[澱粉科学 (Denpun Kagaku) 第 40 巻 第 2 号 p.103~116 (1993)]

平成 4 年度 日本澱粉学会賞受賞講演

サイクロデキストリンの基礎と応用に関する研究

小林 昭 一*

Fundamental Study and Application of Cyclodextrins

Shoichi KOBAYASHI

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
(2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)

1. Cyclodextrin-producing enzyme produced by *Bacillus macerans* (CGTase, macerans enzyme)

Crude macerans enzyme preparation was purified and the enzyme was crystallized.

Elucidation of the CDs' forming path: By use of various kinds of substrates, well-known phenomenon of β -CD accumulation at final stage of the reaction was explained from time course data of CD formation and the rate of coupling.

Elucidation of cyclizing reaction: Cyclizing reaction proceeds from non-reducing ends of the substrates cyclizing 6 glucose units to form α -CD and the remaining fragments. The rate of cyclization was high on substrates having more than 8 glucose units, and accelerated by the addition of helices forming reagents; moreover, it was found that α - and β -CDs were selectively formed by the addition of 6₅ and 7₆ helices forming reagents. Branched CDs were produced by forming helical structure with surface active reagents from substrates having branches, and in the same manner, 1 or 2 hydroxyethyl substituted CDs were produced by the action of macerans enzyme on the helix formed hydroxyethyl starch.

Elucidation of coupling action: Glucosyl- α -CD and ¹⁴C-labeled glucose were reacted with macerans enzyme, and the structure of the formed branched oligosaccharides was analyzed. The smallest non-radioactive branched oligosaccharide was B₄(6³- α -glucosylmaltotriose), and at the initial stage of the reaction, radioactive(*) B_{8*}(mainly 6⁶- α -glucosylmaltoheptaose) was formed to be gradually degraded to B_{7*}(mainly 6⁵- α -glucosylmaltohexaose), B_{6*}(mainly 6⁴- α -glucosylmaltopentaose) and B_{5*}(6⁴- α -glucosylmaltotetraose)

From the results described above, the author proposed an enzyme model of active site.

2. Production of CDs

Methods for the production of α -CD, α -CD containing starch syrup, γ -CD were developed, and a large ringed CDs preparation method, by which δ - $\sim$ θ -CDs were produced, was also developed. δ - $\sim$ θ -CDs preparation contained a fair amount of intra branched CDs which have α -1,6 linkage in the CDs themselves.

3. Production and the properties of branched CDs

A method for the production of branched CDs which have branch(es) longer than glucosyl unit was developed, and maltosyl-CDs (G₂-CDs) were effectively produced. The number of branches attached to CD ring depends on the size of CD, and 2 and 3 branches were easily attached to α -CD and β -CD, respectively. Panose was also attached to CDs to form panosyl-CDs.

Branching moiety of the CDs were degraded by the action of glucoamylase to glucosyl-CDs (G₁-CDs), and maltose was again attached to G₁-CDs to form doubly branched G₁, G₂-CDs by the action of pullulanase.

Properties of branched CDs: Solubility was higher than that of original CDs, and degree

* 農林水産省食品総合研究所 (305 つくば市観音台
2-1-2)

of the solubility was different depending on the variety of CD, the variety of branch and the number of branches.

As for the action of starch-degrading enzymes on the branches, it was found that the action of glucoamylase was considerably different depending on the variety of branched CD. Amylo-1, 6-glucosidase acted on AD and AC type of diglucosyl- α -CD($(G_1)_2$ - α -CD), but not on AB type. *Aspergillus oryzae* α -amylase degraded G_1 -CD, but the rate of degradation was depressed to less than 1/10 in comparison with that of original CD, and multiply branched glucosyl-CDs were scarcely degradable. Pullulanase (branching enzyme) scarcely degrades maltosyl branches of AB type of branched CDs, but acted on the branches of AC and AD types. AD type of $(G_1)_2$ - α -CD was completely resistant to the action of macerans enzyme; AB and AC types were reacted in the presence of acceptors such as glucose and maltose.

By the combination of the results described above, systems for the separation and production of AB, AC and AD types of $(G_1)_2$ - α -CD were established.

はじめに

澱粉の高度利用には各種の方法が適用され、たとえば、完全分解してグルコースとした後グルコースイソメラーゼによりフラクトースに変換して、異性化糖として有用な甘味食品素材となり、また、 α -アミラーゼにより部分加水分解され、甘味と溶解性を高めた水アメなどが製造されている。さらに、最近、機能性食品素材への要求度が高まり、澱粉からこの要求に適合した食品素材の開発が求められてきた。そこで、筆者はサイクロデキストリン(CD)がその要求に適合したものと考え、CDの生産、性質、応用について研究を進めてきた。

CD, CGTase 研究の歴史は長いがその研究は遅れていた。本酵素の生産が困難であり、しかもその作用が複雑だからである。すなわち、本酵素は *Bacillus macerans* 菌の培養によって生産され、環状糖形成反応(cyclization, 環化)、直鎖糖間転移反応(disproportionation)、開環糖転移反応(coupling)および加水分解反応(hydrolyzing)の4作用を示す。これらの反応のために生成物からの解析が困難であり、作用機作の解明が遅れ、したがってCDの生産も十分には検討されなかった。そこでまず、本酵素の大量生産に適した培養条件を確立し、精製酵素を得て、さらに本酵素が示す多様な作用機構の解明を試みた。

CDには各種のものがあ、一般に6グルコース環の α , 7の β , 8の γ が知られている。この中で β は溶解度が低く結晶化されやすいので、その生産は比較的容易である。しかし、 β は性質上、食品、医薬、化粧品などの分野での用途には不利であった。また、 γ の生成量は非常に少ないので、まず α の生産方法について検討した。さらに、食品工業への実際の利用には安価な製品が望まれるので、この目的に適合した製品の開発を試みた。CD

にはこの他、グルコシル-CDなどの分岐をもったものもあるが、その調製は非常に困難であり、純品は得られていなかったし、分岐CDは通常のCDに比べて、性質が大きく異なると思われた。そこで、その調製法を考案し、分岐CDを大量に得て、性質の検討を試みた。この他、9グルコース以上の大環状CD、枝部分が分岐デキストリン、および分岐を2個以上もつ特殊なCDの調製についても検討した。Table 1にはこれまで調製された各種CDの分類を示した。この他、枝部分にグルコシル以外のガラクトシル、糖アルコールなどを含む特殊なCDもある。

Bacillus macerans の生産する CD 合成酵素 (CGTase, macerans 酵素)

1. CGTase 産生菌の培養と酵素の精製

CGTase 産生菌としては、*Bacillus macerans* の他に、*B. circulans*¹⁾, *B. megaterium*²⁾, *B. ohbensis*³⁾, Alkalophilic *Bacillus* sp.⁴⁾, *B. stearothermophilus*⁵⁾, *Klebsiella pneumoniae*⁶⁾, *B. subtilis* sp. No. 313⁷⁾ など各種のものが知られている。しかし、*Bacillus macerans* は CGTase 産生能が高く、入手も容易であった。そこで、可能な限り簡便な培養法の確立を目的として、培地組成を検討し、小麦フスマ 3% + 硫酸アンモニウム 0.5% + 炭酸カルシウム 0.5% を水道水中に懸濁した培地が適当であることを見出した。酵素活性も馬鈴薯-オートミール-炭酸カルシウムの培地を用いた静置培養法と比較して一例では18倍以上にも上昇し、本培地で、40℃、通気量 1/l、攪拌速度 300 rpm で48時間培養し、30 THU/l broth の活性が得られている。本培養液から不溶物を除去して粗酵素液とした。

CGTase 産生菌の培養には通気が酵素生産に大きく影響し、たとえば 500 ml フラスコ培養では培地の量は 70

Table 1. Classification of various kinds of CDs.

CD	Non-branched CD	Normal ring CD.....	α , β , γ -CD	
		Large ring CD.....	δ , ... θ -CD...	
	Branched CD	Intra branched CD.....	ϵ , ... θ -CD...	
		Outer branched CD	Singly branched CD	Glucosyl-CD
				Maltosyl-CD
		Multiply branched CD		Maltotriosyl-CD
				Panosyl-CD
				(Glycosyl-CD)
		Homogeneous multiply branched CD		Diglucosyl-CD
	Dimaltosyl-CD			
	Triglucosyl-CD			
	Trimaltosyl-CD			
	Heterogeneous multiply branched CD		Dipanosyl-CD	
			(Homogeneous multiple glycosyl-CD)	
			(Heterogeneous multiple glycosyl-CD)	
	Heteroglucosyl-CD		Sorbityl-CD	
			Galactosyl-CD	
		Mannosyl-CD		
CD derivatives		Hydroxyethyl-CD		
(Non-branched and branched CD derivatives)		Methyl-CD		
		Acetyl-CD		

ml 程度でよい結果が得られる。また、CD 生産用には雑菌汚染を防止するために 65℃ 以上の高温で使用できる固定化酵素が望ましい。この目的に適した CGTase 産生菌を探索し、菌体に結合した状態で CGTase を産生し、しかも 65℃ 以上で培養可能な好熱性菌も見出された。しかし、本菌を高温で培養すると酸素が十分に供給できず、酵素産生能が低い。そこで、酸素と炭酸ガスを大量に通過できるシリコン管を用いた培養方法が開発された。本法では、径 2～5 ミリ、管壁 100～200 ミクロンの細管を用い、酸素または炭酸ガスを要求する微生物の培養に広く適用できる⁸⁾。

粗酵素液は非常に強い不快臭をもっているため、このまま濃縮しても、食品製造酵素としては利用しにくく、部分精製が必要であった。精製には澱粉吸着法が効果的であり、1 g の湿熱処理トウモロコシ澱粉を 2500 THU の粗酵素液に投入し、低温室内で一晩攪拌した後、澱粉を沈澱させて上澄みを流し去り、33%エタノール溶液に懸濁してガラスフィルターで減圧濾過の操作を 3 回繰り返せば、不快臭のない澱粉吸着酵素が得られる。本澱粉に純水を加えて、50℃ で 15 分攪拌し、手早く減圧濾過することにより酵素を脱着することができ、濾液をさらに、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、再クロマトすることにより、デスクゲル電気泳動で単一バンドを示すまでに精製された。精製酵素はコロジオン

バッグで蛋白濃度 3～4 %まで濃縮し、塩化カルシウムと硫酸を添加して低温放置し、偏光顕微鏡下で淡い偏光を示す CD 合成酵素の結晶を得た。

分子量は Bio-Gel カラムクロマトグラフィーで 145,000、SDS-デスクゲル電気泳動で 74,000 であり、サブユニット 2 量体であると予想された。また、SDS、メルカプトエタノールを添加して処理するとサブユニットが得られたが、本実験条件では酵素活性は認められなかった。CGTase の分子量については値の異なった多くの報告があり、培養条件、その他により、その分子種が異なるものと推察される。

Bacillus macerans の CGTase の結晶化は本報告が最初のものであり、これまで本酵素が 4 作用を示すのは分離が困難な混合酵素系によるものとした考えがあり、そのために結晶化が難しいとされていたことから、本酵素標品を用いた作用機作の検討を行った。

2. 精製酵素の作用機作

1) CD 生成経路の解明

可溶性澱粉からの α -CD と β -CD 生成速度は大きく異なり、*macerans* 酵素では反応初期に α -CD が迅速に増加し、後期には減少する。一方、 β -CD は α の減少分を補足するように増加するが、総 CD 量 50% をピークにして CD 量は徐々に減少し、 α -CD の減少速度が大きい。

Table 2. CD formation from various DP of substrates.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀	G ₁₁	G ₁₂
α	—	—	±	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
β	—	—	—	—	—	±	+	+	++	++	+	±

— : no formation ; ± : very slight formation ; + ~ +++ : degree of formation.

Table 3. Rate of coupling.

(Coupled CD : $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg prot.}$)

Acceptor	G ₁			G ₂	G ₃	G ₄
	2/3	4/3	6/3	2/3	2/3	2/3 ($\times 10^{-2}\text{M}$)
α -CD	0.2	2.9	5.3	4.3	2.4	1.9
β -CD	0	0	—	0.5	—	—

The concentration of CD : $2/3 \times 10^{-2}\text{M}$. CDs were coupled with each acceptor and the rate of coupling was determined by glucoamylase and Somogyi-Nelson method.

α -CD の純品を macerans 酵素に作用させると、徐々に分解されてマルトオリゴ糖が生成するとともに β -CD が生成した。また、 β -CD の純品は著しく作用を受けにくい。

各種マルトオリゴ糖からの CD 生成については、基質、酵素濃度を一定にして反応後、ペーパークロマトグラフィーで生成物を検出した結果を Table 2 に示したように、高重合度になるに従って α -CD が生成しやすく、 β -CD は重合度 7~11 で生成が認められた。

Coupling 速度は、Table 3 に示したように、 α -CD とマルトースとの反応速度が大きく、 β -CD では著しく小さい。

Disproportionation は、従来アランダムな転移反応といわれていたが、一定のパターンが認められ、その主反応は G_n (n は 4 以上) からの G_{n-2} 部分の非還元末端への移転である。

加水分解速度は cyclization の $15/10,000$ である。

以上の結果をまとめると、従来知られていた「反応が進行しすぎると β -CD が蓄積する」現象を Fig. 1 の経路によって説明することができる。

2) Cyclization の説明

本反応が基質分子の還元、非還元いずれの末端から進行するのか未知であったが、 ^{14}C -グルコースでラベルした各種マルトオリゴ糖への反応で、非還元末端から 6 個ずつ環化して、還元末端を切り残すパターンを示した。また、各種基質でも cyclization 速度は Table 4 のように、 G_8 以上では速く、とくに SDS の添加によって無添加の 1.6 倍以上に加速された。このことから、cycli-

Fig. 1. Scheme for explanation of β -CD accumulation.
 α : α -CD ; β : β -CD ; SS : soluble starch ; MD : maltodextrin.

Table 4. Rate of cyclization.

(Formed CD : $\mu\text{M}/\text{min}/\text{prot.}$)

Subst.	SS	G ₁₀	G ₉	G ₈	G ₇	G ₅
-SDS	21	22	22	22	—	—
+SDS	36	—	33	26	12	7

SS : soluble starch ; -SDS : without sodium lauryl sulfate ; +SDS : with sodium lauryl sulfate.
 Concentration of substrate : final 1% ; Concentration of SDS : final 0.1%.

zation は SDS のような螺旋構造形成試薬の添加で反応が進み、螺旋の大きさにより CD が選択的に生成される可能性が見出された。そこで、Fig. 2 に示す各種界面活性剤を集め、基質に添加して反応した後、ペーパークロマトグラフィーで生成 CD を検出した結果は Fig. 3 に示すように、SDS など炭素直鎖を疎水部分にもつ界面活性剤は、 α -1,4 グルカンに 6_5 -螺旋構造を取らせ、 α -CD が大量に生成した。同様に、 7_6 -螺旋を形成させる界面活性剤によって β -CD が大量に生成した。

Fig. 2. a : The structure of surfactants forming α -CD ; b : the structure of surfactants forming β -CD.

Fig. 3. Formation of cyclodextrins in the presence of various surfactants.

Nos. 1-13 : see in Fig. 2a and 2b : Ref : reference (without surfactant). 4% surfactants solutions, 2% soluble starch solution and macerans enzyme solution (24THU in 1 ml of 0.1 M acetate buffer containing 1 mM CaCl_2 , pH 6.0) were prepared. 100 μl of substrate solution and 50 μl of surfactant solution were mixed and kept for 10 min at 40°C, and added 50 μl of enzyme solution, reacted at 40°C for 24 hr. Each 20 μl of the reaction mixture was spotted on a paper (20 $\times$ 20 cm, Toyo Roshi No. 50, Tokyo, Japan) and the paper was irrigated at 70°C, twice by 1-butanol/1-propanol/water (3/5/4), revealed by dipping in iodine-acetone solution. α -CD shows blue color, β -CD shows yellow and γ -CD is yellowish orange.

さらに、分岐をもつ基質にこれらの界面活性剤を添加して螺旋構造をとらせることができれば枝を巻き込んで枝をもつ CD、分岐 CD を生成させることができるものと予想し、ワキシコーンスターチからの分岐 CD の調製を試みた。まず、基質を α -アミラーゼにより軽く液

化し、macerans 酵素を加えて反応した後濃縮し、テトラクロルエタンとプロモベンゼンを加え、生成した CD を沈澱除去して、分岐部分を多く含むデキストリン溶液を得た。本溶液に SDS を基質に対して 10% になるように添加して、再度 macerans 酵素を加えて反応し大量の

Fig. 4. Paperchromatogram showing spots of hydroxyethyl α -CDs.

α , β , γ : α -CD; β -CD, γ -CD; HE1: hydroxyethyl-1 substituted α -CD; HE2: hydroxyethyl-2 substituted α -CD. Paperchromatogram was revealed by dipping in iodine-acetone solution.

分岐 CD を得た。ここで得られる分岐 CD は主として $G_1 \sim G_6$ の枝をもつ α -CD であるが、グルコアミラーゼを作用させるとほとんどの分岐 CD はグルコシル-CD に変換された。同様に、ヒドロキシエチル澱粉に macerans 酵素を作用させるとヒドロキシエチル基が α -CD に 1 および 2 個付いた CD 誘導体が生成された。

6~8 個のグルコースに 1 個の官能基が付いた基質からの生成率は高いが、官能基がこれ以上付いた基質からは CD が生成しにくい。Fig. 4 にはこのようにして調製したヒドロキシエチル 1 および 2 置換 α -CD のペーパークロマトグラムを示した。

3) Coupling の解明

グルコシル- α -CD と ^{14}C 標識グルコース混合物に macerans 酵素を作用させると coupling が起こり、還元末端に ^{14}C 標識グルコースが結合した各種の分岐オリゴ糖が生成される。Fig. 5 には、その経時変化を示したオートラジオグラムであるが、反応初期には分岐をもつ 8 グルコース単位のオリゴ糖 (B_8) が生成し、反応の進行とともに B_7 , B_6 , B_5 が生成し、これ以下の分岐オリゴ糖は生成しなかった。また、通常のペーパークロマトグラムによれば B_4 が最小の分岐オリゴ糖である。すなわち、 B_4 が macerans 酵素の限界デキストリンである。

B_8 , B_7 , B_6 , B_5 の構造はプルラーゼ、イソプルラーゼ、 β -アミラーゼ、豚脾臓 α -アミラーゼを用いて決定した。放射性グルコースを還元末端にもつ分岐オリゴ

Fig. 5. Time course of macerans enzyme reaction (autoradiogram).

St: spotted 20 μl of radioactive maltooligosaccharides standard solution. 4d: reacted for 4 days; $G_1 \sim G_7$: glucose-maltoheptaose; $B_5 \sim B_8$: glucosyl branched maltotetraose-glucosyl branched maltoheptaose. 40 μl of 10% G_1 - α -CD (4mg), 20 μl of radioactive glucose (4 μCi) solutions and 330 μl of water were mixed and 10 μl of macerans enzyme (1.12THU) solution were added to the mixture. The mixture was reacted at pH 6.0, 40°C. Fifty μl of the reaction mixture was periodically taken out and spotted on a paper for chromatography. Paper chromatography paper size 20 $\times$ 20 cm, Whatman filter paper No. 3, qualitative. The spotted paper was irrigated 3 times in the solvent system of 1-butanol/pyridine/water (6/4/4) at 65°C (ascending). Autoradiography: X-ray film Kodak, no screen film (size 35 $\times$ 43 cm) NS-5T. The irrigated paper was attached firmly on a sheet of X-ray film, and exposed for 2 weeks.

糖の構造は Fig. 6 に示すように、還元末端側に必ず枝が付いていない 3 個以上のグルコース残基が存在した。

以上の結果から、Fig. 7 のような macerans 酵素の作用部位のモデルを提案した。このモデルから螺旋構造が緩く巻いて作用部位に入れば大環状 CD (9 グルコース環以上の CD) が生成することになり、螺旋構造、広くは基質の構造を変化させ、目的に応じて生成物を変えることができることを明らかにした。

このモデルから逆に、本酵素の作用を受けない構造をもつ基質の特定も可能となる。また、CD 生産の 100 倍以上の反応条件でネオトレハロース、コジビオース、ニゲロースなどのグルコースの 2 糖類、セントースのよ

Fig. 6. Structure of branched oligosaccharides obtained from G_1 - α -CD and radioactive glucose by the action of macerans enzyme.

Underlined are main structure, and all reducing ends have radioactivity.

Fig. 7. Proposed active site of macerans enzyme.

Wedge : catalytic site ; 14, 16 : α -1,4 and α -1,6 linkages. a, b, c : possible position of glucosyl branch of G_1 - α -CD.

うなグルコースの3糖類も生成することが見出され⁹⁻¹³⁾, 触媒部位にかかる基質の方向によって生成物が変わる可能性もある。このように基質の構造変化, 基質の反応位置が反応生成物に及ぼす影響は酵素化学の基本に係るものとして重要な意味をもつものと考えられる。一方, CD 合成酵素の多種作用を酵素蛋白から解明する研究も進み, 酵素蛋白の COOH 末端を切断することにより, β -CD 合成酵素が α -CD 合成酵素に変換でき, CD 合成酵素の α -アミラーゼ様酵素への変換も示されている (筑波大グループ)。Macerans 酵素にイオン交換樹脂を結合して, その作用の変化を検討した結果, 陰イオン, 陽イオン交換樹脂で明確な作用変化を示し, 陽イオン交換樹脂では環化反応 (cyclization) を阻害しないが, 直鎖糖間転移反応を阻害し, 陰イオン交換樹脂では逆の阻害傾向であった。本知見も, 酵素蛋白の COOH 末端が酵素機能の発現に重要な役割を果たしていることを示している。

CD の生産

1. α -CD の生産

基質を十分に液化した後, SDS を基質に対して 10% に加え, 反応して α の収率を従来の 20% から 60% に高めることができた。反応終了後, グルコアミラーゼとタカアミラーゼを加え, β , γ -CD およびデキストリンをグルコースにまで分解してイオン交換樹脂によって SDS を除去し, α を結晶化した。

2. α -CD 水アメの生産

澱粉吸着酵素を澱粉に加えて液化し, 反応するのみで主成分の α を含む水アメが製造され, 精製も容易であるので製造コストが著しく低減された。本水アメは主として食品工業に適しており, 食品の品質保持, テクチャーの改良, 異臭苦味除去などによる品質の改善など幅広い用途で応用されている。

3. γ -CD の調製

γ は通常の α -アミラーゼによって加水分解を受けるが, プルラーナーゼと β -アミラーゼの混合酵素系では水解を受けない。そこで, 本酵素により CD 以外のデキストリンをすべてマルトース以下とした後, 不溶物を除き, 一夜低温放置して晶出した β を除去。さらに母液を濃縮して α を晶出除去して α , β を可能な限り除去した母液にブロムベンゼンを添加して振盪し, γ とブロムベンゼン複合体を分離して水蒸気蒸留して, 粗 γ -CD 溶液を得た。混在する β は低温晶出除去後, フロロベンゼンを加えて低温振盪し, 複合体形成沈澱により痕跡の β も除去することができ, γ が結晶化された。

4. 9 グルコース環以上の大環状 CD の調製法

液化した澱粉にデオキシコール酸などステロイド系界面活性剤を加えることにより δ -CD 生成率は 5 倍以上に上昇するが, さらに大環状の ϵ -CD 以上のものはむしろ低下した。 ϵ 以上の生成率を上昇させるには, macerans 酵素の反応条件を抑制すればよいことを見出し, $\epsilon \sim \theta$ までの大環状 CD を生成させることができた。さらに, 市販 CD 粉アメを溶解した後, 市販粗グルコアミラーゼを作用させて CD 以外のデキストリンをすべてグルコースとし, $\alpha \sim \gamma$ -CD を複合体形成沈澱により除去後, ODS カラム分離して δ 環以上の CD を集めたところ, 環内に α -1,6 結合をもつ内分岐大環状 CD が著量含まれていることを見出した。

分岐 CD の生産とその性質

1. マルトシル以上の枝をもつ分岐 CD の調製法

プルラーナーゼは G_2 以上の α -1,4 グルカンをもその逆反応により CD に結合することができるが、この反応を高濃度基質を用いて行くと、分岐 CD の生成率が 40% 以上にも達した。

プルラーナーゼにより枝付けできる CD は α に限らず、 β , γ -CD でも効率的に G_2 -CD が生産できた。また、枝部分としては G_2 に限らず、 G_3 , G_4 などのマルトオリゴ糖が利用できる。CD に結合できる枝の数は環のサイズにより異なるが、 α では 2 個、 β では 3 個までは容易に結合できる。これら、分岐を 2 個以上もつ CD は複分岐 CD、枝の個数を特定したものは 2 分岐、3 分岐 CD のように命名された。

パノース、その他、還元末端の水酸基に置換基をもたないマルトシル以上の残基があるオリゴ糖であれば反応は進むものと予想された。実際にパノースは CD 環に結合し、パノシル-CD も生産され、重分岐 CD と命名された。

2. グルコシルの枝をもつ分岐 CD の調製法

マルトオリゴ糖を枝にもつ分岐 CD の分岐部分はグルコアミラーゼの作用によりグルコシルに切り揃えることができ、各種の G_1 -CD が得られる。とくに G_2 -CD からの G_1 -CD は容易であり、枝を G_1 - とすれば、プルラーナーゼの作用を受けなくなる。そこで、さらに G_1 -CD に G_2 を添加してプルラーナーゼに作用させることができ、 G_1 と G_2 の枝をもつ CD も生産され、異種分岐をもつことから複合分岐 CD と命名された。

以上、分岐 CD の種類は多く、各種、各様に枝付けしたものが生産可能になった。

3. 分岐 CD の性質

1) 溶解度

普通環 CD の溶解度は、 α で 14、 β で 1.8、 γ で 23 のように、ショ糖などと比較すると著しく低い。とくに β では低く、油性食品素材などの可溶化には高溶解性の CD が望まれていた。そこで、 G_1 -CD の溶解度について調べた結果、元の CD に比較して約 10 倍にも増大した。各種分岐 CD の溶解度について調べた例からみると、枝の種類、数による溶解度増減の一定した規則性はないが、枝付けにより最も溶解性が高まる CD は β であり、 G_2 の枝が 1 個付いた G_2 - β -CD の溶解度は元の CD の 70 倍以上にも達する。さらに高溶解性の付与を目的として G_2 の枝を 2 個付けた $(G_2)_2$ - β -CD も調製されたが、溶

Table 5. Solubilization of oily materials by G_1 - α -CD.

	α -CD	G_1 - α -CD
Tetrachloroethane	卅	—
1-Decanol	卅	±
Lemon oil	+	—
Orange oil	+	—
Fluorobenzene	—	—
Cyclohexane	—	—
Bromobenzene	*	—

— ~ 卅 : Degree of precipitate formation. * : no complex formation.

度は逆にかなり低くなる。 α の場合は元の CD, G_2 , $(G_2)_2$ と順次溶解度が増大する。市販分岐 CD 製品 (G_2 -CD の混合物) の溶解度は従来の非分岐 CD に比較すると著しく高く、室温では 162 である。これはショ糖の溶解度にも匹敵する値であり、各種油性物質の溶解に利用できる性質である。Table 5 には α -CD と G_1 - α -CD 溶液への各種油性物質の可溶化を示した。

また従来の非分岐 CD はエタノール、グリセリンなどの有機溶媒にはほとんど溶解しないが、 G_2 - α -CD は 99.5% エタノールへもごくわずかであるが (0.02%) 溶解する。イソエリートの溶解度はグリセリンに対して 22、プロピレングリコール 111、ジエチレングリコール 57 など、糖質としては特異な性質をもっている。

2) 分岐 CD の澱粉分解酵素に対する作用性

グリコアミラーゼが分岐 CD の枝部分をグルコシル基にまで分解することはすでに知られているが、その分解性が分岐 CD の種類により大きく異なることを見出した。マルトシル、パノシルの枝でも CD 環に結合するとグルコアミラーゼの作用を受けやすくなり、環の種類により反応速度が異なる。マルトシルの場合、 G_2 - β の枝が G_2 - α より切れやすいが、これは β 環ではフラットな面が多いからであろう。パノシルの場合は逆に α 環でより切れやすいが、これは α では曲面がより凸状であり、枝が環の面から離れているためにグルコアミラーゼの作用を受けやすいのであろう。

$(G_2)_2$ - α , $(G_2)_2$ - β -CD のグルコアミラーゼによる分解速度は、 α 環での分解速度が小さい。枝が近接して分解作用を阻害するからであろう。しかし、複分岐 CD の場合は、枝の位置が各様であり、たとえば Fig. 8 のような $(G_1)_2$ - α -CD_{AD}, $(G_1)_2$ - α -CD_{AC}, $(G_1)_2$ - α -CD_{AB} となるに従って作用しにくくなるものと予想される。また、アミ

Fig. 8. The structure of AB, AC, AD types of $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ and the structure of doubly branched products obtained by the combined action of macerans enzyme and glucoamylase.

ロ-1,6-グルコシダーゼはAD, ACには作用して、枝部分を水解するがABには作用せず、ABと G_1 からCGTaseとグルコアミラーゼの共同作用によって生成される BB_9 と BB_8 は図のような構造をもち、グルコアミラーゼの作用は著しく受けにくい。

普通環CDは細菌、動物、植物起源の通常の澱粉水解酵素の作用を受けにくい、*Aspergillus oryzae*の α -アミラーゼ(TAA)は古くからCD水解酵素として知られ、 $G_6\sim G_8$ までのオリゴ糖に対する水解速度を100としたとき、 $\alpha\text{-CD}$ で0.044、 $\beta\text{-CD}$ で2.22、 $\gamma\text{-CD}$ で14.8である。これらの結果からTAAの作用はグルコース鎖の平坦な部分で進むと考えられた。

したがって、CD環に G_1 が付くとTAAによる分解速度は元の非分岐CDの1/10以下に低下し、グルコシルの枝が2個以上付いた複分岐 $G_1\text{-CD}$ はほとんど作用を受けなくなる。

このように、CDに各種、各様に枝を付けた分岐CDは澱粉分解酵素の作用を探る上で有用な基質である。

枝切り酵素はマルトシル以上のマルトオリゴ糖の α -1,6分岐を加水分解するが、ABタイプの $(G_2)_2\text{-CD}$ の枝の水解速度は著しく遅く、AC, ADタイプなどの枝をよく切る。

ADタイプの $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ はmacerans酵素の作用をまったく受けないが、AB, ACタイプは G_1, G_2 などアクセプターとなる糖の存在下でcouplingし、複分岐オリゴ糖(BB_9)を生成する。 BB_9 を再度CGTaseに作用させれば、再びアクセプターの糖とAB, ACタイプの $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ が生成する。Fig. 9にはAB, ACタイプの $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ と BB_9 のCGTaseによる可逆反応を示した。

以上の酵素作用を組み合わせると、ADとAB, ACタイプの $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ の分離・生産が可能であり、Fig. 10

Fig. 9. An HPLC profile showing reversible formation of $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ from BB_9 by cyclization of macerans enzyme and its schematic explanation.

1: glucose; 2: BB_9 ; 3: $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$. HPLC conditions: column: Inertsil ODS-2; solvent: aqueous 1% ethanol; flow rate: 0.7 ml/min; temperature: 50°C.

Fig. 10. Process for $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}$ production.

の調製工程が組み立てられる。なお、現在のところ、 $(G_1)_2\text{-}\alpha\text{-CD}_{AB}$ はカラム分離が可能であるが、ADとACタイプは分離不能である。

3) その他の性質

結晶性は元のCDと同様にきわめて優れており、 G_1 -

α -CD は針状結晶, G_1 - β -CD, $(G_1)_2$ - α -CD_{AD} ともに針状結晶, パノシル- α -CD は脆い板状結晶であり, いずれの分岐 CD も相対湿度 50~60% の室温に放置しても重量の増加は認められない。

4. 分岐 CD の応用

各種分岐 CD の性質から, 脂肪酸など油性物質などの可溶化に効果的に利用できる。これらのゲスト分子と非分岐 CD の包接体は一般に不溶性であることが多い。

市販分岐 CD 製品の香気成分の包接保持能は元の CD 製品と比較して著しく高く, たとえば, わさびの香気成分 (アリルイソチオシアナート) を 90°C で 7 時間保存したとき, 元の CD との包接物では香気成分残存率が 45% であるのに対し, 分岐 CD 製品との包接物ではほとんど揮散しない¹⁴⁾。また, 分岐 CD 製品に効果的に包接保持される香気成分としては分子量の小さい (210 以下) 松茸香気, リンゴ香気, 酢酸香気などがある。

さらに, 分岐 CD は脂肪酸の可溶性能が大きいので, すでに報告されている, 動物細胞, 癌細胞などの無血清培養¹⁵⁾に効果的に利用できるであろうし, 従来, α -CD がグルコamilラーゼの温度安定性を高めることも知られている¹⁶⁾のでこれらへの利用も可能であろう。インヒビターまたはアクチベーターとして知られてきた非分岐 CD¹⁷⁾を分岐 CD に替えることにより, その効果が高まることも予想される。

分岐 CD は溶血活性, 筋肉刺激性が元の非分岐 CD と比較して弱いので, 薬剤の各種分岐 CD への包接による可溶化, 安定化でバイオアベイラビリティを高めるなど医薬分野への応用研究も広く進められている¹⁸⁾。

CD の特殊な機能として生体触媒 (酵素) 作用も知られている¹⁹⁾。キモトリプシン類似作用²⁰⁾, ビタミン K の合成例²¹⁾, その他, アミドの開裂, 有機リン酸エステルの開裂, 脱炭酸反応なども CD による促進効果が大きい。これらは非分岐 CD による効果であり, 分岐 CD についての研究例はほとんどみられない。現在, パノシル CD のパノシル部分に鉄, コバルト, マグネシウムなどの金属イオンを保持し, 触媒作用の強化などが試みられている。

おわりに

以上述べてきたように, CD 合成酵素の研究については, 酵素蛋白質自体を変換することによる作用の変換と, 基質の構造を変化させることによる作用形式の変換の方向に進んでいる。基質も酵素も反応環境により多様に変わると考えられ, 環境の変化による作用形式の解析から,

これまで知られていなかった酵素作用性が見出されることが期待される。また, CD の生産については, 大環状 CD, 分岐 CD などの特殊 CD の性質が明らかになるとともに需要が高まるものと期待され, 学術的には環内の性質が枝によりどのように変えられ, どのような機能を現すか興味をもたれ, 今後ますます CD の研究が盛んになり, その成果が糖質科学の進歩, 本学会の発展に大きく貢献することを願っている。

ま と め

1. *Bacillus macerans* の生産する CD 合成酵素 (CGTase, macerans 酵素)

粗酵素を精製し, macerans 酵素の結晶を得た。

1) **CD 生成経路の解明**: 各種基質を用い, CD 生成の経時変化, coupling 速度などの検討から, 従来知られていた「反応が進行し過ぎると β -CD が蓄積する」現象を経路によって説明することができた。

2) **Cyclization の解明**: 非環元末端から 6 個ずつ環化して, 還元末端を切り残すパターンを示した。cyclization 速度は G_8 以上では速く, 螺旋構造形成試薬の添加で反応が進み, 螺旋の大きさにより CD が選択的に生成されることが見出された。

分岐をもつ基質に界面活性剤を添加して螺旋構造をとらせることにより分岐 CD を生成させることができ, 同様に, ヒドロキシエチル澱粉に macerans 酵素を作用させるとヒドロキシエチル基が α -CD に 1 および 2 個付いた CD 誘導体が生成された。

3) **Coupling の解明**: グルコシル- α -CD と ¹⁴C 標識グルコース混合物に macerans 酵素を作用させ, 生成した各種の分岐オリゴ糖の構造を解析した結果, 最小の分岐オリゴ糖は非放射性では B_4 , 放射性では反応初期には B_8 生成し, 反応の進行とともに B_7 , B_6 , B_5 が生成した。

以上の結果から, macerans 酵素の作用部位のモデルを提案した。

2. CD の生産

α -CD, α -CD を含む水アメ, γ -CD の調製法を開発し, さらに, 9 グルコース環以上の大環状 CD の調製法を開発し, $\delta \sim \theta$ までの大環状 CD を生成させることができ, ϵ 環以上の環内に α -1,6 結合をもつ内分岐大環状 CD が著量含まれていることを見出した。

3. 分岐 CD の生産とその性質

マルトシル以上の枝をもつ分岐 CD の調製法を開発し, 効率的に G_2 -CD が生産できた。CD に結合できる枝の

数は環のサイズにより異なるが、 α では2個、 β では3個までは容易に結合できた。パノースをCD環に結合したパノシル-CDも生産された。

マルトオリゴ糖を枝にもつ分岐CDの分岐部分をグルコアミラーゼの作用によりグルコシルに切り揃えて各種の G_1 -CDが得られた。さらに G_1 -CDに G_2 を添加してプルランナーゼに作用させて G_1 と G_2 の枝をもつCDも生産された。

分岐CDの性質：溶解度は元のCDより高くなるが、その程度はCDの種類、枝の種類、数により異なった。

澱粉分解酵素に対する作用性についても、グルコアミラーゼの分解性が分岐CDの種類により大きく異なることを見出した。また、アミロ-1,6-グルコンダーゼはAD, ACタイプの $(G_1)_2$ - α -CDには作用して、枝部分を水解するがABには作用しなかった。*Aspergillus oryzae*の α -アミラーゼは、CD環に G_1 が付くと分解速度は元の非分岐CDの1/10以下に低下し、グルコシルの枝が2個以上付いた複分岐 G_1 -CDはほとんど作用を受けなくなった。枝切り酵素はABタイプの $(G_2)_2$ -CDの枝の水解速度は著しく遅く、AC, ADタイプなどの枝をよく切る。

macerans 酵素はADタイプの $(G_1)_2$ - α -CDにはまったく作用せず、AB, ACタイプは G_1 , G_2 などアクセプターとなる糖の存在下で coupling 反応した。

以上の酵素作用を組み合わせ、ADとAB, ACタイプの $(G_1)_2$ - α -CDの分離・生産方式を組み立てた。

本研究は多くの先生方、研究者の皆様のご指導、ご協力をいただき遂行することができました。ここに心より感謝いたし、厚く御礼を申し上げます。

元東大教授・中村道徳先生、米国アイオワ州立大学教授・故デキスターフレンチ先生には、本研究をまとめるにあたり、ご指導とご教示をいただきました。元東京農工大教授・小林恒夫先生には、CDの基礎についてお教えいただきました。元食品総合研究所所長・鈴木繁男先生、農林水産省技術会議事務局長・貝沼圭二博士には、農林水産省入省以来、終始ご指導、激励をいただき、元食品総合研究所室長・根本芳郎先生、長谷 幸先生、食品総合研究所企画連絡室長・佐々木亮博士、元炭水化物研究室・門間 充主研、高野敏弥研究員、食品総合研究所の梅田所長他、関係者の皆様には諸事お世話になりました。

馬場 茂博士（長野県食品工業試験場）、橋本 仁博士（塩水港精糖㈱）、小田恒郎氏、小暮靖夫氏（元日研

化学㈱）には実用化その他でご教示、ご協力をいただきました。

Jay-lin Gane 博士（米国アイオワ州立大学）、David R. Lineback 教授、S. J. Schwartz 助教授（米国ノースカロライナ州立大学）には有益なご助言をいただきました。

丸山一男（東洋クリエート㈱）、弥武経也氏、塩田真夫氏（昭和産業㈱）、江橋 正氏（三井製糖㈱）、桶本尚氏（塩水港精糖㈱）、國崎伸一郎氏、池本尚人博士（サントリー㈱）、岸本 守氏、積 浩二氏（日本澱粉工業㈱）、山本佳弘氏（武田食品工業㈱）、宇野豊子女史（道立食品加工研究センター）、中島光一氏（台糖㈱）、山崎真良氏（東和化成㈱）、高木悦子女史（島田化学㈱）、深井洋一氏（長野県農村工業研究所）、三輪章志氏（石川県農業総合試験場）、三国克彦氏、景井紀雄氏、石神博氏（塩水港精糖㈱）、信太 治氏（ヒゲタ醤油㈱）には研修生、共同研究者としてご協力いただきました。

山根 國男先生（筑波大学）、井上義夫先生、山本泰彦先生、櫻井 実先生（東京工業大学）、上田晴久先生（星薬科大学）、小泉京子先生（武庫川女子大学）、中西洋志博士、石塚靖子博士（通産省・生命工学工業技術研究所）、藤原隆二先生（島根大学）、坂野好幸先生（東京農工大学）、馬場 忠博士（筑波大学）には共同で研究をさせていただき、有益なご意見、ご教示をいただきました。

ご協力いただきました塩水港精糖㈱、昭和産業㈱、サントリー㈱、その他の企業関係者の皆様に御礼を申し上げます。

引用文献

- 岡田茂孝, 津山直人, 北畑寿美雄: アミラーゼシンボ, **7**, 61-68 (1972).
- 岡田茂孝, 北畑寿美雄: アミラーゼシンボ, **8**, 21-27 (1973).
- 井口博史, 市川寿雄, 八木佳明, 高松 亘; 日本農芸化学会大会講演要旨集, p 46 (1973).
- N. NAKAMURA and K. HORIKOSHI: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753-757 (1976).
- 塩坂 誠, 文屋秀雄: アミラーゼシンボ, **8**, 43-50 (1973).
- H. BENDER: *Arch. Microbiol.*, **111**, 271-282 (1977).
- 加藤 卓, 掘越弘毅: 澱粉科学, **33**, 137-143 (1986).
- 小林昭一, 天地輝夫, 池本尚人, 國崎伸一, 須川恭一: 日本特許出願, 平 2-47199 (1990).
- 塩田真夫, 弥武経也, 高久 肇, 小林昭一: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 62 (1989).

- 10) 塩田真夫, 弥武経也, 高久 肇, 小林昭一: 日本澱粉学会大会講演要旨集, p. 16 (1989).
- 11) 塩田真夫, 弥武経也, 高久 肇, 小林昭一: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 106 (1990).
- 12) 小林昭一, 門間 充, 高野敏弥, 塩田真夫, 弥武経互, 高久 肇: 日本特許出願, 平1-165191 (1990).
- 13) M. SHIOTA and S. KOBAYASHI: *Carbohydr. Res.*, **215**, 203-209 (1991).
- 14) 小暮靖夫, 増山 勇, 五味豊治, 三木啓道, 川口 嶽: *フードケミカル*, **3**, 27-38 (1987).
- 15) Y. MINAMOTO and K. MITSUGI: *Proceedings of the International Symposium on Growth and Differentiation of Cells in Defined Environment*, p. 127-130 (1985).
- 16) Y. EZURE, S. MARUO, M. KOJIMA, H. YAMASITA and M. SUGIYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1073-1074 (1988).
- 17) 小林昭一, 貝沼圭二: 化学と生物, **20**, 453-459 (1982).
- 18) K. UEKAMA, M. YAMAMOTO, T. IRIE and F. HIRAYAMA: *Book of Abstracts, Pharmaceutical evaluation of maltosyl- β -cyclodextrins, The Sixth International Cyclodextrin Symposium-Chicago'92*, L-51 (1992).
- 19) M. L. BENDER and M. KOMIYAMA: *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin (1987).
- 20) V. T. D'SOUZA, K. HANABUSA, T. O'LEARY, R. C. GADWOOD and M. L. BENDER: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 727 (1985).
- 21) 多伏岩夫, 西谷孝子: 化学と生物, **17**, 138-148 (1979).
- 7) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: BMA (*Bacillus macerans* の生産する酵素) に関する研究 V. BMA の加水分解作用, 生化学, **47**, 610 (1975).
- 8) 小林昭一: マセランス酵素の作用機作とその利用, 澱粉科学, **22**, 126-132 (1975).
- 9) S. KOBAYASHI, K. KAINUMA and S. SUZUKI: Action patterns of *Bacillus macerans* enzyme, *Abstracts, 8th International Symposium on Carbohydrate Chemistry*, p. 63 (1976).
- 10) S. KOBAYASHI, K. KAINUMA and S. SUZUKI: Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose glucanotransferase, *Carbohydr. Res.*, **61**, 229-238 (1978).
- 11) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: Cyclodextrin glucanotransferase 作用機作, 生化学, **50**, 839 (1978).
- 12) T. MORO, K. KAINUMA, S. KOBAYASHI, T. UMEMURA, T. HARADA, J. KOMIYAMA and T. IIJIMA: Interaction of cycloamyloses with polymers, *Carbohydr. Res.*, **75**, 345-348 (1979).
- 13) S. KOBAYASHI and D. FRENCH: Action mechanism and active site of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase, *Fed. Proc.*, **39**, 1856 (1980).
- 14) S. KOBAYASHI, K. KAINUMA and D. FRENCH: Effect of surfactants on cyclization of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase, *Denpun Kagaku*, **30**, 62-68 (1983).
- 15) 小林昭一, 門間 充, 田部井英夫: バチルス属に属する好熱性細菌, 日本特許出願, 昭61-72456 (1986).
- 16) 高野敏弥, 桶本 尚, 福田正子, 門間 充, 小林昭一, 貝沼圭二, 山根國男: *Bacillus macerans* のサイクロデキストリン合成酵素遺伝子の塩基配列, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 317 (1986).
- 17) S. KOBAYASHI, H. R. LEE ASHRAF, P. BRAUN and D. FRENCH: Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on glucosyl- α -cyclodextrin and glucose, *Stärke*, **40**, 112-116 (1988).
- 18) S. KOBAYASHI, H. R. LEE ASHRAF, P. BRAUN and D. FRENCH: The Branched maltooligosaccharides resulting from the action of *Bacillus macerans* cycloamylose glucanotransferase on 6-O- α -D-glucopyranosyl cyclomaltotetraose plus D-glucose, *Carbohydr. Res.*, **173**, 324-331 (1988).
- 19) K. KIMURA, S. KATAOKA, A. NAKAMURA, T. TAKANO, S. KOBAYASHI and K. YAMANE: Functions of the COOH-terminal region of cyclodextrin glucanotransferase of alkalophilic *Bacillus* sp. #1011: relation to catalyzing activity and pH stability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 1273-1279 (1989).
- 20) 中村 輝, 小川滋之, 木村憲司, 高野敏弥, 小林昭一, 山根國男: β -CGTase のアミノ末端側に存在する酵素活性の解析, 日本農芸化学講演要旨集, p. 105 (1990).

参考文献

[Macerans 酵素関連]

- 1) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: BMA (いわゆる *Bacillus macerans* の amylase) に関する研究 I. α , β -Cyclodextrin 生成の経時変化と転移反応について, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 47 (1973).
- 2) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: CD 生成酵素の作用形成について, アミラーゼシンボ, **8**, 29-36 (1973).
- 3) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: BMA (いわゆる *Bacillus macerans* の amylase) に関する研究 II. BMA の作用機作について, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 296 (1974).
- 4) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: デンプン吸脱着法によるアミラーゼの精製, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 26 (1974).
- 5) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: BMA (*Bacillus macerans* の生産する酵素) に関する研究 III. BMA の作用形式, 生化学, **46**, 499 (1974).
- 6) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: Macerans 酵素 (BMA) について IV. 作用機作, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 332 (1975).

- 21) 小林昭一, 山崎眞良, 形浦宏一: 菌体結合型 CGTase を産生する好熱性細菌の培養, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 109 (1990).
- 22) S. KOBAYASHI and K. NAKASHIMA: Action of Cyclodextrin Glucanotransferase on Dimaltosyl- α and β -Cyclodextrins, *Abstracts, XVth International Carbohydrate Symposium*, p. 203 (1990).
- 23) 小林昭一, 三輪章志: *Bacillus macerans* の高温培養により生産される酵素の性質, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 120 (1991).
- 24) 中島光一, 小林昭一: (G₁)₂- α -CD の構造と CGTase の作用, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 282 (1991).
- 25) 中村 輝, 羽賀敬子, 小川滋之, 齊藤行彦, 木村憲司, 高野敏弥, 小林昭一, 山根國男: CGTase における α -アミラーゼ相同領域の機能解析, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 286 (1991).
- 26) 三輪章志, 小林昭一: 各種培養温度における *Bacillus macerans* 酵素の特性変化, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 96 (1992).
- [CD 生産と性質関連]
- 27) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: アセトン沈澱によるサイクロデキストリンの製法, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 8 (1973).
- 28) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: サイクロデキストリンの新調製法, 澱粉科学, **22**, 6-10 (1975).
- 29) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: SDS による α -サイクロデキストリンの調製, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 11 (1975).
- 30) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: Macerans 酵素 (BMA) について IV. 澱粉誘導体からのサイクロデキストリン誘導体の形成, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 181 (1976).
- 31) 小林昭一, 毛呂健夫, 飯島俊郎, 貝沼圭二, 鈴木繁男: γ -サイクロデキストリンの調製法, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 1 (1976).
- 32) 鈴木繁男, 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの製法, 日本特許, 昭 52-8385 (1977).
- 33) 小林昭一, 貝沼圭二: SDS 添加による α -, 分岐およびヒドロチシルエチル-サイクロデキストリンの調製法, 農化, **51**, 691-698 (1977).
- 34) 小林昭一, 伊藤美智子, 貝沼圭二, 高橋節子, 鈴木繁男: グルコシル- α -サイクロデキストリンの調製とその性質, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 29 (1978).
- 35) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: グルコシル- β -サイクロデキストリンの調製とその性質, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 17 (1978).
- 36) 小林昭一: サイクロデキストリンの応用への期待, 澱粉, **24**, 19-33 (1979).
- 37) 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリン生成量に及ぼす各種要因について, 日本食品工業学会講演要旨集, p. 45 (1979).
- 38) S. KOBAYASHI and K. KAINUMA: Preparation and some properties of glucosylcyclodextrins, in *Abstracts, 1st International Symposium on cyclodextrins*, p. 51-60 (1980).
- 39) 小林昭一, 貝沼圭二, シクロデキストリンについて α -シクロデキストリンの生産とその利用を中心にして, 澱粉科学, **28**, p. 132-141 (1980).
- 40) 鈴木繁男, 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの製造方法, 日本特許, 昭 56-46835 (1981).
- 41) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: サイクロデキストリンの製法, 日本特許, 昭 56-6279 (1981).
- 42) 小林昭一, 貝沼圭二: 分岐サイクロデキストリンの製法, 日本特許, 昭 56-48156 (1981).
- 43) 小林昭一, 貝沼圭二, 津村信藏: サイクロデキストリンを含む水アメの製造法, 日本特許, 昭 56-43212 (1981).
- 44) 小林昭一, 丸山一男, 貝沼圭二: δ -サイクロデキストリンの調製, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 182 (1982).
- 45) 小林昭一, 丸山一男, 貝沼圭二: 分岐サイクロデキストリンの性質とその利用, 澱粉科学, **30**, 231-239 (1982).
- 46) 小林昭一, 丸山一男, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの新しい製造法, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 25 (1982).
- 47) 小林昭一: サイクロデキストリンの生産とその利用, 日本澱粉学会講演要旨集, p. 7 (1982).
- 48) 小林昭一, 貝沼圭二: 分岐サイクロデキストリンの製造方法, 日本特許出願, 昭 59-214001 (1984).
- 49) S. KOBAYASHI, N. SHIBUYA, B. M. YOUNG and D. FRENCH: The preparation of 6-O- α -D-Glucopyranosyl-cyclohexaamylose, *Carbohydr. Res.*, **126**, 215-224 (1984).
- 50) 小林昭一, 大谷敏郎, 渡辺敦夫, 貝沼圭二, 梅田圭司: サイクロデキストリンの製造方法, 日本特許公告, 昭 60-13678 (1985).
- 51) 橋本 仁, 原 耕三, 桑原宜洋, 三国克彦, 石神博, 貝沼圭二, 小林昭一: サイクロデキストリンの製法, 日本特許出願, 昭 60-188088 (1985).
- 52) 橋本 仁, 原 耕三, 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの製造法, 日本特許出願, 昭 60-244196 (1985).
- 53) 小林昭一, 福田正子, 門間 充, 春見隆文, 久保直哉: 大環状サイクロデキストリンの調製法, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 649 (1986).
- 54) 小林昭一, 門間 充, 高野敏弥: 重分岐サイクロデキストリン, 及びその製法, 日本特許出願, 昭 61-188641 (1986).
- 55) 小林昭一: 各種サイクロデキストリンの生産とその利用, 第5回シクロデキストリンシンポジウム講要, p. 9 (1986).
- 56) 小林昭一, 荒平正緒美: 複合分岐サイクロデキストリン, 及びその製法, 日本特許出願, 昭 62-231073 (1987).

- 57) 小林昭一, 三国克彦, 門間 充, 高野敏弥, 原 耕三, 橋本 仁: 複分岐グルコシル-サイクロデキストリンの製法, 日本特許出願, 昭 63-114778 (1988).
- 58) Y. YAMAMOTO, Y. KANDA, Y. INOUE, R. CHUJO and S. KOBAYASHI: ^1H -Nuclear Magnetic Resonance Study of 6-*O*- α -D-glucopyranosyl- α -cyclodextrin-paranitrophenol inclusion complex, *Chem. Lett.*, 495-498 (1988).
- 59) Y. KANDA, Y. YAMAMOTO, Y. INOUE, R. CHUJO and S. KOBAYASHI: High-resolution NMR study of glucosyl- α -cyclodextrin-p-nitrophenol inclusion complex in aqueous solution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2002-2008 (1988).
- 60) 小林昭一, 門間 充, 高野敏弥, 橋本 尚, 原 耕三, 石神 博, 三国克彦, 大沢武司, 橋本 仁: ヘテロ糖を含有する修飾サイクロデキストリンの製造方法, 日本特許出願, 平 1-329529 (1989).
- 61) T. FUJIWARA, N. TANAKA, K. HAMADA and S. KOBAYASHI: Structure of glucosyl- α -cyclodextrin-8H₂O, *Chem. Lett.* 1131-1134 (1989).
- 62) 小林昭一, 荒平正緒美, 中島光一: 分岐サイクロデキストリンの大量調製とその性質, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 41 (1989).
- 63) 小林昭一, 荒平正緒美: サイクロデキストリンの機能 I. サイクロデキストリンの化学反応に及ぼす影響, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 41 (1989).
- 64) S. KOBAYASHI, K. NAKASHIMA and M. ARAHIRA: Production and some properties of branched cyclomaltooligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **192**, 223-231 (1989).
- 65) 小林昭一, 中島光一, 平石賢一: 各種サイクロデキストリンの安定性, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 16 (1989).
- 66) T. FUJIWARA, N. TANAKA and S. KOBAYASHI: Structure of δ -cyclodextrin 13.75H₂O, *Chem. Lett.*, 739-742 (1990).
- 67) 中島光一, 小林昭一: パノシルサイクロデキストリンの大量調製法とその性質, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 109 (1990).
- 68) S. KOBAYASHI, K. NAKASHIMA and M. ARAHIRA: Production and some properties of branched cyclodextrins, in *Abstracts, International Symposium on Cereal and Other Plant Carbohydrates*, p. 150-151 (1990).
- 69) Y. ISHIZUKA, Y. NAKANISHI, Y. KOGURE, T. SHIRAIISHI and S. KOBAYASHI: ^1H NMR spectra of oligosaccharide substituted cyclodextrins, *J. Carbohydr. Chem.*, **10** (4), 583-592 (1991).
- 70) 中島光一, 小林昭一: (G₁)₂- α -CD の構造と CGTase の作用, 日本農芸化学会講演要旨集, p. 282 (1991).
- 71) 小林昭一, 山崎真良: 大環状内分岐サイクロデキストリンの調製とその構造, 澱粉科学, **38**, 314 (1991).
- 72) 小林昭一, 山崎真良: 内分岐大環状サイクロデキストリンを含む大環状サイクロデキストリン混合物の製造方法, 日本特許出願, 平 4-36912 (1992).
- 73) Y. INOUE, Y. KANDA, Y. YAMAMOTO, and S. KOBAYASHI: NMR study on the formation and geometry of inclusion complexes of 6-*O*-(α -maltosyl) cyclomaltohexaose and -heptaose with *p*-nitrophenol in aqueous solution, *Carbohydr. Res.*, **226**, 197-208 (1992).
- 74) S. KOBAYASHI, K. NAKASHIMA, T. TANIMOTO and K. KOIZUMI: The preparation and some properties of diglucosyl- α -cyclodextrins, in *Book of Abstracts, The Sixth International Cyclodextrin Symposium-Chicago '92*, L-19 (1992).
- [CD 関連総説, 著書]
- 75) 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの生産とその利用, 醸酵と工業, **36**, 176-183 (1978).
- 76) 小林昭一: サイクロデキストリンの生産とその利用, 筑波研究学園都市主要研究成果集, 第1集, 日本科学技術情報センター. p. 213-216 (1986).
- 77) 小林昭一: サイクロデキストリンの利用と技術的課題, 食品工業, **24**, 34-43 (1981).
- 78) 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリン研究の周辺, 化学と生物, **20**, 453-459 (1982).
- 79) 小林昭一, 貝沼圭二: サイクロデキストリンの食品への応用と課題, フレグランスジャーナル, **11**, 73-79 (1983).
- 80) 小林昭一 (共著): サイクロデキストリン, 食品の未来学, 読売新聞社, 東京, p. 102-126 (1987).
- 81) 小林昭一: サイクロデキストリンの開発とその食品工業への利用, 食品と技術, 3-9 (1987).
- 82) 小林昭一: サイクロデキストリンの開発とその周辺技術, 食品工業, **31**, 1-10 (1988).
- 83) 小林昭一: サイクロデキストリンの最新の製造とその利用, 食品加工技術, **8**, 1-10 (1988).
- 84) 小林昭一: 新しいサイクロデキストリンの開発とその応用, 日食工誌, **36**, 685-693 (1989).
- 85) 小林昭一 (共著): サイクロデキストリン合成酵素, 生物化学実験法, **25**, 213-220 (1989).
- 86) 小林昭一: 分岐サイクロデキストリンの性質とその応用, バイオサイエンスとインダストリー, **49**, 31-34 (1991).
- 87) 小林昭一: グルコシル-サイクロデキストリンの大量生産システムの開発, 研究ジャーナル, **6**, 45 (1983).

(平成5年2月9日受理)