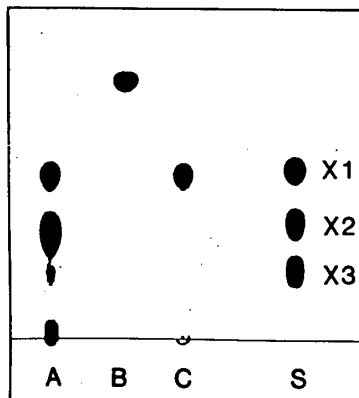


Fig. 6. Thin layer chromatogram of reaction products of the transxylosyl reaction from xylan hydrolyzates in 1-hexanol.

S, standards (X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose); A, xylan hydrolyzates by xylanase; B, 1-hexanol layer; C, water layer.

Table 4. Preparation of various alkyl β -xylosides from xylooligomers.

Alcohol	Substrate ^{a)} (g)	Alkyl β -xyloside formed (g)	Yield ^{b)} (mg)
1-Pentanol	12.42	2.67	215
1-Hexanol	13.80	2.16	157
1-Heptanol	13.80	0.83	60
1-Octanol	20.70	0.42	20
Benzyl alcohol	12.42	1.46	118

^{a)} Xylooligomer (xylobiose, 42.3%; xylotriose, 37.2%; xylootetraose, 20.4%) ^{b)} Yield of alkyl β -xylosides from 1 g of xylooligomers

モデル系として1-ヘキシルキシロシドの合成例をFig. 5に示す。キシラン標品10gに放線菌由来キシランナーゼ100 ml (1167 U)を加え、55°C, 2時間, 加水分解した。反応後の遠心上清をキシロオリゴ糖液とした(糖組成: キシロース 2.39 g, キシロピオース 3.36 g, キシロトリオース 0.29 g)。このキシロオリゴ糖全量に *Asp. niger* 酵素 900 ml (2700 U), 1-ヘキサノール 250 mlを加え、30°C, 48時間振とう, 反応させた。反応後2液層を分離した。前述のごとく1-ヘキシルキシロシドはほとんどヘキサノール層のみに濃縮されており (Fig. 6), 溶媒溜去後, アセトンで再結し, 0.75 gの1-ヘキシルキシロシドの精製標品が得られた。

次に同様の反応系で各種アルキルキシロシドの合成を試みた。この結果はTable 4に示されている。この表の実験は市販キシロオリゴ糖シロップが用いられており, 収率は分析法が確立していなかったため, 分離した結晶

Table 5. Melting point and specific rotation of prepared alkyl β -xylosides.

Aglycon	m. p. (°C)	$[\alpha]_D^{20}$
1-Pentyl	88-89	-54.8° c=1, MeOH
	(88-89)	-54.5° c=2, MeOH) ^{a)}
1-Hexyl	88-89	-50.1° c=1, MeOH
	(88-89)	-50.9° c=2, MeOH) ^{a)}
1-Heptyl	83-84	-46.1° c=1, MeOH
	(84-85)	-48.4° c=2, MeOH) ^{a)}
1-Octyl	92-93	-45.7° c=1, MeOH
	(91-92)	-45.1° c=2, MeOH) ^{a)}
Benzyl	116-117	-63.7° c=1, H ₂ O
	(112)	-68±2° c=2.4, H ₂ O) ^{b)}

^{a)} See reference 6). ^{b)} See reference 7).

の量から算出している。少なくとも確実にこの程度のキシロシドが得られることを示している。

なお, 得られたアルキルキシロシド標品の融点, 比旋光度がTable 5に示されているが, 文献値とよく一致している。

VI. 高級アルコールキシロシドの 応用面の可能性^{b)}

界面活性剤にもいろいろな種類がある。生化学の領域で膜蛋白を可溶化する場合, 界面活性剤がよく使われる。しかし, すべての膜蛋白の可溶化に適用できるような界面活性剤があるわけではないといわれている。それゆえ, それぞれの膜蛋白に対していろいろな界面活性剤を試してみる必要がある。このような膜蛋白の可溶化によく使われる活性剤の一つに octyl β -glucoside 系の非イオン型界面活性剤がある。本報の主題の高級アルコールキシロシドはこれと構造が非常によく似ているのでキシロシドの界面活性剤としての特性を検討した。

実験には本研究で酵素合成された1-ヘプシルキシロシドを対象とした。

Critical micelle concentration (cmc) の決定には二つの方法を用いた。一つは可溶化された ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid) の50°Cにおける蛍光強度と界面活性剤濃度の関係を調べ, 急激に蛍光強度が強くなる屈曲点の濃度を測定する方法, 他は表面張力と界面活性剤濃度の対数との関係から屈曲点の濃度を求める方法がとられた。また後者の関係図の直線の傾斜から corresponding molecular area (A) が計算された。なお micellar weight, aggregation number は光散乱法で測定された。

Table 6. Surface active properties of alkyl glycosides and some other surfactants.

Surfactants	cmc (mM)	A (Å)	Micellar wt. (Agg. Numbr.)
Heptyl xyloside	30	43	20700 (78)
Octyl glucoside	22	41**	25800** (87)
Sucrose monodecanoate	2.52**	—	10500** (22)
Triton X-100	0.25**	52.4**	63000** (100)
SDS	8.1**	45**	23000** (80)

** See reference 8).

1-ヘプチルβ-キシロシド, 1-octyl β-glucoside, スクロースモ, デカ, エイト, Triton X-100, SDS について cmc 値, A 値 micellar weight (aggregation number) の実測値, および文献値が Table 6 に示されている。

1-ヘプチルキシロシドの各特性値は 1-octyl β-glucoside のものと非常に類似しており, 同じ目的に利用しうることを示唆している。

1-octyl β-glucoside は膜生化学の領域で有用な界面活性剤の一つで, たとえば大腸菌の lactose carrier の抽出・精製, lipid vesicle の調製に有効である。ヘプチルキシロシドについても今後実際に試験してみる必要がある。アルキルキシロシドとアルキルグルコシドは構造的に類似しているが, グリコン部分では大きな差があり, このことがアルキルキシロシド特有の特質を示す可能性もあり, 今後検討の意味があろう。

VII. アルコール溶液中の反応で転移生成物のアルキルキシロシドが蓄積する要因⁹⁾

転移反応で生成するアルキルキシロシドは水溶液中では *Asp. niger* のキシロシダーゼで加水分解されるにもかかわらず, アルコール共存下の転移反応系では安定に存在し, しかも理論収率に近い値が得られている。この転移産物の蓄積要因につき検討した。

1. 酵素の不安定性

予備実験で明らかのように 25% (v/v) のアルコール存在下では酵素は比較的安定で, キシロシド生成後, 酵素が破壊されたためではないことは明らかである。

2. 生成アルキルキシロシドの加水分解に対する抵抗性

種々のアルキルキシロシドの水溶液中での加水分解速度を比較した結果, フェニルキシロシドの分解速度を 100 とした場合, メチル, 2-プロピル, 1-ベンチル, 1-ヘプチル各キシロシドの相対的加水分解速度は 1.2, 27.3, 12.7, 2.6 であった。この結果からメチルおよび 1-ヘプチルキシロシドの場合には分解速度が遅いことが蓄積の 1 要因と考えることができる。しかし 2-プロピルキシロシドの分解速度はかなり速いにもかかわらず定量的に蓄積するので, 分解の難易が蓄積の要因になるとは考えられない。

3. 生成キシロースが逆反応を阻害する可能性

キシロビオース, キシロオリゴ糖を基質とした場合, アルキルキシロシドの生成とともにキシロースもほぼ等モルまたはそれ以上生成される。そこでキシロースのキシロシダーゼ活性に及ぼす影響を調べた。キシロース 100 mM の存在で 54% まで活性は低下するが, 基質であるフェニルキシロシド (10 mM) と同程度の濃度のキシロースでは 90% の活性を維持していたことから, 副生するキシロースによる反応阻害によるものではないと結論された。

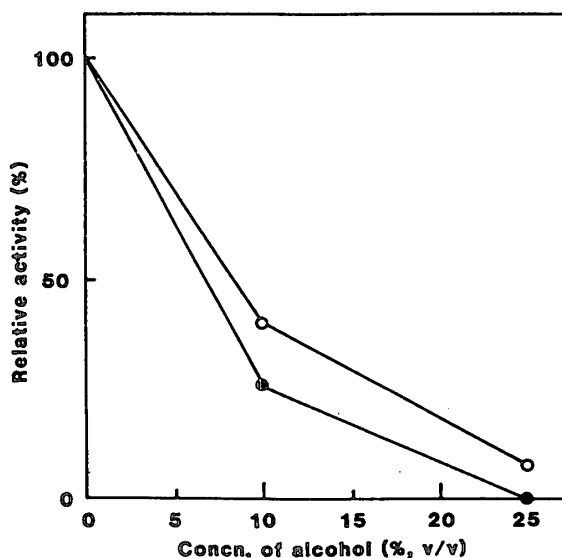


Fig. 7. Hydrolysis of 2-propyl β-xyloside in the presence of methanol or 2-propanol.

The reaction mixture, containing 0.25 ml of 2-propyl β-xyloside solution (50 mM), 0.25 ml of 2-propanol or methanol solution in various concentrations and 0.5 ml of enzyme solution (0.06 U/ml), was incubated at 50°C. ○, Methanol; ●, 2-propanol.

Table 7. Formation of alkyl glycosides in the presence of alcohols.

Alcohol	β -Xylosidase			α -Glucosidase		β -Glucosidase			β -Galactosidase	
	<i>Asp. niger</i> ^{a)}	Rice ^{a)}	Yeast ^{a)}	<i>Asp. niger</i> ^{2)b)}	Almond ^{a)}	<i>Asp. niger</i> ^{a)}	<i>K. lactis</i> ^{3)b)}	<i>E. coli</i> ^{a)}	<i>A. oryzae</i> ^{a)}	<i>A. oryzae</i> ^{4)b)}
Methanol	+	+	-(-) ^{c)}	○	+	+	○	+(+) ^{c)}	+	○
Ethanol	+	+	-(-)	○	+	+	○	+(+)	+	
1-Propanol	+	±	-(-)	○	+	+		-(-)	+	
1-Butanol	+	±	-(-)	○	+	+		+(+)	+	○
1-Pentanol	+	-	±(+)	○	-	±		-(+)	-	
1-Hexanol	+	-	-(+)		-	-		-(+)	-	
1-Octanol	+	-	-(+)		-	-	○	-(+)	-	
Benzyl alcohol	+	±	-(-)		±	±		-(-)	±	
2-Propanol	+	+	-(-)		±	±	○	+(+)	±	○
2-Butanol	+	±	-(+)		-	-		+(+)	±	
2-Hexanol	±	-	-(+)		-	-		-(+)	-	
Cyclohexanol	+	-	-(+)		-	-		+(+)	-	○
<i>tert</i> -Butanol	+	-	-(+)		-	-	×	-(+)	-	

^{a)} % for yield from experimental results. -, not detected; ±, ~19%; +, 20~59%; ++, 60~100%. ^{b)} Qualitative estimate from literatures. ○, Produced; ×, Not produced. ^{c)} Hydrolytic activity for corresponding disaccharide.

4. アルコールによるアルキルキシロシドの分解阻害

2-プロピルキシロシドについて、加水分解に及ぼすメタノール、2-プロパノール (0~25% (v/v) 50°C, 15分) 添加の影響を調べた。アルコールが 25% (v/v) 程度存在するとメタノール、2-プロパノールいずれの場合にも加水分解はほとんど完全に阻害された (Fig. 7)。これはキシロシダーゼがアルコールによって破壊されたためでないことは前述の通りである。2-プロピルキシロシドの分解過程で生成する xylosyl 酵素が再び 2-プロパノールに転移する交換反応が起っていることが予想される。そこで 1 ml 中 2-プロピルキシロシド 50 mM, メタノール 25% (v/v), β -キシロシダーゼ 3.2U を含む混合液を 30°C, 24時間反応させ、反応液を HPLC で分析した。その結果メチルキシロシドの生成が認められ、予想通り基質分解の過程で生じた xylosyl 酵素がメタノールと反応した結果と考えられた。ここでメタノールのかわりに 2-プロパノールが存在すれば、xylosyl 酵素は 2-プロパノールに作用し、2-プロピルキシロシドが再生されるため、見かけ上 2-プロピルキシロシドの分解が見られないものと考えられた。結局 2-プロパノールの共存による平衡の移動が蓄積の主因であると結論された。

VIII. Glycoside の酵素合成に最適な酵素の特性¹⁰⁾

Asp. niger の β -キシロシダーゼはいろいろな面で糖転移反応に有利な性質をそなえている。この特性は glycosidase の糖転移反応による glycoside の生成についてもあてはまるものと考えられる。

まず第 1 に有機溶媒中での酵素の安定性があげられる。第 2 にアルコール中での転移能の幅の広さである。Table 7 に種々の起源の各種 glycosidase のアルコール溶液中における alkyl glycoside 生成能についての測定結果がまとめられている。*Asp. niger* の β -キシロシダーゼは程度の差はあるが表中のほとんどすべてのアルコールに転移を示している。しかし他の酵素の場合、一般的にいって C₁~C₅ 直鎖 1 級は acceptor となるが、2 級アルコール、3 級アルコールはほとんど acceptor とならない。*Asp. niger* β -キシロシダーゼは広範なアルコールを acceptor としうることがわかる。酵母の α -グルコシダーゼはほとんどのアルコールに転移反応を示さない。C₁~C₄ 直鎖アルコールの共存で加水分解活性も測定できないのでおそらく酵素が失活しているものと思われる。しかし C₆~C₈ の直鎖アルコール中では加水分解活性は見られるが転移反応は見られず、この酵素の転移能が低いことを示している。*E. coli* の β -ガラクト

シダーゼの場合, C₁, C₂, C₄ 直鎖 1 級アルコールの共存下, 転移物が生成されるが, 1-プロパノール中では酵素が失活し転移物はできない. C₅~C₈ の直鎖アルコール中では加水分解活性は認められるが転移物は検出されない. このように酵素はアルコールの存在で安定であっても acceptor の幅がせまく転移能を示さない場合もある.

Glycosylation に最適な酵素は 1) アルコールの存在下で安定であり, かつ 2) 種々のアルコールに対して, 強い転移作用をもつ酵素ということができる.

文 献

- 1) 松尾 勝: 化学と生物, 24, 632-635 (1986).
- 2) 安井恒男, 飯塚佳恵: *Nippon Nōgeikagaku Kai-shi*, 65, 1107-1110 (1991).
- 3) 篠山浩文, 安井恒男: 農化, 62, 1339-1343 (1988).
- 4) H. SHINOYAMA, Y. KAMIYAMA and T. YASUI: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2197-2202 (1988).
- 5) 篠山浩文, 神山 由, 安井恒男: 農化, 63, 1479-1484 (1989).
- 6) C. K. de BRUYNE and F. G. LOONTIENS: *Nature*, 209, 396 (1966).
- 7) H. C. ROBINSON, M. J. BRETT, P. J. TRALAGGAN, D. A. LOWTHER and M. OKAYAMA: *Biochem. J.*, 148, 25 (1975).
- 8) H. SHINOYAMA, Y. GAMA, H. NAKAHARA, Y. ISHIGAMI and T. YASUI: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 291-292 (1991).

9) 篠山浩文, 神山 由, 祥雲弘文, 安井恒男: 醸酵工学, 69, 159-162 (1991).

10) H. SHINOYAMA and T. YASUI: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2375-2377 (1988).

【質問】

北大農 千葉

有機溶媒中の反応で合成された配糖体が蓄積するのは, 配糖体に対する酵素の親和性が著しく低いためであると単純に考えることはできないでしょうか.

【答】

そのような考えで, 動力学的な実験をしておりませんので, お考えを否定することはできませんが, 水溶液中ではメチルキシロシドの分解は非常に遅いのですが, 2-プロピルキシロシドの分解はかなり速いので, 生成物の分解の難易によるものではないと考えられます. また 2-プロピルキシロシドはアルコール 25% (v/v) の存在でその分解はほとんど完全に阻害されますし, 2-プロピルキシロシドに 25% (v/v) メタノール中で酵素を作用させるとメチルキシロシドの生成が見られるので, アルコール基の交換反応が活発に起っている, つまり平衡の状態にあると考えられます. 単に酵素の親和性が低くなったからと考えると交換反応が説明しにくいと思われます.

(平成4年3月23日受付)