

[生物工学会誌 第75巻 第3号 177-180. 1997]

ノ ー ト

酵素を用いたハイドロキノン配糖体の合成

船山 正孝*・荒川 博邦・山本 良平

倉敷紡績株式会社技術研究所
〒572 大阪府寝屋川市下木田町14-5

(平成8年8月26日受付 平成9年1月24日受理)

Enzymatic Synthesis of Hydroquinone-Glucoside —Note—

MASATAKA FUNAYAMA,* HIROKUNI ARAKAWA, and RYOHEI YAMAMOTO (*Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd., Shimokida-cho, Neyagawa, Osaka 572*) Seibutsu-kogaku 75: 177-180, 1997.

Optimal conditions for the enzymatic synthesis of hydroquinone- α -glycoside using cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) or glucoside synthetase (GSase) were investigated. Glycosilation of hydroquinone by GSase was more efficient than that by CGTase. The optimal pH for the synthesis was pH 7. Periodic addition of dextrin S to the reaction mixture improved the efficiency of glucoside synthesis and was also effective in preventing decomposition of the product. The amount of glycoside reached a maximum 48 h after the start of the reaction. Residual hydroquinone was almost all removed from the product by Toyopearl HW40EC column chromatography. The glycoside yield was 36%, as molar %, of hydroquinone.

[Key words: polyphenol-glycoside, glucoside synthetase, hydroquinone- α -glycoside]

天然に豊富に存在するポリフェノールおよびそれら配糖体は多彩な生理作用を有している。たとえばお茶のポリフェノールが癌を予防したり転移を防止したりする効果があることが最近見いだされている。¹⁾また、ポリフェノール配糖体の一種であるアルブチンは美白効果があり、化粧品に応用されすでに大きな市場を形成している。²⁾

ポリフェノールを配糖化することにより新しい機能の付与、毒性の低下、ポリフェノールの安定化、水溶性の増大などが可能となり、さらに酵素的に配糖化できれば常温常圧での反応が可能である。また化学合成法に比べ基質および反応部位に対する特異性が高く、不斉合成などを容易に行えるなどの多くのメリットがある。

配糖体を製造する従来の一般的な方法によれば、たとえばハイドロキノン-グルコシドは α -異性体と β -

異性体との混合物として得られ、どちらか一方の異性体のみを高選択率で調製することは困難である。すなわち、グルコースとハイドロキノンをDMSO中、*p*-トルエンスルホン酸などの酸触媒の存在下において反応させる方法では α -異性体と β -異性体とは75:25の割合で合成され、収率がそれぞれ11%、4%となる。³⁾

一方、筆者らが示した酵素的にカテキンを配糖化する方法⁴⁾では一段階で反応が終了し、しかも α -異性体のみが選択的に合成できる。しかし、この技術を応用し、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(以後CGTアーゼと呼ぶ)を用いて数種のポリフェノール配糖体を合成するとその収率は比較的良かったハイドロキノンの α -グルコシドでもわずかに2%であった。そこで我々は配糖体合成効率の良い酵素をスクリーニングし、配糖体合成酵素(以後GSアーゼと呼ぶ)を見いだすまでに報告した。⁵⁾

今回、GSアーゼを用いたポリフェノール配糖体の

* 連絡先, Corresponding author.

製造法を確立するためにハイドロキノン- α -グルコシドをモデルとして製造条件を検討した。

酵素は、既報⁵⁾に従って調製したGSアーゼあるいは天野製薬㈱から購入した *Bacillus macerans* 起源のCGTアーゼ、基質に日薬化学㈱製デキストリンSを用い、ハイドロキノン配糖体の合成効率に与えるpHの影響を調べた。配糖体の定量はHPLCにて行った。すなわち、カラムに東ソー㈱製TSK-GEL ODS-120T (4.6×250 mm) および移動相にメタノール:0.1%トリフルオロ酢酸 (15:85) を用い、流速1.0 ml/分で流出する溶離液の283 nmの吸光度をモニターした。標準に既報⁶⁾の方法で単離したハイドロキノン- α -グルコシドを用いた。GSアーゼを用いた場合の結果をFig. 1に示す。どちらの酵素を用いてもpH7, 反応時間約40時間で合成効率は最大となりそれぞれ11%, 0.6%であった。

なお、pH7で酵素濃度が10, 50, 100 u/mlの時の合成効率を調べたところ、GSアーゼ濃度が100 u/ml, 反応時間約20時間で合成効率が約14%に達した。50 u/mlでも約40時間ではほぼ同様の合成効率に達した。CGTアーゼを用いたときはいずれの濃度でも合成効率は2%と頭打ちであった。

配糖体の合成効率に与える基質濃度の影響を調べた結果をFig. 2に示す。基質の濃度が39%の時反応時間約90時間で合成効率が26%に達し、それ以上の濃度では合成効率の向上は見られなかった。

デキストリンSの濃度を30%とし、GSアーゼ濃度をさらに高め合成効率を調べた結果(Fig. 3), いずれの

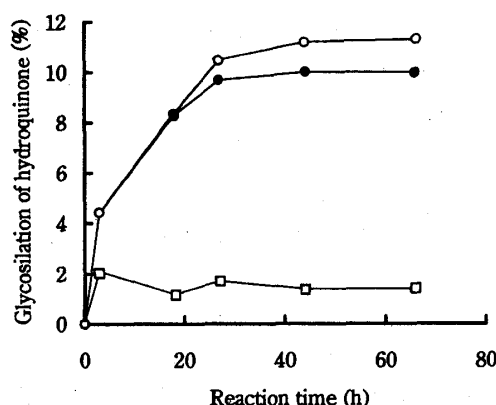


Fig. 1. Effect of pH on glycosilation of hydroquinone by GSase. Hydroquinone (666 mM), dextrin S (13%), and GSase (10 u/ml) were incubated at 40°C. Symbols: ●, pH 5 (50 mM acetate buffer); ○, pH 7 (50 mM phosphate buffer); □, pH 9 (50 mM NaHCO₃-NaOH buffer).

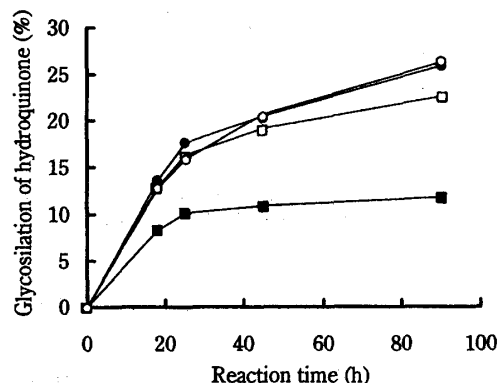


Fig. 2. Effect of dextrin S concentration on glycosilation of hydroquinone by GSase. The reaction mixture (58 ml, pH 7) containing hydroquinone (666 mM), dextrin S, and GSase (50 u/ml) was incubated at 40°C. Symbols: ■, 13%; □, 26%; ●, 39%; ○, 52%.

濃度においても合成効率は25-27%に達した後減少した。合成効率が最大に達する時間は酵素濃度が高いほど短かった。最短時間は400 u/mlの場合の約20時間であった。

反応途中で基質を追加する多段仕込みの効果を調べた結果をFig. 4に示す。反応開始後約48時間で合成効率が約38%に達し、その後横ばいとなった。一段仕込で反応させたときのような配糖体の減少は観察されなかった。

次に、ハイドロキノン配糖体を精製するため予備実験で7種類の担体を検討した。担体は、東ソー㈱製トヨパール HW40EC, フェニルトヨパール 650C, プチルトヨパール 650C, 和光純薬工業㈱製活性炭素, 三

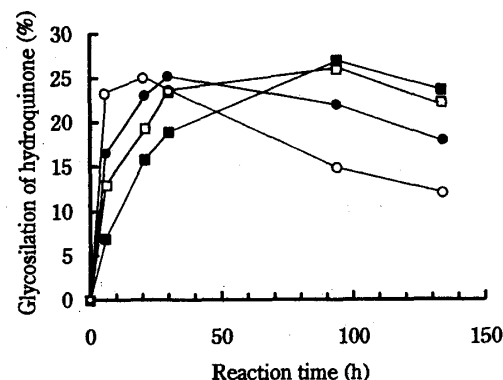


Fig. 3. Effect of GSase concentration on glycosilation of hydroquinone. The reaction mixture (58 ml, pH 7) containing hydroquinone (666 mM), dextrin S (30%), and GSase was incubated at 40°C. Symbols: ■, 50 u/ml; □, 100 u/ml; ●, 200 u/ml; ○, 400 u/ml.

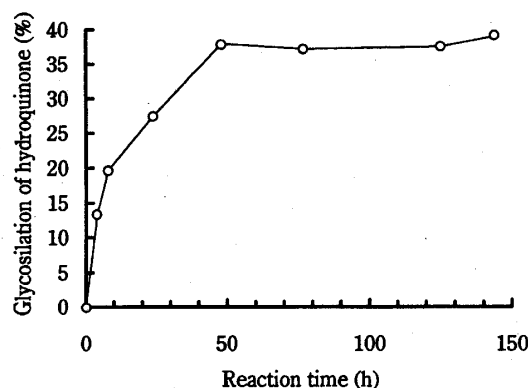


Fig. 4. Effect of feeding of dextrin S on glycosilation of hydroquinone. The reaction mixture (100 ml, pH 7) containing hydroquinone (666 mM), dextrin S (30%), and GSase (100 u/ml) was incubated at 40°C. Dextrin S (15 g) was added to the reaction mixture 4, 8, 24, and 48 h after the start of the reaction.

菱化成工業株式会社ダイヤイオン HP21, セパピーズ SP207, ダイヤイオン SA11A を使用した。それぞれの担体をつめたカラム (1.5×6 cm) を水で平衡化した後、反応液 1 ml を流し水で洗浄および溶出した。流速は 2 ml/分、溶出液を 10 ml ずつ分画し、各フラクションを TLC で分析した。薄層はメルク社のシリカゲル 60 アルミプレートを用い、酢酸エチル—酢酸—水 (3:1:1) で展開し、硫酸—メタノール (1:2) をスプレーした後 120–150°C に加熱しスポットを発色させた。その結果、トヨパール HW40EC を用いた場合がもっとも良好で、まずハイドロキノン配糖体とオリゴ糖が同時に水で溶出された後ハイドロキノンが溶出された。活性炭素およびダイヤイオン SA11A にはハイドロキノン、ハイドロキノン配糖体そしてオリゴ糖いずれも強く吸着した。酸やアルカリでどちらの担体からも上記成分は溶出されたが選択的に分離されなかった。その他の担体ではほとんどの成分が素通りした。

ハイドロキノンは遅れて溶出されたトヨパール HW40EC カラムを用い配糖体の部分精製を試みた。あらかじめ水で平衡化したトヨパール HW40EC カラム (5.2×25 cm) に多段仕込で調製した反応液 50 ml を流した。水で溶出し各フラクションの 283 nm の吸光度を測定すると共に TLC で分析した。クロマトグラムを Fig. 5 に示す。ピーク 1 を集め凍結乾燥した結果、35.5 g の淡褐色の粉末が得られた。HPLC の分析で同粉末には 2.47 g のハイドロキノン配糖体および 0.21 g のハイドロキノンが含まれていた。ハイドロキノンを基準とした同配糖体の回収率は 36.0% であった。

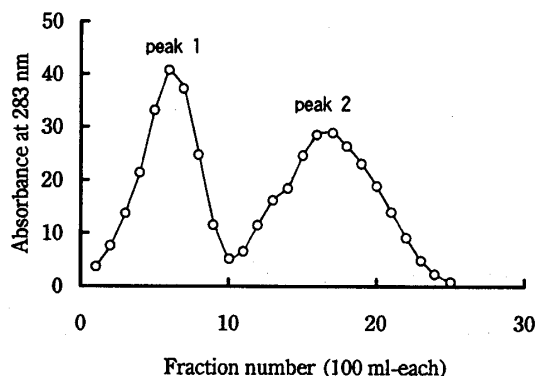


Fig. 5. Chromatography of hydroquinone-glycoside on Toyopearl HW40EC. The glycoside was eluted with water at a flow rate of 1500 ml/h.

多彩な生理機能が期待できるポリフェノール配糖体の製造法を確立する目的でハイドロキノン配糖体をモデルに合成法および精製法を検討した。その結果、オリゴ糖を含むハイドロキノン配糖体を回収率 36.0% で得ることができた。

多段仕込では長時間反応させても合成された配糖体の分解が見かけ上観察されなかった。これは GS アーゼによる配糖体の合成・分解反応の平衡が高濃度の基質によりほとんど合成反応へシフトしているためか、あるいは高濃度のオリゴ糖により配糖体の分解が拮抗的に抑えられているものと考えられる。

最終的に回収した配糖体はグルコシドとマルトシドとの混合物であるが、これは疎水結合性担体を用いて配糖体をオリゴ糖から分離した後、グルコアミラーゼで容易にマルトシドをグルコシドへ変換することができる。今後、配糖体を効率よく吸着し、しかもハイドロキノンと分離できる担体の選定が課題である。

要 約

配糖体合成酵素を用いポリフェノール配糖体の製造法を確立するためにハイドロキノン- α -グルコシドをモデルとして合成条件および部分精製条件を検討した。配糖体合成酵素 GS アーゼは *Bacillus macerans* 起源の CGT アーゼより効率よく配糖体を合成した。酵素濃度、pH および基質濃度を検討した結果、GS アーゼ 100 u/ml, pH 7 の条件でデキストリン S を多段仕込みした場合がもっとも合成効率が高く、反応開始後 48 時間で配糖体量は最高となった。一方、配糖体の部分精製条件を検討した結果、トヨパール HW40EC を担体とし水で溶出するカラムクロマトグラフィーで大部分の未反応のハイドロキノンを除去できた。配糖体の

対ハイドロキノン収率は36%であった。

本研究を遂行するにあたり、GSアーゼのスクリーニングなどにおいてご指導いただいた熊本工業大学応用微生物工学科村尾澤夫教授および新 隆志教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Bracke, M. E., Castronovo, V., Cauwenberge, R. M. L., Coopman, P., Vakaet, L., Strojny, P., Foidart, J. M., and Mareel, M. M.: *Experimental Cell Research*, **173**, 193-205 (1987).
- 2) 藤沼好守, 浅原智久, 秋保 暁, 鈴木裕美子, 市川秀之, 勝村芳雄: 公開特許公報 昭 60-56912 (1983).
- 3) Onodera, J., Takano, M., Kishi, Y., Yokoyama, N., and Ishida, R.: *Chemistry Letters*, p. 1487-1488 (1983).
- 4) Funayama, M., Nishino, T., Hirota, A., Murao, S., Takenishi, S., and Nakano, H.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1666-1669 (1993).
- 5) Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T., and Murao, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 817-821 (1994).
- 6) Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T., and Murao, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 143-144 (1995).