

シクロデキストリンの調製と単離について

竹尾 健一, 近藤陽太郎, 久下 喬

KEN'ICHI TAKEO, YÔTARO KONDO and TAKASHI KUGE:
The preparation and isolation of cyclodextrins

要旨: *Bacillus macerans* IFO No. 3490 を用いてシクロデキストリンの調製を行なった。個々のシクロデキストリンの生成比は用いる酵素量によって著しく影響されることが明らかになった。又個々のシクロデキストリンの単離法として、水に対する各シクロデキストリンの溶解度の相違を従来用いられている複合体試薬による分離法に併用するのが有効であることが分った。

I. 緒 言

シクロデキストリン (シャードンガーデキストリン, シクロアミロース) は澱粉に *Bacillus macerans* amylase を作用させて得られる同族オリゴ糖で, 6, 7ないし8個のグルコース残基が環状に α -1, 4結合したもので, それぞれ α -, β -, 及び γ -シクロデキストリンと呼ばれている。このシクロデキストリンは数多くの有機及び無機化合物と包接化合物を作ることが知られており French¹⁾ 及び Cramer ら²⁾ によって多くの興味ある知見が得られている。又最近シクロデキストリンの触媒作用を酵素反応のモデルとして用いる研究が, Bender ら^{3), 4), 5)} によって活発に行なわれている。著者らはここ数年来, 澱粉質物質特に澱粉の直鎖成分であるアミロースと有機化合物との複合体の生成機構をガスクロマトグラフ法^{6), 7), 8), 9)}, 水溶液中での複合体生成¹⁰⁾, X線回折^{11), 12)} 等によって検討する一方, アミロース複合体の生成機構や結晶構造を考えるために, アミロースらせん一巻のモデルとしてシクロデキストリンを用いて, ポーラログラフ法¹³⁾, X線回折^{11), 14), 15)}, NMR¹⁶⁾ 等によって一連の研究を行ってきた。

シクロデキストリンの調製法については French ら^{17), 18)} 及び Cramer ら¹⁹⁾ の方法があるが, 用いられている菌株が異なる上に, 複合体試薬による選択的沈澱法を用いた単離操作が繁雑である。又我国では河野ら²⁰⁾ の改良法が報告されているが γ -シクロデキストリンの単離についての記載がない。

そこで実験室的に容易に比較的多量のシクロデキストリンを得るために, 財団法人醸酵研究所から恵与された *Bacillus macerans* IFO No. 3490 を用いてシ

クロデキストリンの調製法を検討した。著者らは α -, β -, γ - の各デキストリンは水に対する溶解度が非常に異なる点に着目して, 各シクロデキストリンの水に対する溶解度の相違と複合体試薬による選択的沈澱を併用する単離法によって容易に収量良く個々のデキストリンを得ることが出来たのでその結果について報告する。

II. 実験方法及び結果

馬鈴薯 5g をすりつぶし 5ml の水と共に試験管に入れ綿栓をして滅菌, 冷却後 *Bacillus macerans* IFO No. 3490 を接種し, 38°C で1週間前培養した。

酵素液の調製には数個の 2l 三角フラスコに交換水 500 ml と馬鈴薯をホモゲナイザーですりつぶしガーゼで濾過した濾液 500 ml を入れ, これに馬鈴薯澱粉 30g をとかし, 炭酸カルシウム 20g を加え, 綿栓をして 120°C で1時間滅菌した。冷却後前培養した溶液 3ml を加え, 38°C に10日間ないし2週間時々振とうして放置した。溶液は時間の経過と共に粘性のない褐色溶液になった。培養液を 4,000 rpm で遠心分離して得られる透明液を希酢酸で pH 5.7 に調節し, 冷蔵庫に保存して酵素液として用いた。酵素力価は Tilden ら²¹⁾ のヨウ素複合体を顕微鏡で観察する方法で測定した。上記酵素液は約 1~2 unit/cc の力価を有する。ここで 1 unit は 1 ml の 3% 澱粉溶液を 40°C, 30 分間で Tilden-Hudson の終点²¹⁾迄変化させるに必要な酵素量である。

2) シクロデキストリンの調製

個々のデキストリンの調製に最適の酵素濃度を決定するために, 各デキストリンの収率に及ぼす同一時間

での反応における酵素濃度の影響を調べた。5個の3l 三角フラスコにそれぞれ1.4lの交換水を入れ、外部から80~90°Cに加熱する。これにマグネチックスターラーで激しく攪拌しながら100mlの交換水中に45gの馬鈴薯澱粉(水分含量, 17.5%)を分散させたものを加えて3%の透明液とした。この時澱粉がゲル状に固まらないように注意する必要がある。

ついで120°C, 1時間オートクレーブで加圧し, 50°C迄冷却し3mlの酵素液を加えると溶液は粘性を失いマグネチックスターラーで攪拌可能となり, 又同時に澱粉の老化を防止することが出来る。*B. macerans* amylaseの至適pHは約5.0~6.0²¹⁾とされているが交換水を用いればオートクレーブにかけた後の溶液は約pH 5.7で特にpHの調節を必要としない。溶液が40°C

表1. シクロデキストリンの収量に及ぼす酵素濃度の影響^{a)}

酵 素 量 (Units)	40	80	160	240	400
Conversion periods ^{b)}	3	6	12	18	30
α -シクロデキストリン・テトラクロロエタン複合体 (g)	14.5	16.1	14.0	12.5	10.1
α -シクロデキストリン・テトラクロロエタン複合体の収量 (%) ^{c)}	39.1	43.4	37.8	33.7	27.2
β -シクロデキストリン+ β -及び γ -シクロデキストリン・ブロムベンゼン複合体 (g)	2.8	4.0	6.6	8.6	12.3
β -シクロデキストリン+ β -及び γ -シクロデキストリン・ブロムベンゼン複合体の収量 (%) ^{c)}	7.6	10.8	17.8	23.2	33.2
得られたシクロデキストリン及びその複合体の全量 (g)	17.3	20.1	20.6	21.1	22.4
得られたシクロデキストリン及びその複合体の収量 (%) ^{c)}	46.7	54.2	55.5	56.9	60.4

a) いずれも基質には局方馬鈴薯澱粉 45g (水分含量17.5%)を用いた。

b) Conversion period については Tilden の文献²¹⁾参照。

c) 乾燥澱粉を基にして計算した。

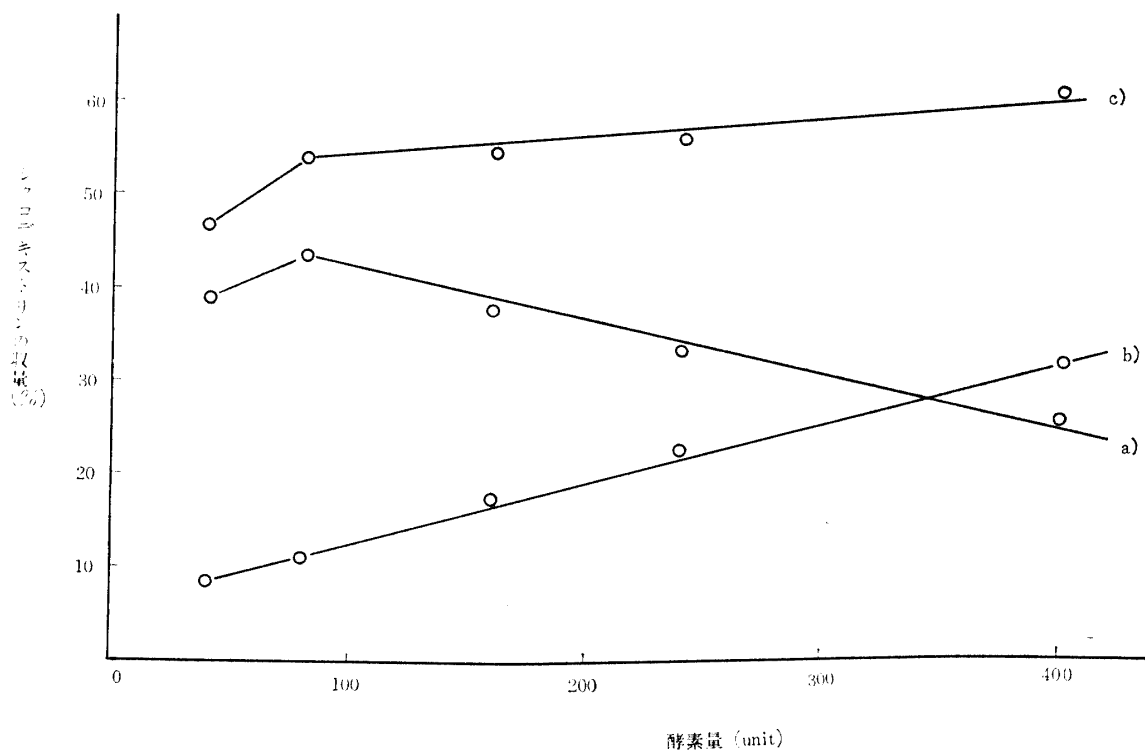


図1 シクロデキストリンの収量に及ぼす酵素濃度の影響

(a) α -シクロデキストリン・テトラクロロエタン複合体

(b) β -シクロデキストリン+ β -及び γ -シクロデキストリン・ブロムベンゼン複合体

(c) 得られたシクロデキストリン及びその複合体の全量

になった時、攪拌しながらそれぞれ40, 80, 160, 240, 400 unit の酵素液を加え、時々振とうして 38°C に 48時間放置した。次いで沸騰水中に30分間放置して酵素を失活させ図2に示す単離法でそれぞれ α-デキストリンを 1, 1, 2, 2-テトラクロロエタン複合体とし

て、β-デキストリンを結晶として、又溶液中に残存する β- 及び γ-デキストリンをブロムベンゼン複合体として単離し、それぞれのデキストリンの収量の目安とした。その結果を表1及び図1に示す。

表1及び図1から明らかなように、基質に対して酵

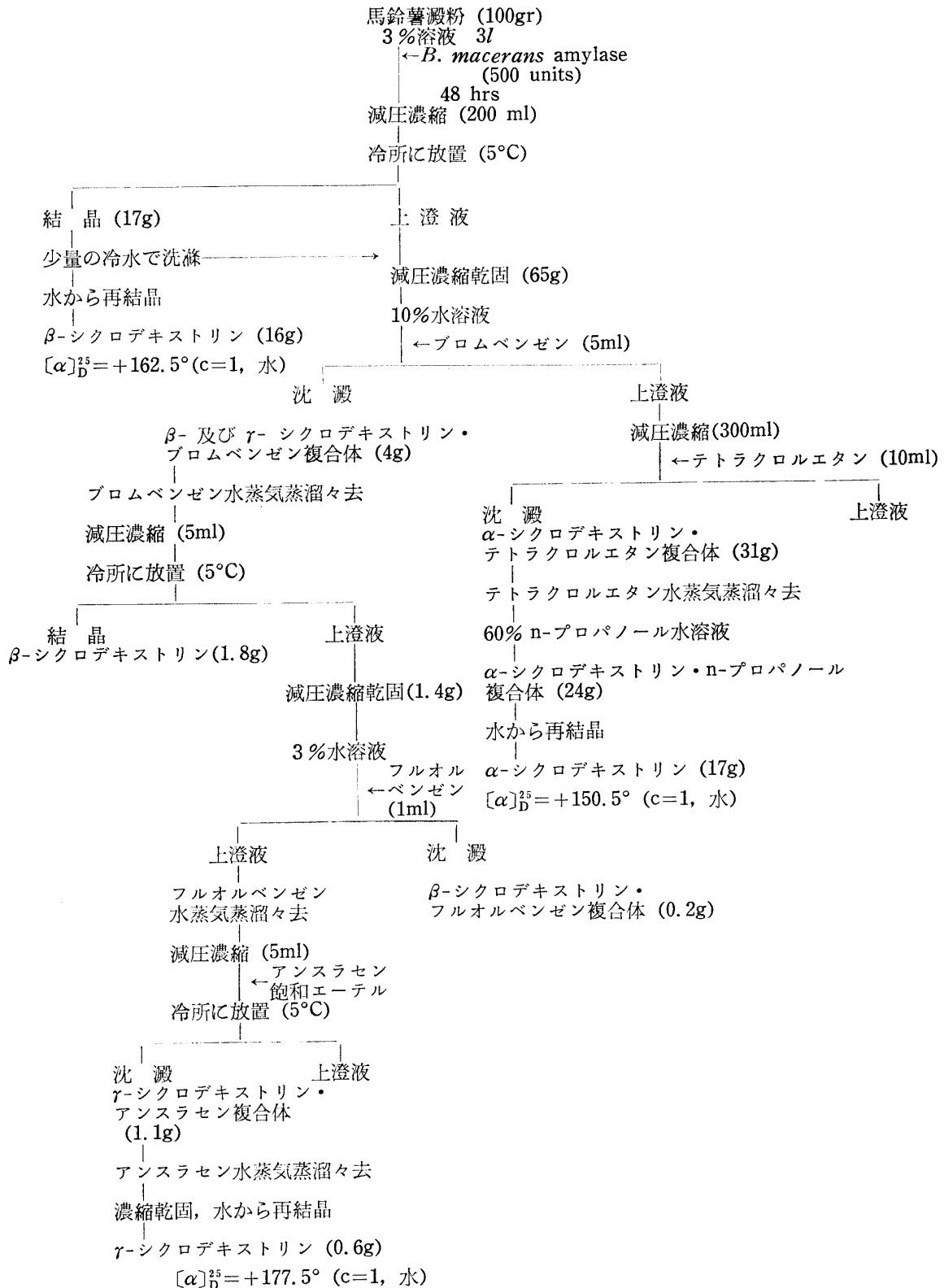


図2. シクロデキストリンの単離法

素濃度を変えた場合全体として得られるデキストリンの量は酵素量の増加と共にごくわずかの増加が認められるだけである。これは *Bacillus macerans* の酵素液中には澱粉からトランスグルコシダーションによってシクロデキストリンを生成する *B. macerans* amylase とシクロデキストリンを分解して直鎖のオリゴ糖を生成するシクロデキストリナーゼが含まれており²²⁾、この反応は可逆的であるので澱粉消化液中におけるシクロデキストリンの濃度がある一定量になるとシクロデキストリンの生成、切断の反応が平衡に達するためと考えられる。しかし α -、 β - 及び γ -シクロデキストリンの生成比は酵素濃度によって著しく異なっており、 α -デキストリンの生成は酵素量の少ない時に最高に達し酵素量の増加と共に次第に減少し、逆に β - 及び γ -デキストリンの生成量は酵素量の増加と共に増加している。又個々のデキストリンの生成を著者らの薄層クロマトグラフィーによる方法²³⁾で追跡して行くと γ -デキストリンは反応の初期の段階では殆んど検出されず、反応の後期に至り検出される。従って α -デキストリンを多く得ることを目的とする場合には用いる酵素量を少なくし、 β - 及び γ -デキストリンを多く得るためには用いる酵素量を多くすれば良いことが分かる。

3) シクロデキストリンの単離

シクロデキストリンの単離法として従来用いられている方法^{17), 18), 19), 20)} はデキストリン分子の空洞の直径が α -、 β -、 γ -デキストリンでそれぞれ 6, 8, 10Å 程度^{11), 14), 15)} と異なっていて、ある適当な大きさの有機化合物を選択的にその空洞内に取り込んで水溶液中から沈澱してくる性質を利用したものである。しかしこのデキストリンを水溶液中から複合体として沈澱させる場合には、水溶液中のデキストリンの濃度をかなり厳密に規定しなければならない。即ち一般に個々のデキストリンの分離に用いられている複合体試薬は個々のデキストリンとのみ選択的に複合体を形成すると考えられがちであるが、これはあくまでも水溶液中でのデキストリンの濃度を 2~3% 程度の比較的希薄溶液とした場合のことでありデキストリン濃度が高くなれば α -、 β -、及び γ -デキストリンは殆んど全ての複合体試薬と複合体を形成して沈澱するために分別には不都合となる。従って澱粉の酵素消化液から個々のデキストリンを複合体として選択的沈澱法によってのみ単離するためには厳密に濃度を規定する必要があり再度の濃縮と希釈を繰返さねばならずやや多量の調製には不便である。

一方デキストリンの水に対する溶解度は α -、 β -、 γ -デキストリンでそれぞれ 16.0, 1.8, 22.0g/100ml

と²⁴⁾大きな相違がある。そこで著者らは β -デキストリンだけが特に水に難溶性であり結晶性が良いことを利用し先ず澱粉の酵素消化液を濃縮して冷所に放置し β -デキストリンのみを殆んど完全に結晶化させ、その後上澄液から複合体試薬との選択的沈澱法によって α -、 γ -デキストリンの単離を行なうことによって図 2 にその一例を示すように個々のデキストリンを完全に純粋に収量良く単離することが出来た。尚図 2 における個々のデキストリンの単離の過程は薄層クロマトグラフィーによる²³⁾方法で調べ、最終的な個々のデキストリンの純度は旋光度²⁴⁾により決定した。

文 献

- 1) French, D. (1957) : *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **12** : 189.
- 2) Cramer, F. and H. Hettler (1967) : *Naturwissenschaften*, **54** : 625.
- 3) VanEtten, R. L., G. A. Clowes, J. F. Sebastian and M.L. Bender (1967) : *J. Am. Chem. Soc.* **89** : 3242.
- 4) VanEtten, R. L., G. A. Clowes, J. F. Sebastian and M. L. Bender (1967) : *J. Am. Chem. Soc.* **89** : 3252.
- 5) Vanderjagt, L., F. L. Killian and M. L. Bender (1970) : *J. Am. Chem. Soc.* **92** : 1016.
- 6) Kuge, T. and K. Takeo (1967) : *Agr. Biol. Chem.* **31** : 257.
- 7) Kuge, T. and K. Takeo (1968) : *Agr. Biol. Chem.* **32** : 753.
- 8) 久下, 竹尾, 藤村 (1968) : 第21回コロイド及び界面化学討論会講演要旨集, p. 83.
- 9) 久下 (1969) : *澱粉工誌* **16** : 12.
- 10) Kuge, T. and K. Takeo (1968) : *Agr. Biol. Chem.* **32** : 1232.
- 11) Takeo, K. and T. Kuge (1969) : *Agr. Biol. Chem.* **33** : 1174.
- 12) Takeo, K. and T. Kuge (1971) : *Agr. Biol. Chem.* **35** : No. 4, in press.
- 13) 久下, 竹尾 (1968) : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 25.
- 14) Takeo, K. and T. Kuge (1970) : *Agr. Biol. Chem.* **34** : 568.
- 15) Takeo, K. and T. Kuge (1970) : *Agr. Biol. Chem.* **34** : No. 12, in press.
- 16) Takeo, K. and T. Kuge (1970) : *Agr. Biol. Chem.* **34** : 1416.

- 17) French, D., M. L. Levine, J. H. Pazur and E. Norberg (1949) : J. Am. Chem. Soc. **71** : 353.
- 18) French, D., A. O. Pulley and W. J. Whelan (1963) : Die Stärke, **15** : 280.
- 19) Cramer, F. and F.M. Henglein (1958) : Chem. Ber. **91** : 308.
- 20) 河野, 二国 (1960) : 澱粉工誌, **9** : 23.
- 21) Tilden, E.B. and C.S. Hudson, (1942): J. Bact. **43** : 527.
- 22) Depinto, J.A. and L.L. Campbell.(1964): Science **146** : 1064.
- 23) Takeo, K, Y. Kondo and T. Kuge (1970): Agr. Biol. Chem. **34** : 954.
- 24) Thoma, J.A. and L. Stewart (1965) : Starch ; Chemistry and Technology, Vol 1. p.209. Academic Press., New York.

Summary

The cyclodextrins were prepared from potato starch by the action of *Bacillus macerans* (IFO No. 3490) amylase. It was found that the ratio of the yields of the individual dextrans obtained is governed by the varying amounts of enzyme added. The combined use of the differences in

solubility of the individual dextrans in water and selective precipitation with organic molecules greatly simplified the procedure of the isolation of the dextrans hitherto employed so that the dextrans can be more readily available in both quantity and purity.