

糖の塩基反応について

～ 異性化による希少糖の生成法の模索と生成された物質の解析 ～

王 浩鷹 真田 陽平 花田 拓実 林 由彰
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

我々は自然界に極少量しか存在しない単糖である希少糖の安価な製造を目指し、メタノール液中でフルクトースと水酸化ナトリウムの反応を起こす方法を考案した。その結果、白色のゲル状またはシャーベット状の物質が生成した。この白色物質は、高温により褐色の液体に変化する、水酸化ナトリウムの濃度によって流動性が変化する等の性質を持っている。この白色物質の分析を行った結果、および構造の予想について説明する。

1. はじめに

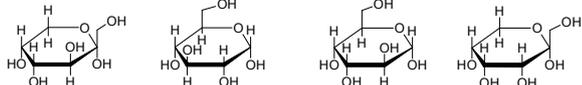
我々は平成 22 年度に神戸高校課題研究で行われた「糖から生成された褐色物質について—グルコース燃料電池の燃料液—」^[1]の研究の成果を引き継いで研究を進めている。先行研究で次のことが分かっている。還元性のある糖を強塩基性水溶液に溶かすと、糖と塩基の種類、触れている気体に関係なく発熱反応を起こし、褐色に変化する。生成した褐色物質は、遠心分離やろ過では取り出せない。また反応時の pH が高いほど生成される褐色物質の色は濃くなる。

我々はこの反応を「糖塩基反応」と呼ぶことにする。糖塩基反応は非常に複雑な反応で、異性化や分解、重合などの多様な反応が含まれていることが分かっている^[2]。この反応で希少糖が生成できると最近希少糖の価値が上がっていることから、我々は糖塩基反応を使い希少糖の生成を目指している。

2. 目的 1 糖塩基反応を使った希少糖の生成と分離の新しい方法を見つけること

2.1 糖塩基反応を使った希少糖の生成のメリット

希少糖とは自然界での存在量が極めて少ない単糖の総称であり、D-アロースやD-タガトースがある。



α -D-Fructopyranose α -D-Glucopyranose α -D-Altropyranose α -D-Psicopyranose

図 1 糖の構造式 (ハワース投影式で表記) 左から、フルクトース、グルコース、アルトロース、プシコース

しかし、我々の生活には、たくさん使われているものもある。ガムなどによく入っているキシリトールもその一例だ。そのために人工的に生成しなくてはならない。しかも近年、希少糖が持つ新たな可能性が発見され、今、希少糖は注目を浴び始めている。具体的には、摂取時に血糖値の上昇を抑える効果があるプシコースなどがあげられる^[3]。そのため希少

糖の需要が上昇している。

現在、希少糖の生成にはバイオテクノロジーが使われているが、酵素を用いるため生成にコストと時間がかかるのが欠点と言える。

そこで希少糖の生成ができ比較的反応速度が大きい糖塩基反応を使えば、早く希少糖を生成する方法を見出せるかもしれない。

そうすれば今後増え続ける希少糖の需要に応えるための供給力の手助けになるかもしれないと考え、我々はその方法を模索している。

2.2 仮説 i メタノール中で糖塩基反応を起こせば希少糖が析出し取り出すことができる。

我々は糖について調べているうちに、希少糖であるアロースとアルトロースはメタノールに溶けづらいことを知った^{[4][5]}。そこでフルクトースを使い、メタノール中で糖塩基反応を起こしたら、異性化して生成されたアロースとアルトロースなどの希少糖は、析出するのではないかと考えた。

2.2.1 検証方法

メタノール 25 mL (0.62 mol) にフルクトース 2.0 g (0.011 mol) を溶かした溶液とメタノール 25 mL (0.62 mol) に水酸化ナトリウム 4.0 g (0.10 mol) を溶かした溶液を室温 (約 25 °C) で混ぜる。

2.2.2 結果

混ぜた瞬間、白色ゲル状の物質が生成した。この物質に、攪拌や薬さじで白色物質が入っているビーカーを軽くたたくなどの衝撃を与えてみると、透明な液体が染み出し、シャーベット状に変化した。

これを常温で 30 分放置した場合、白色の状態から褐色化が始まり、約三日で全体が泥状の褐色物質に変化した。攪拌しながら 50 °C に保った場合は、約 10 分で全体が白色の状態から薄い褐色の液体と濃い褐色の沈殿物になった。

また、実験時の水酸化ナトリウムの濃度が高いほど、できた白い物質の流動性は失われていく。

2.2.3 考察

白色物質はフルクトース以外のヘキソース(六個の炭素原子をもつ単糖)を含んでいないと推測される。なぜなら糖の塩基異性化にはある程度の時間が必要である^[2]のに対し、白色物質は混ぜた瞬間生成されたことから、異性化は起こっていないと考えられるからである。

そして、放置していると褐色化した原因は、メタノールに溶けていたフルクトースが糖塩基反応を起こしたからと考えられる。なぜなら褐色化する点と温度が高いほど反応速度が大きい点、還元糖が塩基条件中である点が糖塩基反応と類似しているからである。常温で放置していた方が泥状になったのは、時間経過によりメタノールがほぼ蒸発したからと推察される。

次に、我々は白色物質の生成過程を調べ、目的の希少糖だけを析出させるため、フルクトースが析出しない方法を模索し始めた。なぜなら液体に溶けている一部のフルクトースが異性化し、アロースやアルトロースなどが生成したとしても、フルクトースがすでに大量に析出した場合、それらの分離が難しいからである。

3. 目的 2 白色物質の解明

3.1 仮説 ii 白色物質はフルクトースのみでできている。

白色物質の正体を解明するため、その成分を調べることにした。

3.1.1 検証方法①

薄層クロマトグラフィ (TLC) により、白色物質にマンノース、グルコース、フルクトースが含まれているかを分析した。プレートは Whatman の Partisil K6F 5×20 cm である。展開溶媒は A (クロロホルム：メタノール：水=30:20:4, v/v/v) , B (クロロホルム：メタノール：水=30:15:3, v/v/v)^[6] の二種を用い、それぞれ三重展開を行った。呈色液はエタノール：硫酸：アニスアルデヒド=18:1:1, v/v/v を用い、噴霧後 10 分間加熱した。

3.1.2 結果

溶媒 A	Rf 値	溶媒 B	Rf 値
mannose	0.545	mannose	0.375
glucose	0.495	glucose	0.353
fructose	0.581	fructose	0.426
白色物質	0.592	白色物質	0.418

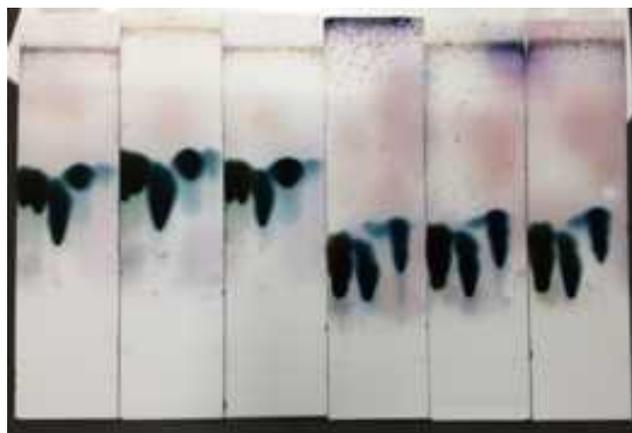


図2 TLCの結果

左側の三枚は溶媒 A、右側の三枚は溶媒 B のもの。また、左側三枚のスポットは左からマンノース、グルコース、フルクトース、白色物質、右側三枚のスポットは左からマンノース、グルコース、白色物質、フルクトースである。

3.1.3 検証方法②

高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により、7 種のサンプル (後に示す) を分析する。HPLC は島津製作所の LC-20AT、展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水=30:20:4, v/v/v、カラムはジーエルサイエンスの Inertsil NH2 5 μ m 4.6×250 mm、試料の検出には 254 nm の紫外線の吸光度を用いた。

3.1.4 結果

試料	保持時間 (min.)	ピークの高さ	ピークの面積
A	1.949	3195	20638
B	1.953	*	*
C	1.953	3228	20785
D	2.026	100841	940839
E	1.96	13113	87069
F	1.969	13790	90427
G	1.967	6724	44442

A: 白色物質, B: フルクトース, C: A+B, D: プシコース

E: マンノース, F: グルコース, G: ガラクトース

それぞれ、溶質 0.015 g + 溶媒 1 mL の割合

* 微小値のため測定不能

3.1.5 考察

白色物質は異性化反応を起こしておらず、フルクトースである可能性が高い。なぜなら、方法①、方法②について、移動量、保持時間がそれぞれサンプルのヘキソースの中でフルクトースに最も近いためである。特に、方法①において、フルクトースのスポットが濃く大きかったため白色物質との Rf 値に差が生じているが、白色物質のスポットはマンノース、グルコースのスポットよりも明らかに移動量が

大きく、フルクトースのスポットの縦幅におさまっていることが根拠として挙げられる。しかし、方法②において白色物質のピークの高さ（紫外線の吸光度を示す）は、フルクトースのピークの高さよりも明らかに大きい。これは生成から分析するまでに24時間以上経過していたので、白色物質の一部が塩基反応を起こしていたからだと考えられる。

3.2 仮説iii 白色物質がメタノール液中で褐色の液体になるのは、糖塩基反応によるものであり、液中には異性化した単糖が含まれる。また、この液に生じる沈殿物は、単糖がメタノールに溶けきれず析出したものである。

純水中で行った糖の塩基反応で生成した褐色物質と、白色物質が褐色化した液体とその沈殿物に、それぞれ含まれる糖類を調べた。

3.2.1 検証方法

HPLCにより、次の三種のサンプルを分析した。

HPLC、展開液、カラムは3.1.3と同じ条件である。

サンプル一覧

A：純水 30 mL に水酸化ナトリウム 4.0 g とフルクトース 3.0 g を溶かして 24 時間以上放置して褐色化させた液 0.006 g

B：メタノール 50 mL に水酸化ナトリウム 4.0 g とフルクトース 3.0 g を溶かして加熱し、白色物質を褐色化させた上澄み液 0.008 g

C：Bの底に生じた沈殿物 0.025 g

*それぞれ展開溶媒 1 mL 中に溶かしたもの

3.2.2 結果

試料	保持時間 (min.)	ピークの高さ	ピークの面積
A	1.969	57259	368983
B	1.959	13285	90454 (93.6%)
	2.294	463	4388 (4.54%)
	3.491	206	1833 (1.90%)
total		13954	96675 (100%)
C	1.974	28391	194240 (95.9%)
	2.332	411	4151 (2.05%)
	2.812	98	1275 (0.630%)
	3.564	287	2809 (1.39%)
total		29187	202475 (100%)

*四捨五入により割合を足しても 100 % にならない

3.2.3 考察

3.1.4 の表において、すべてのサンプルの保持時間が約 2 分であることから分かる通り、今回の条件では単糖の十分な分離条件を得ることができな

かったが、A, B, C ともフルクトースが他の単糖に異性化する現象が起きている可能性が高いと考えられる。なぜなら、3.1.2 におけるすべてのヘキソースのピークに近い約 2 分に、A, B, C それぞれが大きなピークを持つが、フルクトースのピークの高さのごく小さいはずで、これらのピークがフルクトースによるものとは考えにくいからである。ゆえに、A, B, C それぞれの約 2 分のピークは、紫外線に対してより大きい吸光度を示すフルクトース以外のヘキソースによるものであると考えられる。

次に、沈殿物についてであるが、上澄み液よりも、単糖と思われる物質を多く含んでいると考えられる。なぜなら、約 2 分のピークの面積（濃度を示す）が各ピーク面積の合計に占める割合が、B よりも C のほうが大きいためである。しかし、その差はわずかであり、単糖以外の物質とみられるピークも含まれているため、さらなる検証が必要である。

3.3 仮説iv 水酸化ナトリウムの濃度を変えると白色物質は生成されないと仮説

メタノール中での糖塩基反応で、目的の希少糖だけを析出させるため、フルクトースを析出させたくない。そのためには白色物質が生成しない条件を調べないといけない。よって白色物質の生成に必ず関与されていると思われる水酸化ナトリウムの濃度を変えて調べた。

3.3.1 検証方法

メタノール 25 mL (0.62 mol) にフルクトース 2.0 g (0.01 mol) を溶かした溶液とメタノール 25 mL に水酸化ナトリウム 1.0 g, 2.0 g, 3.0 g, 4.0 g (0.03 mol, 0.05 mol, 0.08 mol, 0.10 mol) を溶かした溶液を室温 (約 25 °C) で混ぜる。

3.3.2 結果

水酸化ナトリウム 1.0 g の場合はシャーベット状になり、水酸化ナトリウム 2.0 g, 3.0 g, 4.0 g の場合はゲル状になった。

3.3.3 考察

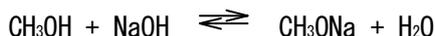
白い物質は実験時の水酸化ナトリウムの濃度が高いほど流動性は失われていく。

この継続実験として水酸化ナトリウムが何 g のとき、白色物質が生成しないかを調べ、その条件で糖塩基反応は行われるかどうかを検証していきたい。

4. 白色ゲル状物質に関する考察

白い物質の構造の仮説として、糖類は金属イオンと配位結合しやすいこと^[6]から、次のようなことが考えられる。

水酸化ナトリウムをメタノールに混ぜたとき、次の平衡反応になる。



フルクトース-メタノール溶液と水酸化ナトリウム-メタノール溶液を混ぜた時、フルクトースのヒドロキシ基が一部電離し次の平衡反応になる。



その結果、フルクトースやメタノールにある O がナトリウムイオンに配位結合したり、ナトリウムイオンと酸素イオンが引き付け合ったりして、図のような三次元網目構造になると推測される。これが周りの液体を包んでいき、ゲル状またはシャーベット状になったと考えられる。

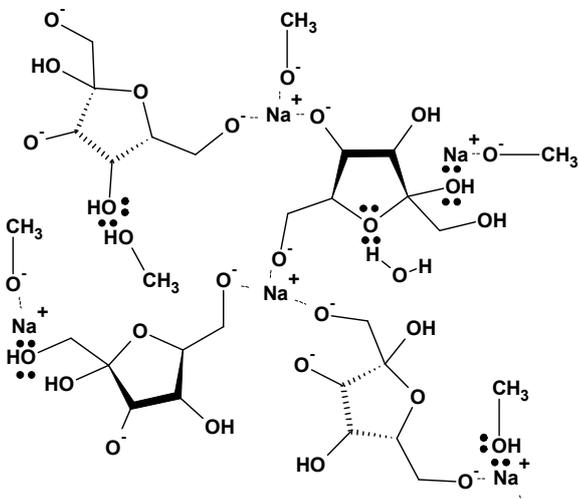


図3 白色物質の予想構造図

ナトリウムイオンがフルクトースをつないでいき、三次元網目構造をつくっている。

我々は今後、神戸高等学校の自然科学研究会化学班の活動として、白色物質中のフルクトースと水酸化ナトリウムの割合を調べ、それがこの仮説の構造にあり得るのかを確かめたい。

5. まとめ

目的である希少糖の生成はしていると考えられるが、それらの分離にはまだ至っていない。我々が考案した、フルクトース-メタノール溶液と水酸化ナトリウム-メタノール溶液を混ぜ合わせる方法を行ったところ、白いゲル状またはシャーベット状の物質が生成した。この白色物質は、フルクトースである可能性が高い。ただし、時間がたてば異性化しているようだ。また、白色物質が褐色化した液体には、異性化した単糖が含まれる可能性が高いが、詳しい

組成は未解明である。この白色物質の生成を防げれば、希少糖のアロースとアルトロースなどの分離ができるかもしれない。

6. 今後の課題

3.1.5 で述べた異性化を実証するため、旋光計を用いてフルクトースと白色物質の旋光度を調べたい。また、今回の HPLC では単糖の良好な分離条件を得ることができなかったため、カラムを単糖の分析に向けたものに変えて行いたい。

次に、生成した希少糖だけを分離するために、白い物質、つまりフルクトースが析出するのを防ぐ工夫を考えていきたい。なぜなら実験2の目的を達成させるには、フルクトースはメタノール中に溶けていないと、フルクトース以外のヘキソースが分離されないからである。

7. 謝辞

研究方針において貴重な助言をいただいた、香川大学希少糖研究センター・香川大学教授の何森健先生、HPLC によるサンプル分析においてご指導いただいた兵庫県立三田祥雲館高等学校の長尾浩平教諭、TLC についてご教示いただいた神戸高専の下村憲司准教授に御礼を申し上げます。そして、熱心にご指導いただいた本校教諭中澤克行先生に心からの感謝の意を表します。

8. 参考文献

- [1] 渋谷英太郎ら, 糖から生成された褐色物質について - グルコース燃料電池の燃料液 -, 神戸高校課題研究発表会論文集, (2011)
- [2] 何森健先生の助言から
- [3] 松尾達博, ラットにおける D-プシコースの血糖値上昇抑制作用, 日本栄養食糧学会誌, Vol. 59, No. 2, P119-121, (2006)
- [4] 国立大学法人 香川大学ほか, D-アロースの生理活性作用の利用への使用, 特許電子図書館, (2010)
- [5] <http://www.eng.kagawa-u.ac.jp/~tishii/rar-esugar/Altrose.html> (2014.1.25 現在)
- [6] 吉田裕美, 神鳥成弘, X 線構造による希少糖生産酵素の単糖異性化反応機構の解析, 生化学, 81 巻 9 号, P811~815, (2009)
- [7] 山崎光廣ら, 薄層クロマトグラフィーによる糖質の分離挙動と食品試料への応用, 分析化学, 37 巻 11 号, T121~127, (1988)