セロオリゴ糖の簡易な調製法

佐々木 堯*・田中 崇*・貝沼 圭二*

A Simple Method for Preparation of Cellooligosaccharides

TAKASHI SASAKI*, TAKASHI TANAKA* and KEIJI KAINUMA*

Cotton cellulose powder (5 g) was dissolved in 20 ml solution of conc. H_2SO_4 -conc. HCl (1 : 1) and then 60 ml of conc. HCl was added, and it was hydrolyzed partially at 20°C for 5 hr. The produced cellooligosaccharides were recovered by cold acetone fractionation from 70 to 95%, and the yield was about 250 mg in total. The cellooligosaccharides were separated to G1, G2, G3, G4 and G5 by paper chromatography with *n*-butanol-pyridine-water (4 : 4 : 1) and the elution profile of the cellooligosaccharides by Bio-Gel P-4→P-2→P-2 series column showed a good separation of G1~G8. These results show that the cellooligosaccharides prepared by this method can be used for analytical standards of paper chromatography and filtration.

(Received Apr. 6, 1979)

セルラーゼの作用機作、セルロースの酵素分解とその利用などの研究が最近盛んに行われているが、その研究に必要な試薬の1つに標準物質としてのセロオリゴ糖がある。さらに、セロオリゴ糖はその結合から非代謝性の化合物であるが、水に可溶であることから最近デンプンからのオリゴ糖の利用と同様、応用的にも興味をもたれてきている化合物である。例えばセロビオースはさわやかな甘味を有する。

このセロオリゴ糖は、セロビオース以外は市販されておらず、従来の調製法として報告されているのは MILLER の方法¹⁾のみである。この方法は糖液調製のために、発煙塩酸を用いセルロースを溶解・分解後、炭酸水素ナトリウムで中和するという煩雑な手法である。そしてこのセロオリゴ糖の分画には、大型のカーボンセライトカラムを用いて大量のエタノール溶液で溶出するという時間のかかる方法である。しかしこの方法は大量のオリゴ糖(〜5g)を調製できる利点を有している。

しかしながら、セロオリゴ糖を標準物質として使用する生化学、酵素学においては、微量(〜50mg)で十分である。そこで、できるだけ簡単な操作によるオリゴ糖

の調製方法が望まれてきた。本論文では、上記の目的のための簡単なセロオリゴ糖の調製方法を開発したので報告する。

実験方法ならびに試薬

1. セロオリゴ糖の調製

予備実験(実験結果の項参照)の結果、次のとおりにした。セルロース粉末 5g を市販特級濃硫酸-濃塩酸(1 : 1)溶液 20ml に加え、ガラス棒を用いて低温下(5°C)で攪拌溶解した。10分後、この溶液にさらに濃塩酸 60ml を加え、攪拌しながら 20°C、5時間放置後冷アセトンを用いて分画を行い、70~95% アセトン濃度で析出してくる区分を分取した。この区分を小ガラスフィルターまたは、遠心分離により回収したのち、冷アセトンで洗浄し過剰の酸を除去した。ついでこの白色粉末を小ビーカーにとり、5ml の水に溶解したのち、0.5N 水酸化ナトリウムで pH を 5~6 に調整した。この溶液を Amberlite 1R-120(H) ついで Dowex 1(OH) の小カラムに流し、50% アセトン溶液で脱塩・溶出した後、溶出液を 5ml に減圧濃縮した。このセロオリゴ糖

* 農林水産省食品総合研究所(〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)
National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
Kannodai 2-1-2, Yatabemachi, Ibaraki

液中の糖含量は 251mg/5ml であり、低温下に貯蔵した。

2. セロオリゴ糖の分画

予備実験（実験結果の項参照）の結果、次のとおりにした。Bio-Gel P-4 → P-2 → P-2 の3連カラム（各径 2.5cm×長さ 90cm）にセロオリゴ糖液 1ml (50mg グルコース相当量) を注入し、水を用いて溶出した。溶出速度はペリスタポンプにより 30ml/hr に調節し、フラクションコレクターを用いて 4ml ずつ分画した。分画液の一部をとり、テクニコン自動分析器によりセロオリゴ糖の溶出パターンを求めた。

3. 糖の定量

全糖の定量は、フェノール-硫酸法³⁾あるいはオルシノール-硫酸法⁸⁾、還元糖の定量はソモギ法⁴⁾により行った。

4. セロオリゴ糖のペーパークロマトグラフィー

セロオリゴ糖を各 20~50 μg 相当量を東洋濾紙 No. 50 (20×20 cm) にスポットし、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:4) の溶媒系で、30℃、1夜、上昇法で展開した。風乾後、アルカリ性硝酸銀法によりセロオリゴ糖を検出した。

5. 試薬

セルロースは綿セルロース粉末 (Bタイプ、200~300 メッシュ、東洋科学株式会社製) を使用した。

Bio-Gel P-2 および P-4 は、Bio-Rad Laboratory 製 (U.S.A.)、200~400 メッシュのゲルを使用した。

標準セロオリゴ糖は MILLER の方法¹⁾ に準じて調製した。

実験結果および考察

1. セロオリゴ糖の調製法の検討

従来の発煙塩酸-中和法にかわる簡単なセロオリゴ糖の調製法について検討した。セルロース粉末 5g を市販の特級濃硫酸-濃塩酸 (1:1) 溶液 20ml に加え、ガラス棒を用いて攪拌溶解した。10分後、この溶液にさらに濃塩酸 (20~60ml) を加え、攪拌しながら 20℃、5時間放置後冷アセトンを加えると 70~95% のアセトンで白色のセロオリゴ糖が析出してきた。これを回収・脱塩し試料とした。

図1に、セルロースを溶解した硫酸-塩酸 (1:1) 溶液にさらに塩酸量を増していった場合の生成してきたセロオリゴ糖のペーパークロマトグラムを示してある。

セルロースの酸部分加水分解により生成してくるセロオリゴ糖は、硫酸と塩酸の割合が 1:1 の場合はグルコ

ース (G1)、セロピオース (G2)、セロトリオース (G3)、セロテトラオース (G4) などの他に、G2 と G3 の間に還元性を示す未同定のスポットが検出された。しかし、硫酸に対する塩酸の割合を高くしていくと、このスポットは減少し硫酸:塩酸の比率が 1:5 以上では検出されなくなる。これらの試料の中には G5 以上のオリゴ糖も含まれているが G5、G6、G7 などを良く分離する溶媒系は現在までのところ見出されていない。これに対しデンプンからのマルトオリゴ糖では簡単にペーパー上で G1 から G13 ぐらいまで分離されている⁵⁾。MILLER¹⁾ も指適しているように、この相違はセロオリゴ糖の溶解性に起因しているものと考えられる。

MILLER はセロオリゴ糖の調製に発煙塩酸を使用している¹⁾ が、この試薬は市販の濃塩酸よりもさらに比重の重いもので現在は市販されていない。従って、市販の濃塩酸に更に塩酸ガスを吹き込んで所定の比重の発煙塩酸を調製する必要がある。セロオリゴ糖調製に発煙塩酸を用いる理由は、セルロースの均一な部分加水分解のためにはセルロースを溶解する必要があるが、市販の濃塩酸では溶解せず発煙塩酸ではじめて溶解しはじめることによる。これに対し、著者らは取扱いの困難な発煙塩酸のかわりに市販の試薬でセルロースを溶解することを検討し、濃硫酸と濃塩酸の組合せで代行できることを明らかにしたわけである。ここで問題になったのは硫酸:塩酸の比率が 1:1 の時には、図1にもあるように未知物質

Fig. 1. Paper chromatogram of cellobiosaccharides prepared by H_2SO_4 -HCl-Acetone Method

1. Standards
- 2~5. Cellobiosaccharides prepared by H_2SO_4 -HCl-Acetone Method
2. H_2SO_4 1: HCl 1
3. H_2SO_4 1: HCl 3
4. H_2SO_4 1: HCl 5
5. H_2SO_4 1: HCl 7

が G2 と G3 の間に検出されたことである。この未同定の物質は イソセロビオース あるいは誘導体 ($-SO_4$) のような物質と考えられる。この物質の生成は、本研究のためには不都合であり硫酸の割合を相対的に減少させることにより防ぐことができた。

生成したセロオリゴ糖の酸溶液からオリゴ糖を分離するのに MILLER は中和法を用いているが、この方法では多量に生成した塩の処理が大変である。著者らはこの点を改良するために簡単な有機溶媒によるセロオリゴ糖の回収法について検討し、セロオリゴ糖はアセトン沈殿により回収することができることを明らかにした。もちろん MILLER 法の発煙塩酸でセロオリゴ糖液を作り、著者らのアセトン法により回収することもできよう。

2. セロオリゴ糖の分画法

MILLER はセロオリゴ糖の分画に大型のカーボン-セライトカラムを用いているが、本実験では簡略化のためにゲル濾過法によるオリゴ糖の分画について検討した。

図2に示したように、Bro-Gel P-4 → P-2 → P-2 の3連カラム (各径 2.5 cm × 長さ 90 cm のサイズ) にセロオリゴ糖 1 ml (50 mg グルコース相当量) を注入し、水を用いて溶出した。溶出速度はペリスタポンプにより 30 ml/hr に調節し、フラクションコレクターを用いて 4 ml ずつ分画した。分画液の一部をとり、テクニコン自動分析機によりセロオリゴ糖の溶出パターンを求めた。

その結果は図3に示したように、G1 から G8 のセロオリゴ糖を分画することができ分離も良好であった。本法で調製したセロオリゴ糖は G3, G4, G5 を主体としており、G6, G7, G8 と減少している。これは MILLER の方法でも同様の結果であり、G7 以上になると急激に溶解度が低下するためと考えられる。

分画されたセロオリゴ糖区分は、各々凍結乾燥後白色粉末として得られ、MILLER 法との比較ならびにペーパークロマトグラフィー、D.P. 分析等により同定した。

本法と MILLER の方法との比較を表1にまとめているが、カーボン-セライトカラムに対し Biol-Gel カラム

Fig. 2. Separation and analysis of cellooligosaccharides

Fig. 3. Elution profile of cellooligosaccharides from Bro-Gel. P4 → P2 → P2 column

は取扱いが簡単であり、用いる溶出液で洗浄するだけで繰返し使用することができる。そして G1 から G8 まで溶出するのに MILLER 法の 1/10 溶出液で済み、カーボン-セライトカラムと同様良好な分離を示している。カラムの分離能は本条件下では 50 mg が最適であり、これ以上の試料を流した場合は分離が悪くなるが、目的とする区分の再クロマトにより簡単に単離できる。

本法および MILLER 法の分離可能なセロオリゴ糖は共に G1 から G8 までであり G9 以上になると検出されなくなる。

この点セロオリゴ糖は、澱粉から調製されるマルトオリゴ糖とは大きな違いがある。貝沼⁶⁾はマルトオリゴ糖を Bio-Gel P-6 → P2 カラムを用いて G1 から G25 まで分離できることを明らかにしている。

このように同じ大きさのオリゴ糖でも、 α -1,4-結合のものと β -1,4-結合のもので溶解度に大きな違いがあるのは興味深い。

以上のことから、本法は分析用セロオリゴ糖 (～100

Table 1. Comparison of the Methods

	SASAKI <i>et al</i>	MILLER
Materials	Cellulose Powder (Toyoroshi)	Cellulose Powder (Whatman)
Acid	HCl-H ₂ SO ₄	Fuming HCl
Acid-removal	Acetone (70-95%)	NaHCO ₃
Column	Bio-Gel P-4, P-2	Carbon-Celite
Eluant	H ₂ O, 1 l	40% Ethanol, 10 l
Assay	Orcinol-H ₂ SO ₄	Orcinol-H ₂ SO ₄
Distribution	G1~G8	G1~G8
Character	Analytical (10 mg~) Semi-preparative (~100 mg) Standard reagents	Preparative (~5 g)

mg) の調製に適しており、硫酸-塩酸-アセトン法により調製したセロオリゴ糖液はそのままペーパークロマトグラムなどの分析用標準物として使用できる。さらに目的により Bio-Gel P 4-P 2-P 2 カラムにより簡単にオリゴ糖の溶出パターンを求めることができ、同時に各々のオリゴ糖を回収し分析用に供することができる。これに対して MILLER の方法は、大量に各々のセロオリゴ糖 (～1g) を調製するのに適している。

要 約

セロオリゴ糖の簡易な調製法ならびにその分画法を開発した。セルロース粉末 5g を濃硫酸-塩酸 (1:1) 20 ml に溶解後、濃塩酸 60 ml を加え、20°C, 5 時間部分加水分解したのち、冷アセトン (70～95% 分画) を用いてセロオリゴ糖を回収した。セロオリゴ糖の収量は約 250 mg であり、ペーパークロマト用の標準物質として用い、更に次のゲル濾過法により各々のオリゴ糖を調製

することができる。

セロオリゴ糖 50 mg を Bio-Gel P 4→P 2→P 2 の 3 連カラム (各 2.5×90 cm) に注入し、30 ml/hr の流速で水を用いて溶出することにより、G 1 から G 8 までのセロオリゴ糖を分離することができた。

文 献

- 1) MILLER, G.L.: *Methods in Carbohydrate Chemistry III, Cellulose*, (Academic Press), 134 (1963).
- 2) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P.A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 3) FERNELL, W.R. and KING, H.K.: *Analyst*, **78**, 80 (1953).
- 4) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 5) KAINUMA, K., NOGAMI, A. and MERCIER, C.: *J. Chromatogr.*, **121**, 361 (1976).

(昭和 54 年 4 月 6 日受理)