

Cyclodextrine의 酵素的 生成에 기치는 Addukt 形成物質의 影響

李 吉 相

Kil Sang Lee* Über die Einfluss der Adduktbildungs-Substanz
in der Bildung des Cyclodextrin mit Enzymlösung

(*College of science and Engineering, Yonsei University)

要 約

澱粉液은 Bac. macerans로 分解시킬 때 Cyclodextrin이 形成되는 것은 Schardinger, Freudenberg 等に 發見된 事實이었으나 아직도 그 正確한 生成量에 對한 定量的인 調査는 되어있지 않으므로 著者는 本研究를 通하여 α -, β -, γ -Dextrin의 定量法을 paper-chromatography 法으로 確立시켰다. 또한 이때 客分子와 主分子의 包圍化合物의 顯微鏡寫眞에 依한 結晶形成모양과 同時에 그 母液中에 있는 Cyclodextrin의 含量等으로 Cyclodextrin의 包圍性을 證明하는 實驗과 이러한 事實에 基因하여, Enzyme 液으로 Cyclodextrin이 生成되어 나올 때 그 生成率의 變化를 調査한 結果 Cyclohexan을 添加해 줄 때 그 生成率이 가장 良好해지는 것을 보았다. 또한 本研究를 通하여 α -Dextrin을 Enzyme 과 共同作用시키면 β -Dextrin이 形成되어 지는데, 客分子의 添加로 그 β -Dextrin의 生成量이 增加해지며 이때 Glucose를 加해주면 그 反應이 促進되어 여기에 하나의 觸媒的인 作用을 하는 것으로 본다. 이것은 澱粉이 酵素로써 分解될 때 直鎖의 Dextrin이 생긴 다음 이것이 Glucosyl 基 轉移反應의 反覆으로써 Cyclodextrin이 形成되는 것을 立證하는 것인데 Glucosyl 基의 供與體로써 Glucose 및 Maltose를 使用하였을 때 이와 같은 事實이 促進되는 것을 볼 수 있다. 그러나 이와 같은 觸媒의 役割에도 不拘하고 β -Dextrin을 Enzyme 과 共同作用시켜도 α -Dextrin이 形成되지 않는 것을 보아 α -Dextrin과 β -Dextrin의 相互變化에 對해서 우리는 α -Dextrin에서 β -Dextrin으로는 變化할 수 있으나 β -Dextrin으로부터 α -Dextrin으로는 變化가 進行되지 않는 것으로 본다.

全般的으로 本研究를 通하여 澱粉液을 Bac. macerans로 分解시킬 때 時間의 經過를 따라 生成되어지는 Cyclodextrin의 含量의 變化를 追跡하여 4時間前後에서 最高量이 되는 것을 볼 수 있으며 同時에 包圍化合物을 形成시킬 수 있을 때는 그 生成率이 큰 影響을 이룰 수 있는 것을 指摘할 수 있다.

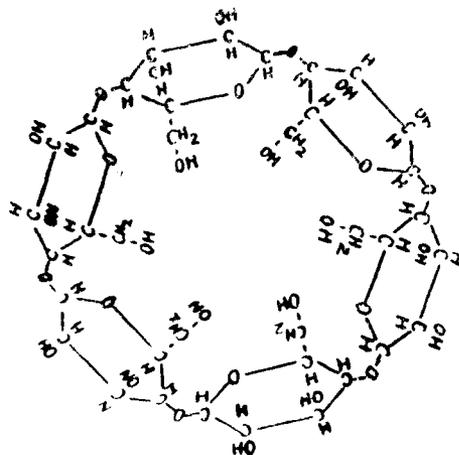
(Received December 2, 1961)

Einleitung

Beim Abbau der Stärke mit der Amylase des Bacillus macerans erhält man gut kristallisierende Oligosaccharide. Von Schardinger(1) und Freudenberg(2) wurde die α , β , γ -Dextrin entdeckt. Die Konstitution dieser Stoffe wurde von Freudenberg(3) aufklärt. Bei den Cyclodextrinen handelt es sich um Ringe aus Glucoseresten, die durch Maltosebindung verknüpft sind(4). Man konnte längst die Molekulargewicht nicht messen, aber neuerdings hat es klar geworden durch die Röntgenographie(5) und Kryoskopie(6), dass die Cyclodextrinen folgende Molekulaegewicht haben.

- α -Dextrin.....6 Glucose Einheit.
- β -Dextrin.....7 Glucose Einheit
- γ -Dextrin.....8 Glucose Einheit.

Diese α -Dextrin, z.B. wird mit folgendem schematischem Bild zeichnen.



Der 6-Ring(= α -Dextrin, Cyclohexaglucan) mit einem Kanaldurchmesser von 6 A(7) vermag nur kleinere Molekeln bis zur Grösse einer räumlich nur wenig substituierten Benzolkernes einzulagern. Der 7-Ring(= β -Dextrin, Cycloheptaglucan, Hohlraumdurchmesser 7.5 A(7)) bildet Einschlussverbindungen auch noch mit Naphthalin-Derivaten, der 8-Ring(= γ -Dextrin, Cyclooctaglucan, Hohlraumdurchmesser 9-10 A) neigt nur noch wenig zur Bildung von Einschlussverbindungen: sein Hohlraum ist für die meisten organischen Verbindungen schon zu gross.

Die Cyclodextrine zeigen die Fähigkeit, mit zahlreichen organischen Stoffen zu unlöslichen Additionsverbindungen zusammenzutreten. Diese Eigenschaft ist um so merkwürdiger, als gerade besonders lipophile Moleküle mit den hydrophilen Dextrinen zu unlöslichen Addukten zusammentreten. Hier möchten wir die Einfluss der Einschlussverbindungen über die Menge der Cyclodextrin beim Abbau der Stärke durch Bas. macerans untersuchen. Da die Menge der Cyclodextrines, die beim Abbau der Stärke sich bilden, sehr wenig ist, versuchten wir durch Papier-chromatographischen Methode.

Experimenteller Teil und Diskussion

1. Die Präparation der Substanz

Die Herstellung der Stärkelösung und der reine Cyclodextrine.

Da die Natur-Stärke meistens sehr wenige Menge der Glucose und Maltose enthält, muss man zum erstenmal die solche Zucker dadurch entfernen lassen, dass 5 g Stärke in 500 cc Wasser 2 Std. am W.B. auf 50°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird abzentrifugiert und ausgetrocknet, dann pulverisieren. Nach 3% Stärkelösung mit diese ausgepulvierte Stärke gemacht hat, wird es unter 1.5 Atm. Ca. 1 Std. auf 120°C gekocht.

Nach Cramer und Henglein(8) haben wir reine α, β, γ -Dextrin aus der Stärkelösung mit Bac. macerans genommen.

2. Die Bestimmung der Cyclodextrine mit Papier-chromatographie

A. Des Lösungsmittel

Die bisher in der Zucker-chromatographie verwendeten Lösungsmittel wurden geprüft und nicht brauchbar befunden, da die Rf-Werte sehr niedrig sind. Aber hier haben wir ein gutes Lösungsmittel finden können. Seine Zusammensetzung war folgende

Butanol: Dimethylformamid: Wasser=2 : 1 : 1

Rf-Werte:

α -Dextrin.....0.41

β -Dextrin.....0.36

γ -Dextrin.....0.31

Wenn wir Pyridin brauchen statt der Dimethylformamid, ist die Rf-Werte der -Dextrin etwas grösser. So haben wir das folgende Lösungsmittel gebracht.

Pyridin: Isobutanol: Wasser=1 : 1 : 1

Rf-Werte:

α -Dextrin.....0.414

β -Dextrin.....0.40

γ -Dextrin.....0.32

B. Das Papier

2045 b(West-Deutschland)

C. Die Methode

Wir haben das Papier immer mit aufsteigende Methode 11 Std. auf 5°C laufen lassen.

D. Die Entwickler

a) Für α -Dextrin

Die bekannte Jodadduktbildung des α -Dextrins kann ohne Schwierigkeiten auf dem Papier bilden lassen. Da sich die Adduktbildung in reinem Alkohol verständlicherweise nicht vollzieht, ist ein gewisser Wassergehalt notwendig. Als gutes Nachweisreagenz wurde eine 1%ige Jodlösung in 85%igem

Äthanol ermittelt, die beim Besprühen einen tief violetten Fleck erzeugt. Mit diesen Reagenz erzeugt das α -Dextrin einen brauner gelben Fleck, aber nichts mit dem β, γ -Dextrin.

b) Für β, γ -Dextrin

Das Kristallviolett ist günstigste für Entwickler der β, γ -Dextrine. Nach dem Besprühen des Chromatogramms mit einer 0.01% igen alkoholischen Lösung des Kristallviolett wird der Untergrund violett, während die Zone des β -Dextrins einen blauen und die des γ -Dextrins einen roten Farben annimmt.

E. Quantitative Methode.

Wir haben die Flecke des unseren Chromatogramms nach Fischer's Methode(9) gemessen. Zum Erst haben wir 1%, 0.8%, 0.5%, 0.25%, 0.2%, 0.1% Lösungen der reinen α, β, γ -Dextrine gemacht, dann haben wir jeweils 0.01 cc(mit AGLA, Micrometer Syringe, London) der Standardlösungen auf der Papier genommen. Nach dem Trocknen haben wir das Papier in dem Tank mit unserem Lösungsmittel gelegt und 11 Stunden auf dem Aufsteigendenmethode gelaufen lassen. Nach dem Trocknen mit der 1% igen Jodlösung und 0.01% igen Kristallviolett Lösung gesprücht. Wir maskieren die Größe der Flecke auf dem Papier und dann gemessen. Aus diesem Figur und Logarithmus der Konzentration der der bekanten Probe, haben wir den Standardkurven gemacht(Fig. 1).

3. Kristallographie und Papier-chromatographie der Einschlussverbindungen der Cyclodextrinen.

A. Fluorbenzol β -Dextrin

100 cc 1% β -Dextrinlösung mit 1g Fluorbenzol sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen. Die Addukt wird absaugen, mit Aceton, Äther auswaschen, dann es wird mit kristallographische Aufnahme gemacht. Die β -Dextrin Konzentration der Mutterlauge wird so genau wie 2E ausgemessst. Aber gibt es kein Fleck auf dem Papier.

B. Fluorbenzol/ α -Dextrin

100 cc 3% α -Dextrinlösung wird mit 1g Fluorbenzol sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen. Die Addukt wird abgesogen, von ihrem Mutterlauge haben wir die bleibende Konzentration der α -Dextrine so genau wie 2E ausgemessen.

Die α -Dextrin Konzentration der Mutterlauge der Addukt...
.....2.5%

C. Cyclohexan/ β -Dextrin

100 cc 1% β -Dextrinlösung wird mit 1g Cyclohexan sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen.

Die Addukt wird abgesogen, mit Aceton, Äther auswaschen, dann es wird mit kristallographische Aufnahme gemacht.

Die β -Dextrin Konzentration der Mutterlauge wird so genau wie 2E ausgemessen.

Die β -Dextrin Konzentration der Mutterlauge der Addukt...
.....0.11%

D. Cyclohexan/ α -Dextrin

100 cc 1% α -Dextrinlösung wird mit 1g Cyclohexan sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen. Die Addukt wird abgesogen und die α -Dextrin Konzentration wird so genau wie 2E ausgemessen.

Die α -Dextrin Konzentration der Mutterlauge der Addukt...
.....0.21%

E. Toluol/ β -Dextrin

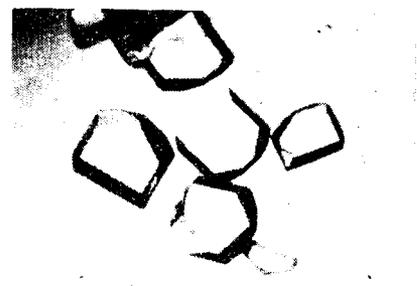
100 cc 1% β -Dextrin wird mit 1g Toluol sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen. Die Addukt wird abgesogen, mit Aceton, Äther ausgewaschen, dann es wird mit kristallographischer Aufnahme gemacht.



β -Dextrin



β Dextrin-Fluorbenzol Addukt



β -Dextrin-Cyclohexan Addukt

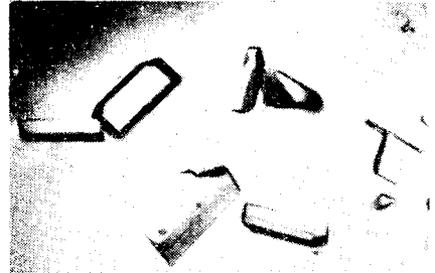
Die β -Dextrin Konzentration der Mutterlauge wird so genau wie 2 E ausgemessen.

Die β -Dextrin Konzentration der Mutterlauge der Addukt...
.....0.13%

F. Toluol/ α -Dextrin

100 cc 3% α -Dextrinlösung wird mit 1 g Toluol sehr streng geschüttelt und ca. 4 Tage stehen lassen. Die α -Dextrin Konzentration wird so genau wie 2 E ausgemessen.

Die α -Dextrin Konzentration der Mutterlauge der Addukt...
.....1.17%



β -Dextrin-Toluol Addukt

Alle diese kristallograpische Bilder und Abnahme der Cyclodextrin Konzentration in de Mutterlauge bezeigt uns dass Cyclodextrin in der Lösung mit Fluorbenzol, Cyclohexan und Toluol sehr gut Einschlussverbindung bilden.

4. Probe Analyse

A. Wir haben 10cc der 3%igen Stärkelösung(Experiment. 1A), 5cc der Enzymlösung, Bac.macerans mischen und bei 40°C legen lassen, in jeden jeweils 0.01cc(AGLA, Micrometer Syringe, London) auf dem Papier genommen und die Chromatogramm auf jeder Stunde mit dem oben erwähnten Bedingungen in den Falle der Standard Dextrinlösung gemacht(wie Experiment. 2E).

Wir haben 10cc der 3% igen Stärkelösung und 5cc der Enzym Lösung und jeweils 5cc der Toluol, Cyclohexan, p-Cymol und Fluorbenzol mischen und bei 40°C legen lassen. Die weiteren Operationen wurden wie in dem oben erwähnten Versuchen durchgeführt.

Kurve 1(Fig. 2)

.....

Die Menge der Cyclodextrine in nur 3% Stärkelösung
Die Menge der Cyclodextrine in 3% Stärkelösung mit Toluol

Kurve 2(Fig. 3)

.....

Die Menge der Cyclodextrine in nur 3% Stärkelösung
Die Menge der Cyclodextrine in 3% Stärkelösung mit p-Cymol

Kurve 3(Fig. 4)

.....

Die Menge der Cyclodextrine in nur 3% Stärkelösung
Die Menge der Cyclodextrine in 3%Stärkelösung mit Cyclohexan

Kurve 4(Fig. 5)

.....

Die Menge der Cyclodextrine in nur 3% Stärkelösung
Die Menge der Cyclodextrine in 3% Stärkelösung mit Fluorbenzol

In diesen Versuchen sehen wir die Konzentration der gebildenen Cyclodextrine in der Stärkelösung mit Enzym mit dem Zeitlaufen zunehmen, weil die Gleichgewicht der Bildung der Cyclodextrine mit der Einschlussverbindungen nach rechts verschieben.

Wenn wir, deswegen, Enzymlösung und mit Cyclodextrin umschliessende Gastmolekel in bestimmten Menge der reinen Cyclodextrinlösung addieren, die Konzentration der Cyclodextrine dagegen in der Lösung mit der Zeitlaufen abnehmen. Die folgende Versuchen beweisen diese Sachen.

B. Wir haben 10cc der 0.5% α -Dextrinlösung, 5cc der Enzym Lösung und jeweils 5cc der p-Cymol, Cyclohexan, Cyclohexen mit 1g Glucose, Cyclohexan mit 1g Maltose, Fluorbenzol mit 1g Glucose, mischen und bei 40°C legen lassen. Die weiteren Operation wurden wie in dem oben erwähnten Versuchen durchgeführt(wie Experiment. 4A)

Kurve 5(Fig. 6)

.....

Die Menge der α , β -Cyclodextrine in nur reine 0.5% α -Dextrin
Die Menge der α , β -Dextrine in 0.5% α -Dextrinlösung mit p-Cymol

Kurve 6(Fig. 7)

.....

Die Menge der α , β -Dextrine in nur reine 0.5% α -Dextrinlösung
Die Menge der α , β -Dextrine in 0.5% α -Dextrinlösung mit Cyclohexan

—×—×— Die Menge der α , β -Dextrin in 0.5% α -Dextrinlösung mit Cyclohexan und Glucose

Kurve 7(Fig. 8)

..... Die Menge der α , β -Dextrin in nur reine 0.5% α -Dextrinlösung
 —. —. —. — Die Menge der α , β -Dextrin in 0.5% α -Dextrinlösung mit Cyclohexan
 —×—×— Die Menge der α , β -Dextrin in 0.5% α -Dextrinlösung mit Cyclohexan und Maltose

Kurve 8(Fig. 9)

..... Die Menge der α , β -Dextrine in nur reine 0.5% α -Dextrinlösung
 —. —. —. — Die Menge der α , β -Dextrine in 0.5% α -Dextrinlösung mit Fluorbenzol
 —×—×— Die Menge der α , β -Dextrine in 0.5% α -Dextrinlösung mit Fluorbenzol und Glucose

C. Wir haben 10cc der β -Dextrinlösung, 5cc der Enzym Lösung und jeweils 5cc der p-Cymol, Cyclohexan, Fluorbenzol und Cyclohexan mit 1g Glucose mischen bei 40°C legen lassen. Die weiteren Operation wurden wie in dem oben erwähnten Versuchen durchgeführt(wie Experiment. 4A)

Kurve 9(Fig. 10)

— reine β -Dextrin
 Die Menge des β -Dextrins in 0.5% β -Dextrinlösung mit P-Cymol
 —. —. —. — Die Menge des β -Dextrins in 0.5% β -Dextrinlösung mit Cyclohexan
 —. —. —. — Die Menge des β -Dextrins in 0.5% β -Dextrin mit Cyclohexan
 —. —. —. — Die Menge des β -Dextrins in 0.5% β -Dextrin met Fluorbenzol

Kurve 10(Fig. 11)

— reine β -Dextrin
 —. —. —. — Die Menge des β -Dextrins in 0.5% β -Dextrin mit Cyclohexan und Maltose
 —. —. —. — Die Menge des β -Dextrin in 0.5% β -Dextrin mit cyclohexan und Maltose

Mit diesen Versuchen sehen wir, dass Einschussfähigkeit der Cyclodextrine einen grossen Einfluss über die Bildungsrate der Cyclodextrine in Abbau Lösung der Stärke mit Enzym geben. Auch damals sehen wir, dass α -Dextrin mit Enzymlösung zum β -Dextrin verwandelt und diese Verwandlung in der Lösung mit Glucose und Maltose sogar stark ist. Wir können diese Verwandlung auch mit Kurve 1, 2, 3, und 4 beweisen, d.h. wir sehen im Abbau der 3% Stärkelösung mit Bac. macerans Enzym, dass die Menge der α -Dextrins zwar zum erstenmal mehr ist als die Menge des β -Dextrins, aber mit der zeitlaufen allmählich abnehmen.

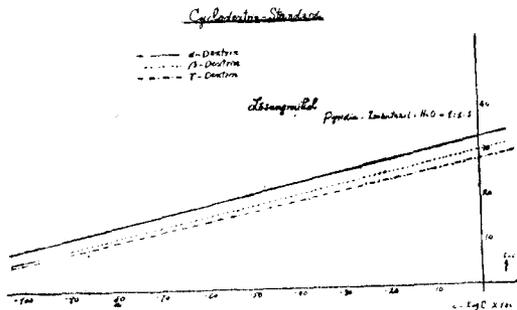


Fig. 1

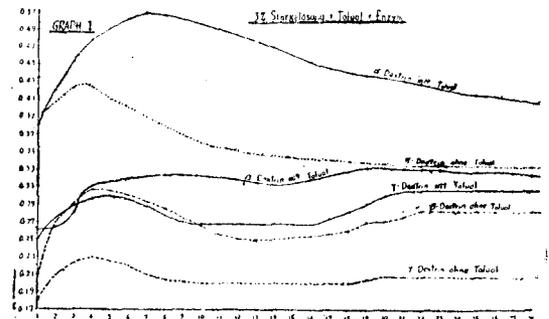


Fig. 2

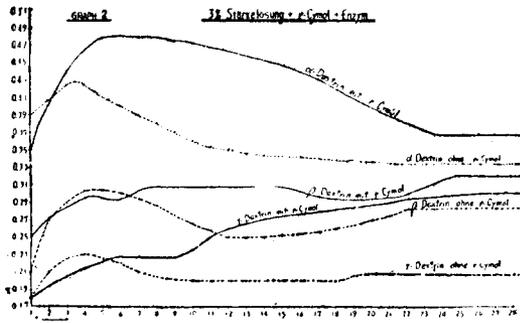


Fig. 3

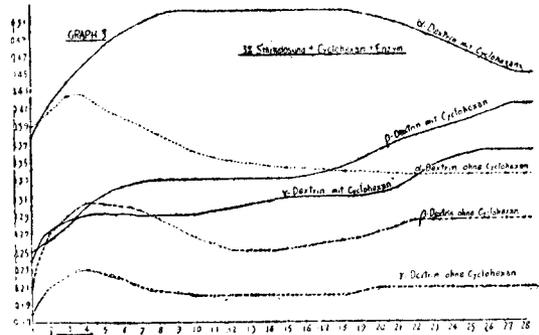


Fig. 4

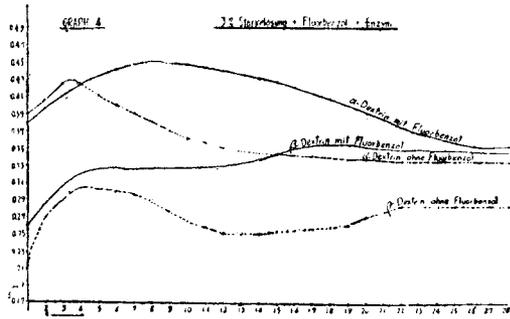


Fig. 5

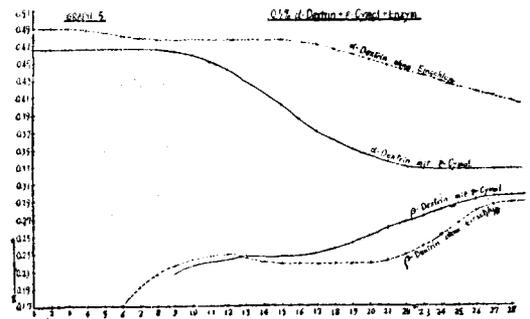


Fig. 6

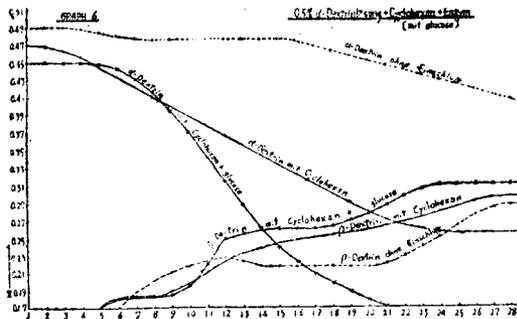


Fig. 7

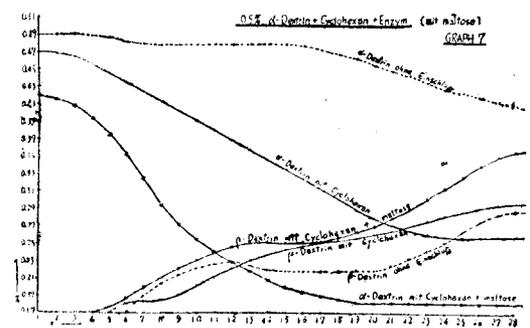


Fig. 8

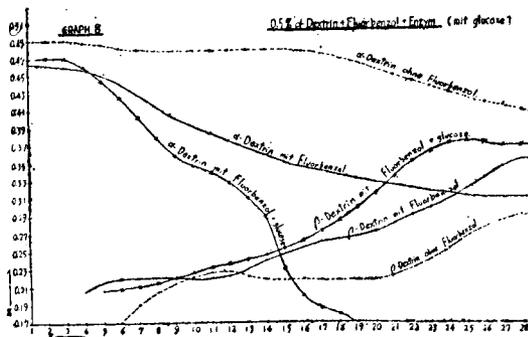


Fig. 9

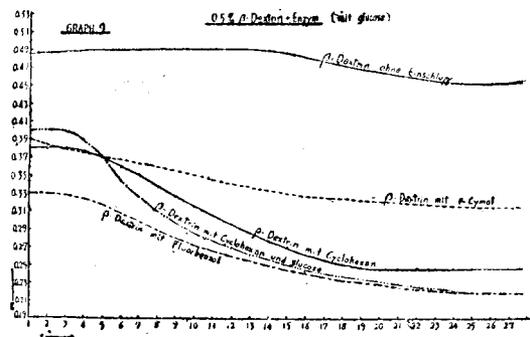


Fig. 10

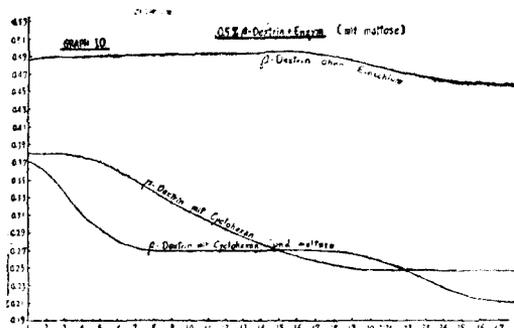


Fig. 11

Zusammenfassung

Wenn Schardinger und Freudenberg auch die Cyclodextrin, die am Abbau der Stärkelösung sich bilden, entdeckt haben, gibt es bis heute keine genaue Bestimmungsmethode der Cyclodextrine. Es wurde quantitative methode der Cyclodextrine durch Papierchromatographie Vertraut haben, die obigen Versuche wurde gemacht.

Wenn die Cyclodextrinen, die beim Abbau der Stärke mit *Bac. macerans* sich bilden, mit einigen Gastmolekülen Einschlussverbindungen bilden können, ist die Menge der jeden Cyclodextrine wie in Versuch zugenommen, in dem die Gleichgewicht der Bildung der Cyclodextrine mit der Einschlussverbindungen nach rechts verschieben.

In Kurve 5, 6, 7, 8, 9, 10 ist daher die Menge der reinen Cyclodextrine abgenommen. In diesen Versuch können wir anschauen, dass die Menge der Cyclodextrine mit Cyclohexan am Abbau der Stärkelösung am höchsten ist. Damals können wir auch bemerken, dass Glucose, Maltose eine wichtig Rolle in abnehmen den Menge der Cyclodextrine als ein Katalysator spielen. In solchem Versuch können wir auch beweisen, dass geradketten Dextrine, die beim Abbau der Stärke mit *Bac. macerans* sich bilden, zum Cyclodextrinen mit dem Wiederholen der Umlagerungs-Reaktionen der Glycosylradikal umwandeln. In diesen Fällen haben wir Glucose und Maltose als Schenkung angewandt. Da konnte wir auch am Versuchen mit β -Dextrin keine α -Dextrin gefunden haben, während in dem Falle mit α -Dextrin zunehmenden β -Dextrin bemerken konnte, vermuten wir α -Dextrin mag an Bildung der Cyclodextrin β -Dextrin liefern.

Der Autor dankt Prof. Dr. F. Cramer für seine direkte Führung an dieser Arbeit und Dr. F. M. Henglein für die Lieferung der Material-Substanz.

Literatur

1. Schardinger F. Z. Untersuch, Nahr. U. Genussm. **6**, 874(1903)
2. Freudenberg K. u. R. Jacobi, Liebigs Ann. **518**, 102(1935)
3. Freudenberg K. F. Plankenhorn u. H. Knauber, Liebigs Ann. **558**, 1(1949)
4. Freudenberg K. M. Meyer-Deliis, Chem. Ber. **71**, 1596(1398)
5. Borcchert W., Z. Naturforsch. **3b** 464(1948) French D. and R.E.Rundle, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 1651(1942)
6. Freudenberg K.u. F. Cramer, Z. Naturforsch. **36**, 464(1948)
7. Cramer F., Liebigs Ann. **579**, 17(1953)
8. Cramer F. u. F.M. Henglein, Chem. Ber. **91**, 308—310(1958)
9. Fisher R. parson D., Morrison G., Nature **161**, 764(1948)