



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Brevibacterium sp.

No.9605株の生産する γ -サイクロデキストリン
グルカノトランスフェラーゼに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 茂治 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2263

氏 名 (本籍)	森 茂 治 (愛 知 県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博乙第 18 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 10 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	<i>Brevibacterium</i> sp. No. 9605 株の生産する γ -サイ クロデキストリン グルカノトランスフェラーゼに 関する研究
審 査 委 員	主査 静 岡 大 学 教 授 碓 氷 泰 市 副査 静 岡 大 学 教 授 衛 藤 英 男 副査 岐 阜 大 学 教 授 加 藤 宏 治 副査 信 州 大 学 教 授 細 野 明 義 副査 静 岡 大 学 助 教 授 河 岸 洋 和

論 文 の 内 容 の 要 旨

サイクロデキストリン (CD) は、グルコース単位が α -1, 4-グルコシド結合にて環状に結合したマルトオリゴ糖で、グルコース残基が、6、7そして8個から成るそれぞれ α -、 β -そして γ -CD と呼ばれている3種の CD がよく知られている。これら CD は種々の有機化合物を取り込むことの出来る包接能を有するため、 α -及び β -CD については食品、化学、医薬品分野をはじめ広い分野で利用されている。一方 γ -CD は α -及び β -CD に比べ、疎水分子を包接させるための空洞直径が大きく水に対する溶解度も高い等の優れた性質を有しているにもかかわらず、工業的にはその生産性が低いため応用展開には至っていない。本研究は γ -CD を工業的に生産するため、澱粉から優先的に γ -CD を生産する γ -CGTase 生産菌の探索から始まり、生産菌からの γ -CGTase の特定と分離精製と諸性質、 γ -CD の生成条件、さらには本酵素の糖転移特異性を論述している。

まず第一に澱粉から γ -CD を優先的に生成する CGTase 生産菌を土壌から検索し、*Brevibacterium* 属に属する菌株を分離し、*Brevibacterium* sp. No. 9605 株と命名した。本菌株の培養液から γ -CGTase を分離するために順次 Butyl-Toyopearl 650M、 γ -CD-Sepharose、そして Toyopearl HW-55S クロマトグラフィーを用いることによって、本酵素を化学的に均一にまで精製している。本酵素は澱粉、アミロペクチンを基質とし反応初期に目的の γ -CD を優先的に生成するが、反応時間を長くすると次第に β -CD 生成量も増大してくることも明

らかにしている。

次に γ -CGTase が γ -CD 生成に及ぼす諸条件の検討を行っている。pH 7、50℃において γ -CD 生成量は最大を示すとともに、本反応系への塩化カルシウムの添加は必須であることも明らかにした。エタノールの添加効果についてはその濃度を 20%まで増加させると、濃度の増大とともに γ -CD 生成量は増加し、 β -CD の生成量を減少させることを見出した。これは、 γ -CD 生産性を向上させる上で重要な知見を得たことになる。

最後に γ -CGTase の分子間転移反応における単糖類及びフェノール関連化合物に対する受容体特異性について検討を行っている。本酵素は幅広い受容体特異性を示し、単糖類では D-マンノースと L-ラムノースに対し転移生成率が高く、前者を受容体とした時の主転移生成物は、4-O- α -D-glucosyl-D-mannose であることを明らかにした。またコージ酸を受容体とした時は、2 種類の転移生成物を合成し、この主生成物は Kojic acid 7-O- α -D-glucoside であった。さらにフェノール関連化合物を受容体とした時、1,3-ジヒドロキシベンゼン、1,3,5-トリヒドロキシベンゼン、3-ヒドロキシベンジルアルコール、(+)-カテキンに対し、高い転移生成率を示した。

このように本研究は、澱粉から γ -CD を生産する生産菌を土壌から分離し、本菌株から γ -CGTase を単離精製することで、 γ -CD 生産機序をも併せて実証している。そして本 CGTase を使って、澱粉からの γ -CD の効率的生産条件を明らかにすることによって、工業生産への可能性をも示している。さらに本酵素が γ -CD の生産ばかりでなく、分子間転移反応を行う際の幅広い受容体特異性を利用し、さまざまな糖誘導体へ変換できることを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

平成 10 年 1 月 26 日 15 時より静岡大学農学部において審査委員出席のもとで約 40 分間の口頭による公開論文発表の後、審査員により本論文を審査した。

本論文は、 γ -サイクロデキストリン (γ -CD、グルコース単位が 8 個 α -1, 4-グルコシド結合にて環状に結合したマルトオリゴ糖) を工業的に生産するため、1) 澱粉から優先的に γ -CD を生成する γ -サイクロデキストリン グルカノトランスフェラーゼ (γ -CGTase) 生産菌の検索、そしてその生産菌からの γ -CGTase の分離、精製、2) γ -CGTase による γ -CD の効率的生産条件、3) γ -CGTase の受容体特異性に関する 3 つの成果に要約される。

1) では、 γ -CD を効率よく生産する菌を土壌より探索し、その生産菌として *Brevibacterium* 属細菌である *Brevibacterium* sp. No. 9605 株を分離した。その結果として、本菌株の培養液から γ -CGTase を分離するため疎水クロマト、

アフィニティークロマト、ゲルろ過クロマトを駆使することで本酵素を化学的に均一にまで精製している。次に精製酵素を用いて、澱粉を基質にしての γ -CD 生産に関する最適条件を求めるとともに、その生成特性について検討した。本酵素は、澱粉やアミロペクチン及び短鎖アミロースを良い基質とし、反応初期に目的の γ -CD を優先的に生成するが、その時間が長くなると次第に β -CD の生成量も増加して来ることも明らかにした。

2) 本酵素の γ -CD 生成反応は、pH 7、50℃で最大を示し、本反応系への塩化カルシウム添加は必須であることを見出している。また、エタノールの添加効果は、その濃度を 20%にまで増加させると、濃度の増大とともに γ -CD 生成量は増加し、それに伴う副生成物である β -CD 生成量を減少させるという γ -CD 生産性の向上という観点からも極めて重要な知見を得た。

3) 本酵素の分子間転移反応における単糖類及びフェノール関連化合物に対する受容体特異性について検討を行っている。本酵素は幅広い受容体特異性を示し、単糖類では D-マンノースと L-ラムノースを良い基質とし、前者を受容体としたときの主転移生成物を 4-O- α -D-glucosyl-D-mannose であることを示した。また、抗酸化性物質として知られているコージ酸への配糖化反応を試みたところ、主生成物として Kojic acid 7-O- α -D-glucoside を単離した。またフェノール性化合物である 1,3-ジヒドロキシベンゼン、1,3,5-トリヒドロキシベンゼン、(+)-カテキン等に対しても高い転移特性を示した。

このように本論文は、実用性のある γ -CD 生産菌を土壌より分離し、それを生産する酵素を単離、精製そして諸性質を明らかにすることで、 γ -CD の高収率生産の可能性を実証した。従って本研究成果は、 γ -CD 生産の応用開発に大きく貢献するものと評価した。上記の理由により、本審査委員会は討議の結果、審査委員の全一致をもって本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと判定した。

[基礎となる学術論文]

1. Mori, S., Hirose, S., Oya, T., and Kitahata, S. (1994) Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 (11), 1968-1972.
2. Mori, S., Goto, M., Mase, T., Matsuura, A., Oya, T., and Kitahata, S. (1995) Reaction condition for the production of γ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (6) 1012-1015.

3. Mori, S., Goto, M., Tsuji, H., Mase, T., Matsuura, A., Oya, T., and Kitahata, S. (1997) Acceptor specificity of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605 to monosaccharides and phenolic compounds. *Oyo Toshitsu Kagaku, (J. Appl. Glycosci.)*, 44, 1, 23-32.

[既発表学術論文]

1. 森 茂治、廣瀬 進、辻 廣二、大矢隆一、(1991) 新菌 *Bacillus sectorramus* の生産するプルラナーゼの精製と諸性質、澱粉科学 (*Denpun Kagaku*)、38, 1, 9-16.
2. Mase, T., Matsumiya, Y., Mori, S., and Matsuura, A., (1996) Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Acremonium* sp. YT-78. *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 4, 347-350.
3. 森 茂治、大矢隆一、北畑寿美雄、(1997) *Brevibacterium* sp. No. 9605 株の生産する γ -CGTase の性質と利用、応用糖質科学 (*Oyo Toshitsu Kagaku: J. Appl. Glycosci.*) 44, 2, 185-194.