〔農化 第 36 卷, 第 9 号, p.774~777, 1962〕

温州みかんペクチンに随伴する非ウロナイド質について*

広 田 致 (静岡県工業試験場)

昭和 37 年 2 月 12 日 受 理

1. 緒 言

ペクチンを加水分解するとガラクトシュロン酸の他にアラビノース, ガラクトースなどを生ずる. これらの糖の生成はペクチンの構造決定に対して長い間かなりの混乱をあたえた⁽¹⁻⁸⁾. しかしその後, これらの糖の生成量はペクチンの原料植物の種類, 熟度, ペクチン製法などによってかなり異なること, また精製によってこれらの糖をほとんど含まないペクチンの得られることが分った^(4,5). さらにその後の研究により, ペクチンの主体はポリガラクトシュロン酸の部分的にメチルエステル化されたものであって, これにアンバン, ガラクタン等の多糖類が数%ないし数十%伴なわれていると考えられるに至った^(2,3,6).

これらの非ウロナイド性糖類の随伴形式は現在まだ十分には明らかでない⁽⁷⁾. このものの一部は分別沈殿などの方法で除かれる^(2,4)ので, これは単に混合しているかあるいは主鎖に水素結合などで結びついているが, 他の一部は主原子価⁽⁸⁾, おそらくエステル結合を以て結び付き⁽⁹⁾, あるいは主鎖中に又は側鎖としてグリコシド結合している^(10,11)と考えられている. しかしこの非ウロナイド質の随伴形式もペクチンの種類によって差違があると思われる.

著者は静岡県産温州みかん果皮から鉄塩沈殿法⁽¹²⁾によって作ったペクチンについて, 随伴糖類の種類及び生成経過をしらべ, またこれらがペクチン主鎖とどのような結合状態にあるかを推定した.

2. 実 験

1. 試料 温州みかん果皮から次のようにして鉄塩沈殿法⁽¹²⁾により遊離ペクチニン酸粉末を作った. すなわち天日乾燥した温州みかん果皮 500 g を約 70° の温水 3 l ずつで 4 回, さらに冷水で 4 回洗って水溶性の糖類, 色素を除いた後, 水 5 l を加え, 濃塩酸約 20 ml を加えて pH 2.0 にする. 攪拌しながら 75~80° に 1.5 時間保った後, 冷水 5 l を加える. 約 60 メッシュのナイロン網を通して粗いかすを除き, ついで遠心沈殿及び遠心濾過により細かなせんい分を除く. 濾液に炭酸ソーダ液を加えて pH 2.5~3 にした後, 強く攪拌しながら 0.2 M の塩化第二鉄液及び炭酸ソーダ液の各々 300 ml を少量ずつ同時に添加する. ペクチンは鉄イオンと結合し気泡を含んで浮上する. ナイロン濾布でこの凝析物をこし取り, 洗液から黒褐色のなくなるまで水洗し, 圧搾, 遠心脱水する. 含鉄ゲル 300~400 g. これを 10 メッシュ位の塊にくだき, 濃塩酸 2% を含むメタノール約 1.5 l 中に 1 夜浸した後, 同じ塩酸濃度の 70% メタノールでくりかえし洗って鉄を完全に除く. ついで 70% メタノール, さらに純メタノールで洗って塩酸及び水分を除く. 圧搾後常温で通風乾燥し, 粉碎して 35~40 g の粉末ペクチンを得る. このものの分析値⁽¹³⁾は無水物に対し, 灰分 0.314%, エステル化度 63.6%, ペクチニン酸量 P-Ca 90.1%, P-titr. 80.4%, $[\eta]$ (0.1 M NaCl 中 25°) 3.28 であった.

2. ペクチンの酸性加水分解 試料ペクチンの 1% 水溶液 100 ml に 0.5 N HCl 20 ml を加え (塩酸濃度約 0.085 N) 沸とう水浴中で加熱する. 所定時間後, 冷して塩酸を当量の炭酸銀で除いた後, アルコールを濃度 70 v % になるまで加えて, 沈殿する残存ペクチン分を遠心除去し, 液相を 40~50° で減圧濃縮して 10 ml にした. 加水分解時間が長く, 液が褐色を呈するものは活性炭約 0.1 g を用いて脱色した.

3. 生成糖のペーパクロマトグラフィーによる定性および定量 上記濃縮液の 5~50 μ l (その糖含量に応じて適宜増減) を濾紙 (東洋 No. 51, 40×40 cm) 上にスポットする. 展開溶剤としてはフェノール-水 (77:23)⁽¹⁴⁾ 及び酢酸エチル-ピリジン-水-酢酸 (5:5:3:1)⁽¹⁵⁾ を用いた. なお後者の溶剤による糖の R_F 値はイソプロピルアルコール-ピリジン-水-酢酸 (8:8:4:1)⁽¹⁶⁾ によるものと極めてよく似ているが, 分離の点において勝っていた.

展開を終った濾紙を風乾した後, オルソフタル酸 1.66 g, アニリン 0.91 ml を *n*-ブタノール 48 ml, エーテ

* Non-galacturonide Constituents of Citrus Unshu Pectin.
By Itaru HIROTA (Shizuoka Industrial Research Institute)

ル 48 ml, 水 4 ml の混合溶剤に溶かして作った発色液中を敏速に潜らせ, 風乾した後, 105°, 10 分間加熱する。

発色したスポット及びブランクを同面積ずつ切り取り, 塩酸濃度 0.7 N の酸性 80% アルコール 10 ml を加えて 1 時間色を浸出し, 糖を光電比色定量した⁽¹⁷⁾。ただしペーパー上で他糖のスポットと接近または重複するのを避けるため, アラビノース, グルコース, フラクトースについてはフェノール系溶剤で, ガラクトース, キシロース, ラムノース, ガラクチュロン酸については酢酸エチル-ピリジン系溶剤で展開したクロマトグラフを用いて定量した。

4. 非ウロナイド質の分離 非ウロナイド性糖類のうち, ペクチン主鎖にエステル結合しているものの大約の量を知るため, 次のように試料をアルカリ鹼化してエステル結合を切った後, 硫酸銅によりポリウロナイド部分を選択的に沈殿させた。

すなわち 1% ペクチン液 500 ml に 25° で 0.5 N カ性ソーダ 100 ml を加え, 25° で 1 時間放置後, 2 N 硫酸を加えて pH 5~6 にし, 水を加えて 2 l にする。また対照のため, 別にアルカリ鹼化しない 1% ペクチン液に水を加えて 2 l にしたものを用意する。

この 2 種のペクチン液にそれぞれ 0.1 M 硫酸銅 150 ml を強い攪拌下に加え, 生じた沈殿を遠沈法により集めて水洗する。この含銅沈殿を細かくくんで水 500 ml 中に分散させ, 硫酸約 20 g を加え, さらにアルコールを濃度 60% になるまで加える。遠心分離して得た沈殿はガラスフィルター中でさらに硫酸 3% を含む 60% アルコールで銅を完全に洗い落し後, 純アルコールで洗って硫酸を除く。この沈殿を常温で減圧乾燥してペクチンフラクション (F. I) とする。

次に銅を含む硫酸酸性アルコール洗液 (約 3 l) は 40~50° で減圧濃縮してアルコールの大部分を除いた後, 炭酸バリウムを加えて硫酸を除き, 濾過して濾液をアンバーライト IR-120 (H) を通して銅を除く。再び炭酸バリウムで硫酸を除いた後, 濾液を減圧下 40~50° で濃縮して 25 ml とする。これをアルコール可溶性酸性多糖体フラクション (F. II) とする。

また, 最初含銅ペクチン沈殿を分けた際の遠心上澄液及び洗液 (計約 3 l) は減圧濃縮した後, IR-120 (H) 及び炭酸バリウムで処理して硫酸銅を除き, さらに減圧濃縮して 25 ml にする。これを中性多糖体フラクション (F. III) とする。

5. 各フラクションの成分検索 上記各フラクション中の糖をペーパークロマトグラフから定量する。また各フラクションを硫酸濃度 0.2 N で 100°, 6 時間処理して含まれる多糖類を加水分解し, 炭酸バリウムで硫酸を除いた後, 同様の定量を行なう。

3. 結果及び考察

1. ペクチンの加水分解に伴う糖の生成 ペクチンの加水分解によって生成すると考えられる単糖類及びガラクトチュロン酸を 2 種類の溶剤で展開させ, 酸性フタル酸アニリンで発色させたときのスポットの色調及び R_F の実測値は第 1 表のとおりであった。このデータをもとにして, ペクチンの加水分解により生ずる糖の検索を行なった。

まず随伴糖類の種類をしらべるために, 塩酸濃度 0.085 N, 温度 100°, 30 時間加水分解した液について二次元展開を行なった結果は第 1 図の通りであった。すなわちペクチン主鎖の崩壊によって生ずるガラクトチュロン酸, ジガラクトチュロン酸の他に, アラビノース, ガラクトース, ラムノース, キシロース, グルコース, フラクトース

第 1 表 基準糖類の色調及び R_F

糖	酸性フタル酸アニリンによる色調	R_F	
		酢エチ, ピリジン, 水, 酢酸展開	水飽和フェノール展開
D-グルコース	紫 褐	0.44	0.40
D-ガラクトース	"	0.40	0.44
D-マンノース	"	0.49	0.45
D-フラクトース	淡灰褐	0.47	0.52
L-アラビノース	赤 紫	0.49	0.56
D-キシロース	"	0.54	0.46
L-ラムノース	灰 褐	0.63	0.61
D-ガラクトチュロン酸	赤 褐	0.18	0.15
ジガラクトチュロン酸	"	0.04	—

及び未確認の一つの糖の存在が認められた。このうちガラクトース, アラビノースは古くからペクチンに随伴することが知られていたが, ラムノース, キシロース, グルコースなども最近はいろいろなペクチン質の中から見出されている⁽¹⁸⁾。したがって温州みかんペクチンも構造的, 組成的に他の多くのペクチンと共通の点が多いと思われる。なお未確認の糖はクロマトグラフ上の色調及び R_F の高いことからモノメチル

第1図 ペクチン加水分解物の二次元ペーパークロマトグラフィー

1. ガラクトース, 2. アラビノース, 3. ラムノース, 4. キシロース, 5. グルコース, 6. フラクトース, 7. ガラクチュロン酸, 8. ジガラクトチュロン酸, 9. 未確認

の生成量は、ガラクトース>ラムノース、アラビノース>キシロースの順であった。またこれらの生成速度はアラビノース>>ガラクトース、キシロース>ラムノースの順で、アラビノースの生成は殊に速やかであった。これはアラビノースが他のペクチンの場合同様、加水分解されやすい構造のアラバン^(4,5,20)から生ずるためであろう。またラムノースとガラクトチュロン酸の生成はややおくれ、約2時間後にはじめて濾紙上に検出された。この生成のおくれについては改めて検討する予定である。なおグルコースとフラクトースは、濾紙上での定量が困難なため、第2図には記さなかったが、それらの生成速度は少なくともアラビノースのように速やかではなかった。

2. 非ウロナイド性多糖類の存在形式 非ウロナイド性多糖類のペクチン中における存在の形としては、1) 物理的な混合, 2) ペクチンのカルボキシルにエステル状に結合(側鎖形成), 3) ペクチン主鎖にグリコシド結合(側鎖形成または主鎖内に介在), の三つが考えられる。このうち物理的に混合しているものは、弱酸性下で硫酸銅によりポリウロナイドを沈殿除去する^(21,22) ことによって分離されるはずである。またエステル結合している部分は常温でのアルカリ鹼化によって切れて混合状態になるから、やはり硫酸銅によって分離されるであろう。しかしグリコシド結合しているものはふつう常温でのアルカリ処理では切れないでペクチン主鎖に結合したままであると思われる。このようにしてペクチンを分別して、それらを構成する糖を定量した結果は第2表の通りであった。

第2表 ペクチン分別物の構成糖類*

	未 鹼 化 試 料			鹼 化 試 料		
	F I	F II	F III	F I	F II	F III
ア ラ ビ ノ ー ス	1.42(—)	—(—)	0.01(0.01)	1.08(—)	—(—)	0.30(0.01)
ガ ラ ク ト ー ス	3.51(—)	—(—)	0.23(—)	2.79(—)	—(—)	0.85(0.01)
キ シ ロ ー ス	0.20(—)	—(—)	—(—)	0.17(—)	—(—)	±(—)
ラ ム ノ ー ス	0.39(—)	—(—)	—(—)	0.35(—)	±(±)	±(—)
グ ル コ ー ス	+(—)	0.26(0.11)	—(—)	—(—)	2.15(0.49)	—(—)
フ ラ ク ト ー ス	+(—)	0.11(0.02)	—(—)	—(—)	1.44(0.19)	—(—)
ガ ラ ク チ ュ ロ ン 酸	3.50(—)	±?(—)	—(—)	3.42(—)	—(—)	—(—)
ジガラクトチュロン酸	±(—)	—(—)	—(—)	±(—)	—(—)	—(—)

* 数字は原料ペクチンに対する糖の収率%, —はペーパー上に検出されなかったもの, ±は極めて少量で定量できなかったもの, +は存在は確かだが他糖の存在に妨げられて定量できなかったもの。

この表において、左欄はアルカリ鹼化してないペクチンについての分別結果、右欄はアルカリ鹼化してエステル結合を切ったあとの分別結果である。F. III, II, I はそれぞれペクチンに混合状態に含まれる非ウロナイド性多糖体、同じく混合状態の酸性多糖体(低分子量)、及びグリコシド結合する糖を含むペクチンと考えられる。またカッコ内の数字は各フラクション中に含まれている単糖量、カッコ外の数字はこのフラクションを酸加水分解

第2図 ペクチンの酸加水分解による単糖類の生成

1. ガラクトース, 2. アラビノース, 3. ラムノース, 4. キシロース, 5. ガラクチュロン酸

糖^(11,19)の一つと思われるが確認しなかった。

次にこれらの糖の生成量及び生成速度をしらべた結果を第2図に示す。すなわちガラクトチュロン酸を除く中性糖類

解 (0.085 N HCl, 100°, 6 時間) して得られる単糖量であるから, このフラクション中の多糖体から出る単糖が加わっている。

そこでこのデータから次のことが推定される。すなわちアラビノースは単糖としても多糖体としても混合状態ではほとんど存在しないが, 一部は多糖体 (おそらくアラバン) の形で主鎖にエステル結合しており, 大部分はグリコシド結合していると思われる。

ガラクトースは多糖体 (おそらくガラクタン) の形で若干混合状態及びエステル結合状態にあり, 大部分はやはりグリコシド結合していると思われる。

グルコース, フラクトースは主に多糖体としてエステル結合しているようである。この多糖体は銅イオンによってペクチンと共に沈殿し, アルコールに溶けるところから分子量の低い酸性多糖体と思われるが, ガラクチュロン酸の存在は明らかでなかった。このものの構造についてはさらに改めて検討したい。

キシロース, ラムノースについては量が少なくあまり確実ではないが, 混合及びエステル結合状態のものはほとんどないようであった。

なお上述のような, ペクチン主鎖にグリコシド結合すると思われる糖は単糖, 多糖の何れの形であるかは分らなかった。

4. 要 旨

温州みかんペクチン (鉄塩沈殿法により調製) を酸性加水分解してガララクチュロン酸の他にガラクトース (6%), アラビノース (1.4%), ラムノース (1.8%), キシロース (0.4%) 及び若干のグルコース, フラクトースが生成した。これらのうちアラビノースの生成は他のものに比べてはるかに速やかであった。

次にこれらの非ウロナイド質の随伴状態をしらべるために, 試料ペクチンをアルカリ鹼化ついで弱酸性下で硫酸銅による分別を行なった。その結果, (1) ガラクトースの一部はガラクタンの形で混合し, (2) アラビノース, ガラクトースの一部はアラバン, ガラクタンの形でペクチン主鎖にエステル結合し, (3) さらにこの 2 つの糖の大部分及びラムノース, キシロースはグリコシド結合を以て主鎖に結び付き, (4) グルコースとフラクトースとは多糖体として主にエステル結合していることを推定した。

本研究に対し御鞭撻, 御助言を賜った東北大学理学部藤瀬新一郎教授, 同工学部三井生喜雄教授, 東北区水産研究所谷井藩部長に, また分析を担当した当試験場大村幸雄技師に厚く感謝する。

(1) Z.I. Kertesz : "The Pectic Substances", Interscience Pub., 1951, p. 82.	Soc., 1961, 4215.
(2) G.G. Schneider, H. Bock : <i>Ber.</i> , 70, 1617 (1937).	(12) 広田 致 : 工化, 61, 1192 (1958).
(3) E.L. Hirst, J.K.N. Jones : "Adv. in Carbohydrate Chem.", Vol. 2, Academic Press, 1946, p. 235.	(13) 広田 致 : 同上, 63, 2194 (1960).
(4) E.L. Hirst, J.K.N. Jones : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1939, 454.	(14) S.M. Partridge, R.G. Westall : <i>Biochem. J.</i> , 42, 238 (1948).
(5) E. L. Hirst : <i>ibid.</i> , 1942, 70.	(15) M. Gee, R.M. McCready : <i>Anal. Chem.</i> , 29, 257 (1956).
(6) R. Speiser : <i>J. Polym. Sci.</i> , 2, 281 (1947).	(16) H.T. Gordon, W. Thornburg, L.N. Werum : <i>Anal. Chem.</i> , 28, 849 (1956).
(7) C. L. Hinton : <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , 20, 67 (1951).	(17) C. M. Wilson : <i>ibid.</i> , 31, 1199 (1959).
(8) F.W. Norris, C.E. Resch : <i>Biochem. J.</i> , 31, 1945 (1937).	(18) R.M. McCready, M. Gee : <i>J. Agr. Food Chem.</i> , 8, 510 (1960).
(9) R. Speiser, C. R. Eddy, C.H. Hills : <i>J. Phys. Chem.</i> , 49, 563 (1945).	(19) G.O. Aspinall, A. Cañas-Rodriguez : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1958, 4020.
(10) E. F. Jansen, L. R. MacDonnell, W. H. Ward : <i>Arch. Biochem.</i> , 21, 149 (1949).	(20) E.L. Hirst, J.K.N. Jones : <i>ibid.</i> , 1947, 1221 ; 1948, 2311.
(11) G.O. Aspinall, R.S. Fanshawe : <i>J. Chem.</i>	(21) H. Deuel, J. Solms : <i>Kolloid-Z.</i> , 124, 65 (1951).
	(22) G. Wunsch : <i>Makromol. Chem.</i> , 8, 124 (1952).