ソバ種子中の水溶性 α -グルカンの構造[†]

加藤宏治*, 韋 保耀**, 松永佳代子*, 山内 亮*, 上野良光*

Chemical Structure of α -D-Glucan in the Seed of Buckwheat
(*Fagopyrum esculentum*)Koji KATO,* Baoyao WEI,** Kayoko MATSUNAGA,* Ryo YAMAUCHI*
and Yoshimitsu UENO**Department of Food Science, Gifu University
(1-1, Yanagido, Gifu 501-11, Japan)**The United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University
(1-1, Yanagido, Gifu 501-11, Japan)

The polysaccharide composed of only D-glucose was extracted with cold water from the endosperm of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and purified through a column of DEAE-Sephadex A-50 (Cl⁻ form). It was revealed to be a phytoglycogen from the results of IR-analysis, methylation study, and enzymic hydrolysis.

The weight average molecular weight of the polysaccharide was determined to be about 14,800 by gel chromatography. β -Limit dextrin prepared from the polysaccharide was digested with pollulanase and then isoamylase. A ratio of maltose and maltotriose to higher oligosaccharides in the digest supported Meyer's model for the structure of this polysaccharide.

これまでわれわれはイネ科に属するヒエ、アワ、キビおよびモロコシの種子胚乳部から冷水で抽出されるフィトグリコーゲンの構造について報告してきた¹⁻⁴⁾。これからフィトグリコーゲンの単位鎖長分布測定の結果から、起源の異なるフィトグリコーゲンの中には単位鎖長分布の異なるものが存在するのではないかと推定された。そこでイネ科とは異なるタデ科に属するソバ種子の水溶性 α -グルカンを検索し、その構造について実験を行ったのでその結果を報告する。ソバ種子の水溶性多糖については藤巻ら⁵⁾の硫安による分画、イオン交換クロマトグラフィーによる分画で得られる画分の化学的性質について報告があるが、詳細な化学構造については報告されていない。

実験材料・方法および結果

1. 試 料

市販のソバ (*Fagopyrum esculentum*) 種子を粉碎機で粗挽きし皮殻部を取り除いたのち、クロロホルム・メタノール (1:1) を加え1時間加熱還流し脱脂した。脱脂物は風乾したのちボールミルにより粉末状とし実験に供した。なお、皮殻部を除いた後の一般分析の結果は水分 13.1%, 粗タンパク 14.5%, 粗脂質 3.5%, 粗繊維 0.3%, 灰分 1.8% であった。

2. 水溶性多糖の抽出

脱脂粉末状としたソバ種子からイネ科種子胚乳部の場合と同じようにして冷水にて水溶性多糖を抽出した。抽出物は透析に供し低分子化合物を除去したのち凍結乾燥し、粗水溶性多糖とした収率 1.03%, 糖含量 (グルコースとして定量) 48.7% (Glu 57.4, Gal 18.6, Man 5.5, Ara 6.8, Xyl 6.8, Rha 4.9%), タンパク質含量 54.0 %。

† 穀類の水溶性多糖に関する研究 (第6報): 第5報は文献4)

* 岐阜大学農学部食品科学講座 (501-11 岐阜市柳戸 1-1)

** 岐阜大学大学院連合農学研究科生物資源利用学連合講座 (501-11 岐阜市柳戸 1-1)

Table 1. Some properties of the fractions eluted from DEAE-Sephadex A-50 column.

Fraction	Eluant	Yield (%)	Sugar (%)	Protein (%)	$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.3, in M/10 NaCl)	Sugar constituent (%)			
						Ara	Xyl	Gal	Glu
A	H ₂ O	7.1	57.5	46.9	+144	—	—	—	100
B	M/2 NaCl	57.0	18.1	83.5	-47	21	18	54	8
C	M/10 NaOH	4.3	66.3	10.4	+6	5	27	68	—

Fig. 1. Elution profile of water-extract of buckwheat from DEAE-Sephadex A-50 (Cl⁻-form) column.

Naming of fractions (A, B and C) corresponds to that of Table 1. —, Absorbance at 490 nm (phenol-sulfuric acid method); ----, Absorbance at 280 nm.

3. 粗水溶性多糖の DEAE-セファデックスカラムによる分画

粗水溶性多糖 (500 mg) を少量の水に溶解したのち DEAE-セファデックス A-50 カラム (Cl⁻ 型, 7.0×26 cm) に供し, 純水 (A), M/2 NaCl (B), M/10 NaOH (C) を用いて順次溶出させた。溶出液の糖含量とタンパク質含量はフェノール・硫酸法および 280 nm における吸光度より求めた。その結果を Fig. 1 に示した。また各溶出液で得られたピークに相当する画分は合わせたのち 3 M 塩酸で微酸性とし, セロファンチューブを用いて流水に対して 48 時間透析した。透析内液は凍結乾燥したのち, 諸性質について検討した。その結果を Table 1 に示した。

4. α-グルカンの単離 (画分 A の除タンパク)

画分 A (100 mg) を純水 (200 ml) に溶解し, 沸騰湯浴中で 1 時間加熱した。放冷後 M/10 水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整しプロナーゼ (1 mg, 科研化学製) 処理を行った。反応が進むにつれ pH の低下が認められたので, 時折同水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整した。24 時間後さらに 0.5 mg のプロナーゼを加え pH の低下が認められなくなるまで 48 時間反応を続けた。次いで

Fig. 2. Gel chromatography of fraction A before (●) and after (○) pronase-treatment by Sepharose CL-6B column.

反応液は, 沸騰湯浴中に 30 分間保持し酵素を失活させたのちセロファンチューブを用いて流水に対し 2 日間透析した。透析中に生じた沈澱を濾別したのち, 内液を濃縮し, これより多糖をアルコール沈澱により回収した。沈澱物は再び少量の水に溶解したのち凍結乾燥し, 白色粉末状の多糖 43 mg (全糖量 96.0%) を得た。この多糖およびプロナーゼ未処理の画分 A を後述するように Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーに供し, 糖についてその溶出パターン (Fig. 2) を比較したところ変化は認められなかった。このことから多糖は低分子化しておらず, したがって画分 A の多糖は糖タンパクではないと判断した。さらにこの多糖は $[\alpha]_D^{25} + 162$ (c=0.3, M/10 NaCl 水溶液) を示し, 完全加水分解でグルコースのみを与え, IR 分析で 850 cm⁻¹ にタイプ 2a の吸収が認められたことから α-グルカンであると推定した。

5. ヨウ素複合体の吸収スペクトル

多糖 0.01%, ヨウ素 0.02%, ヨウ化カリウム 0.2% の濃度でヨウ素反応を行い, その吸収極大を測定したところ, 565 nm という結果が得られた。これはトウモロコシのアミロペクチン(東京化成)の 530 nm とアミロース DP 100 (Sigma Chemical) の 595 nm の間に位置することから, この多糖 α-(1→4) 結合鎖は比較的長

Fig. 3. Chain-length distribution of the unit chain of the α -D-glucan.

いと判断した。

6. 分子量の測定

多糖 (5 mg) を少量の M/10 塩化ナトリウム溶液に溶解したのち、Sephacrose CL-6B カラム (Pharmacia 製, 1.5×87 cm) に供し、前報¹⁻³⁾に従って重量平均分子量を求めたところ 14,800 と算出された。

7. メチル化分析

多糖 (5 mg) を箱守法によりメチル化したのち、常法に従いアルジトールアセテートとし GLC 分析に供した結果、2,3,4,6-tetra-, 2,3,6-tri- および 2,3-di-O-methyl-D-glucitol のアセチル誘導体を 1.00 : 13.36 : 0.93 の面積比で検出した。以上の結果からこの多糖は (1 $\rightarrow$ 4) 結合を主鎖とし (1 $\rightarrow$ 6) 結合で分岐した α -グルカンであることが確認された。また部分メチル化アルジトールアセテートの比率よりこの多糖の平均鎖長を 15.3 と算出した。

8. 単位鎖長の分布

多糖 (60 mg) を *Pseudomonas* sp. 起源のイソアミラーゼ (240 units, 天野製薬) で処理し分岐点の α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合を切断した。反応液の一部を後述するような条件で β -アミラーゼ分解に供して分解限度を求めたところ 100% となり、完全に α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合は切断されたとみなすことができた。また反応液の一部をメチル化分析に供したところ分岐点に相当するジメチル誘導体は検出されず、これからも (1 $\rightarrow$ 6) 結合による分岐はイソアミラーゼにより完全に切断されたことが確認された。残りの反応液はできるだけ少量まで濃縮したのち、Toyo-pearl HW-50S カラム (東ソー, 1.5×90 cm) に供した。溶出液の全糖量および還元糖量 (還元末端残基量) を、それぞれフェノール・硫酸法および Nelson-Somogyi 法で測定し重合度を求めた。結果は Fig. 3 に示した。これからこの多糖の単位鎖は重合度 15~20 の成分が最多

Fig. 4. Elution profile for isoamylase-pullulanase digest of the β -limit dextrin prepared from the α -D-glucan.

であることがわかった。

9. β -アミラーゼ分解

多糖 (100 mg) を *Bacillus* sp. 起源の β -アミラーゼ (620 units, 天野製薬) で分解率が一定になるまで分解した (65.7%) のち、常法に従い β -リミットデキストリン (β -LD) をアルコール沈澱で回収した (収率 21.3%)。このデキストリンを前述の方法でメチル化分析したところ、2,3,4,6-tetra-, 2,3,6-tri- および 2,3-di-O-methyl-D-glucitol のアセチル誘導体が 1.00 : 5.30 : 1.10 の割合で検出された。これよりこの β -LD の平均鎖長を 7.4 と算出した。

10. β -LD の鎖長分布

前述の β -LD (平均鎖長 7.4, 40 mg) を *Klebsiella* sp. 起源のプルラーゼ (240 units, 天野製薬) および *Pseudomonas* sp. 起源のイソアミラーゼ (240 units, 天野製薬) で処理、分岐点の α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合を切断した。反応液の一部をとり、前述の方法により、 β -アミラーゼ分解を行い分解限度を求めたところ 92.0% となり、このことから β -LD の α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合はほぼ完全に加水分解されたものとみなした。残りの濾液はできる限り少量まで濃縮したのち、50°C に保温した Bio-Gel P-2 カラム (Bio-Rad 社, 2.5×90 cm) に供した。溶出液の糖量をフェノール・硫酸法で測定した結果を Fig. 4 に示した。図からも明らかのように、重合度 2 (マルトース) から 6 までのマルトオリゴ糖を確認することができたが、マルトースとマルトトリオースの含量が他のオリゴ糖に比較して高いことがわかる。また、重合度 2 および 3 の画分の還元末端基量 (A) と重合度 4 以上の画分の還元末端基量の和 (B) の比 (A/B) がほぼ 1.2 であり、さらにマルトースとマルトトリオースのモル比はほぼ 1.0 であった。このことからこの多糖は Meyer のモデルに

近い構造を有し、A鎖の鎖長は奇数、偶数はほぼ同数から成っていると判断した。

考 察

ソバ種子胚乳部から冷水で抽出される α -グルカンを、ヒエ、アワなどの場合と同じように DEAE-セルロースカラム (ハウ酸型) で精製することを試みたが、回収率が極めて低かったので DEAE-セファデックスカラムにより精製を行った。さらに除タンパク操作を行い単離した α -グルカンは重量平均分子量 14,800、平均鎖長 15.3 の分岐多糖であることがわかった。14,800 という分子量は、先にわれわれが報告したヒエ、アワ、キビ、モロコシ由来のフィトグリコーゲンの分子量に近い値である。しかし、15.3 という平均鎖長は同フィトグリコーゲンの平均鎖長 (約 7) や、アミロペクチンの平均鎖長 (20~25) とかけ離れ、酵母起源 (11~14) やウサギ起源 (12~14) のグリコーゲンに近い値である。

また、 α -グルカンを β -アミラーゼで処理して得られる β -LD の平均鎖長は 7.4 であり、このことから、この多糖は非還元末端基から分岐点までの鎖長 (外部鎖長) が、ヒエ、アワなどのフィトグリコーゲンのそれに比べ長いことがわかった (アワ²⁾ のフィトグリコーゲンの β -アミラーゼ処理による平均鎖長の変化は 7.05→5.24 である)。このことは、この多糖の β -アミラーゼによる分解限度 (65.7%) が、ヒエ¹⁾ (37.3%)、アワ²⁾ (38.1%)、キビ³⁾ (39.2%)、モロコシ³⁾ (37.7%) などのフィトグリコーゲンの分解限度に比較して高いことから支持されるであろう。

さらに、 β -LD のプルラーゼおよびイソアミラーゼ分解で得られるオリゴ糖の分布 (Fig. 4) をみると、重合度 2 および 3 のオリゴ糖を除けば比較的重合度の高いオリゴ糖が重合度の低いオリゴ糖よりも多く存在していることがわかる。ヒエ、アワなどにおいてはこのような偏りが観られず、したがってこの多糖の内部鎖長も外部鎖長同様、ヒエ、アワなどのそれに比べて、より長いということがわかった。このことは、1) β -LD の平均鎖長はおもに内部鎖長を反映しているということから、ソバ由来のフィトグリコーゲンの方がアワ由来のフィトグリコーゲンよりも 2 残基分 (両者の β -LD の平均鎖長の差) ほど内部鎖長が長くなっている。2) β -アミラーゼによる分解限度を用いて求めた平均内部鎖長が、アワでは 1.4 であるのに対してソバでは $\{15.3 - (15.3 \times 0.657 + 2) - 1\} = 2.2$ である、ということからも支持されるであろう。

また、この多糖をイソアミラーゼ処理、枝切のした後の生成物をゲルクロマトグラフィーに供して求めた単位鎖長は 3~40 と広く分布している (Fig. 3) もの、重合度 15~20 の成分が多く含まれていることが判明した。この値はアワ、キビ、モロコシで認められた 10~17 の成分に相当するものか、あるいは起源によって多成分の重合度がわずかながら変化するというを示唆しているのかもしれない。起源の異なる水溶性 α -グルカン (フィトグリコーゲン) をさらに広く検討してみる必要がある。

要 約

ソバ種子胚乳部から水で抽出され、DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーにより精製されたグルコースのみから成る多糖はゲルクロマトグラフィー、IR 分析、メチル化分析、酵素分解の結果から、重量平均分子量 14,800、平均鎖長 15.3 の α -グルカンであると同定した。さらにこの多糖を β -アミラーゼで処理し調製した β -リミットデキストリンをイソアミラーゼおよびプルラーゼで分解し、その分解物の鎖長分布を求めた。マルトースとマルトトリオース (A) および重合度 4 以上の画分 (B) の末端基量の比 (A/B) が約 1.2 であること、またマルトースとマルトトリオースの量比がほぼ 1:1 であったことから、この多糖は Meyer のモデルに似た構造を有し、A鎖の鎖長は偶数、奇数はほぼ同数から成っていると判断した。

本研究の一部は飯島記念食品科学振興財団の援助を受けて行ったものであります。同財団に対し深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 加藤宏治, 牧野正司, 高木康好, 堀部厚子, 山内亮, 上野良光: 澱粉科学, **36**, 177-180 (1989).
- 2) 加藤宏治, 牧野正司, 鬼頭千賀子, 山内亮, 上野良光: 澱粉科学, **36**, 245-248 (1989).
- 3) 加藤宏治, 坂井和美, 渡辺美依子, 山内亮, 上野良光: 澱粉科学, **37**, 35-37 (1990).
- 4) 加藤宏治, 牧野正司, 山内亮, 上野良光: 澱粉科学, **38**, 23-26 (1991).
- 5) 藤巻正生, 五十嵐修, 浅野克彦: 農化, **43**, 625-630 (1969).

(平成 4 年 3 月 6 日受付, 平成 4 年 5 月 6 日受理)