ペクチン質の誘導体に関する研究 (第 2 報)

アルコール-塩酸-水系における低級アルコール
のペクチン酸エステル誘導体生成

真 部 正 敏

(香川大学農学部)

昭和 46 年 1 月 30 日 受 理

Studies on the Derivatives of Pectic Substances Part II. Formation of Ester Derivatives of Pectic Acid in the Mixture of Alcohol, Hydrochloric Acid and Water [Note]

By Masatoshi MANABE

Faculty of Agriculture, Kagawa University

The formation of ester derivatives of pectic acid was studied with the reaction mixture composed of alcohol, concentrated hydrochloric acid and water. With saturated aliphatic alcohols, ethylene glycol and glycerol, the esterification proceeded readily. Fully esterified derivatives, however, were not obtained in this reaction. Ethanol showed less reactivity than that of two alcohols described above. Among unsaturated alcohols, allyl alcohol effected esterification in the degree which was approximately the same as that of propyl alcohol. The reactivity of alcohols in esterification reaction of pectic acid may be determined by the proportion of the number of C atom and OH group in the molecule of alcohols rather than by the molecular weight. The degrees of esterification in the derivatives decreased with the increase of number of C atom with respect to the number of OH group. The viscosity decreased markedly as the ester content of the derivative increased, and, at 80% or over, the viscosity of esterified pectic acid was close to that of water. The reactions of pectin esterase and of an endo-polygalacturonase on synthesized ester derivatives of pectic acid are discussed.

(Received January 30, 1971)

ペクチン酸のエステル誘導体については、すでに数多く報告⁽¹⁾されているが、メタノール以外の低級アルコールについては、あまり調べられていない。これまでに報告されたエステル誘導体のうち、エチルエステル化については、ペクチン酸銀とヨウ化エチルによる Buston ら⁽²⁾の方法、MacDonnell ら⁽³⁾の無水エタノールと塩化水素による合成があげられる。前者では反応が瞬時にすすむが、エステル結合が離れやすい。また、後者ではエステル化度約 50% の誘導体を得ているが、詳しい検討がされていない。Deuel⁽⁴⁾ はエチレンオキシドと水との混液中で反応させ、エステル化度 100% のペクチン酸グリコールエステルを得たと報告している。しかしエチレン

オキシドの場合には、反応時間が長いと 2 次反応がおこり、生成物は水不溶性となる。

そこで、メタノール以外の低級アルコールのエステル化における反応特性を調べることは、ペクチン酸および種々の関連物質のエステル誘導体の合成およびその応用に対する基礎的知見として意義があると考え、本研究ではペクチン酸のエステル化を、前報⁽⁵⁾で報告したアルコール-塩酸-水系を用いる方法により、種々の低級アルコールについて同一条件で系統的に行なった。その結果、それぞれのアルコールについて反応特性を知ることができ、また、とくにエチレングリコールとグリセロールでは、高エステル化度のエステル誘導体を得られたの

で反応条件を検討した。さらに、誘導体の性質について比較した。

実験方法

1. ペクチン酸および低メチルエステルペクチニン酸の調製 ペクチンは市販かんきつペクチンを使用した。ペクチン酸の調製は、最初に 0.1 M NaOH を含む 1% ペクチン溶液を 2°C で 30 分処理して脱メチル化し、つづいて 2% HCl で pH を約 2.0 に調整し 30 分間放置した。凝集したペクチン酸を濾取し、エタノールで 5 回、アセトンで 1 回処理した後、真空乾燥して供試した。低メチルエステルペクチニン酸は、0.1 M NaCl を含む 1% ペクチン溶液に温州ミカンの外皮から抽出したペクチンエステラーゼを加え、30°C で作用させて脱メチル化した。以下、ペクチン酸で述べたのと同様の方法で処理して調製した。

2. ペクチン酸および低メチルエステルペクチニン酸のエステル化 試料 0.3 g にアルコール、塩酸および水の混液 10 ml を試験管に入れて密栓し、所定温度の恒温水槽中で反応させた。以下、前報⁽⁶⁾で述べたのと同様の方法で処理した。

3. ペクチンエステラーゼ (PE) およびポリガラクトロナーゼ (PG) の調製 温州ミカンの PE は前報⁽⁶⁾で述べた方法にしたがって抽出、精製した。トマトの PE はトマトの種子を除き、これをミキサーで磨砕し、濾布で濾取した組織に冷 10% NaCl を加え、pH を 7.0 ~ 7.5 に維持しながら乳鉢で組織をさらに細かく磨砕して抽出した。以下、温州ミカンの PE で行なったのと同じ操作で酵素を精製した。PG は *C. rolfsii* から単離した endo-PG⁽⁶⁾ を用いた。この酵素は超遠心分析で単一と認められた耐酸性酵素で、タンパク量 62.5 μ g/ml 酵素活性の測定は 1 mg 当り 117 unit の酵素液を 30 倍にうすめて使用した。また、市販の強力スクラーゼ (三共製品) 1 g を水 100 ml に溶解して使用した。

4. 分析方法 誘導体のエステル化度および相対粘度は、前報⁽⁶⁾で述べた方法にしたがって測定した。赤外線吸収スペクトルは、KBr 300 mg と試料 3 mg をよく混合し成錠したものについて、日立製作所製の EPI-G 2 型赤外分光光度計を使って測定した。PE の作用力は Kertesz ら^(7,8) の方法に準じて測定した。誘導体のエステル結合の分解率は、PE の作用力測定において 30 分間に消費した 0.1 N NaOH の ml 数を、エステル型カル

ボキシシル基の測定の際、消費した NaOH の ml 数 (0.1 N に換算) で除して表わした。endo-PG の作用力は梶の方法⁽⁶⁾にしたがって酵素を作用させ、還元末端の糖を Willstätter-Schudel 法の改良法⁽⁹⁾で定量して求めた。反応温度は 30°C で、また pH はペクチン酸では 4.0、誘導体では 3.0 で行なった。

実験結果

1. 各種アルコールによるエステル化

アルコール 90%, HCl 2%, 水 8% の割合の混液をペクチン酸に加え、65°C で 23 時間反応させた。第 1 表に示すように、エステル化度はアルコールの種類によりかなり異なった結果が得られた。

第 1 表 各種アルコールのペクチン酸エステル誘導体

ア ル コ ー ル	エステル化度 (%)
1. エ タ ノ ー ル	39.2
2. プロピルアルコール	19.5
3. イソプロピルアルコール	8.4
4. ブチルアルコール	6.7
5. イソブチルアルコール	6.7
6. sec-ブチルアルコール	±
7. tert-ブチルアルコール	±
8. n-アミルアルコール	±
9. アリルアルコール	21.4
10. プロパルギルアルコール	10.0
11. ベンジルアルコール	8.0
12. エチレングリコール	69.0
13. グリセロール	76.0

反応液の濃度 アルコール 90%, HCl 2%, 水 8%, 温度 65°C, 反応 23 時間

2. エチル、エチレングリコールおよびグリセロールエステル誘導体の生成条件

1) アルコール濃度の影響: 反応液のアルコール濃度を変え、2% HCl を含む混液で 65°C、26 時間反応させた。経時的に調べたエステル化度の結果は第 1 図に示す。エチレングリコールとグリセロールは、エタノールに比べ反応が容易であり、アルコール濃度 90%、26 時間の反応でエチレングリコールは 75%、グリセロールは 79% のエステル化度を示した。これらのアルコールは、その濃度が 50% でもエステル化を示し、エチレングリコールでは、26 時間の反応でエステル化度は 43.3% であった。

2) 酸の種類による影響: エチルエステル化反応に及ぼす酸の種類による影響を HCl, H₂SO₄ および HNO₃

第1図 アルコール濃度の影響

○—○ 50%, ●—● 70%, △—△ 90%, HCl 2%, 温度 65℃.

第2表 酸の種類による影響

	エステル化度 (%)	
	0.1 N	0.2 N
HCl	32.3	44.8
H ₂ SO ₄	25.9	37.9
HNO ₃	23.9	32.6

EtOH 90%, 温度 65℃, 反応 10 時間.

について調べた。第2表に示すように HCl を触媒とした反応が最も良好であり、H₂SO₄ および HNO₃ がこれにつづいた。HCl の濃度をかえて反応させると第2図に示すように、HCl 濃度が高くなるとエステル化度は増大したが、HCl 濃度が3%以上では収量は著しく低下した。エチレングリコールとグリセロールでは、HCl 1%でエステル化は容易にすすみ、10時間の反応でエステル化度は50%以上であった。エチルエステル化の場合には HCl の濃度を高めて

第2図 塩酸濃度の影響

○—○ エタノール, ●—● エチレングリコール, △—△ グリセロール, 温度 65℃, 反応 10 時間.

も、エチレングリコールやグリセロールのエステル化の場合に比べてかなり劣った。

3) 温度の影響: アルコール 90%, HCl 2% および水 8% の混液を用い 30℃, 50℃ および 70℃ の温度で反応させた。第3図に示すように、温度が高くなるとエステル化はいずれも促進したが、

第3図 温度の影響

○—○ 30℃, ●—● 50℃, △—△ 70℃, アルコール 90%, HCl 2%, 水 8%.

その傾向は、エタノールよりもエチレングリコールやグリセロールで強く認められた。これらのアルコールでは30°Cにおいても反応がすすみ、エチレングリコールの場合、24時間でエステル化度は約30%であった。

3. メチル・エチル混合エステル誘導体の生成

ペクチンおよび低メチルエステルペクチン酸にEtOH 90%, HCl 2% および水 8% の混液を加え、前に述べたと同じ方法で反応させた。その結果は第4図に示すように、メチルエステル化度 34.5% のペクチン酸では、16時間反応でエチルエステル化度が 16.6% 増加

第4図 メチルエステル化ペクチン酸のエチルエステル化

○—○ 供試メチルエステル化ペクチン酸のエステル化度 34.5%
●—● " " " " 52.7%
EtOH 90%, HCl 2%, 水 8%, 温度 65°C.

第5図 エチルエステル化ペクチン酸のメチルエステル化

MeOH 90%, HCl 2%, 水 8%, 温度 65°C.

し、総エステル化度 51.1% の混合エステル誘導体が生成した。エステル化度 54.2% および 68.0% のペクチン酸は、ほとんど反応を示さなかった。これに対し、エチルエステル化度 41.4% のペクチン酸に MeOH, HCl および水の混液を加えて反応させた結果、第5図に示すようにメチルエステル化が容易にすすみ、15時間の反応でメチルエステル化度は 43.6% となり、総エステル化度 85.0% の混合エステル誘導体が生成できた。

4. エステル誘導体の 2, 3 の性質

1) 相対粘度および赤外線分光分析: エチレングリコールおよびグリセロールエステル誘導体のエステル化度と相対粘度との関係を調べた。第6図に示すように、両誘導体は、ともにエステル化度が增大するにしたがって、相対粘度がほぼ直線的に低下する傾向が認められた。エステル化度が 70% 以上の誘導体では粘度は著しく低く、エチレングリコールエステルでは水の粘度にほぼ近かった。第7図に供試ペクチン、ペクチン酸およびそのエステル誘導体の赤外線吸収スペクトルを示す。1740~1760 cm^{-1} は遊離型またはエステル型カルボン酸の C=O による吸収を示す。エステル化度が高くなると吸収の度合が大きくなる傾向が認められる。1440 cm^{-1} はカーボメトキシメチル基による吸収でペクチン (1) と混合エステル誘導体 (4) に現われている。

2) PE および PG 作用: 各種のペクチン酸エステル誘導体に PE およびスクラーゼを作用させた結果を第

第6図 相 対 粘 度

○—○ エチレングリコールエステル誘導体 (70)
○—○ " " " " (90)
●—● グリセロールエステル誘導体 (90)
() 内の数値はエステル化反応におけるアルコール濃度 % を示す。

第7図 赤外線吸収スペクトル

1. ペクチン (64), 2. ペクチン酸 (0), 3. エチルエステル誘導体 (34), 4. メチル・エチル混合エステル誘導体 (80), 5. エチレンジグリコールエステル誘導体 (71), 6. グリセロールエステル誘導体 (66).
注 () 内の数値はエステル化度 % を示す.

第3表 ペクチン酸エステルに対する PE 作用

誘 導 体	エステル化度 (%)	脱エステル化率 (%)		
		ミカン PE	トマト PE	スクラーゼ
メチルエステル	73.3	23.9	56.2	0.0
エチルエステル	35.4	23.9	21.8	0.0
プロピルエステル	21.4	0.0	±	0.0
アリルエステル	27.7	0.0	±	0.0
エチレンジグリコールエステル	54.1	0.0	0.0	0.0
グリセロールエステル	65.9	0.0	0.0	0.0
ペ ク チ ン	73.4	45.1	70.6	3.1

反応 30℃, 30 分, 酵素活性度 ミカン PE 3.57 PMU, トマト PE 5.58 PMU.

第4表 ペクチン酸エステルに対する endo-PG 作用
(基質 100 mg 当り増加した還元糖 mg)

誘 導 体	<i>C. rolfii</i>			スクラーゼ 15時間
	15 時間	41 時間	67 時間	
メチルエステル	0.2	0.5	0.6	3.1
エチレンジグリコールエステル	0.8	2.5	4.1	11.3
グリセロールエステル	0.0	0.0	0.4	8.1
ペ ク チ ン 酸	2.9	4.7	5.4	6.0

作用 pH 誘導体 3.0, ペクチン酸 4.0, 温度 30℃.

3表に, endo-PG およびスクラーゼの作用力を第4表に示す.

考 察

ペクチン酸と低級アルコールによるエステル化をアルコール-塩酸-水系を用い, 同一条件で系統的に行なった

ところ, 次のような傾向がみられた. 1価アルコールでは, 分子量が大きくなるにしたがってエステル化度は低下した. しかし, 2価のエチレンジグリコールや3価のグリセロールではエステル化度は著しく高かった. このことから, エステル化反応はアルコールの分子量によるよりも, むしろ分子中のCとOHの数の比によって決定されるように考えられる. そこで, CとOHの比をみると, エステル化度が高かったメタノール, エチレンジグリコールおよびグリセロールは, いずれも1:1である. これに対してエタノールでは2:1, プロピルアルコールでは3:1で, OHに対するCの比が大きくなるにしたがってエステル化度が低下することがわかる. 脂肪族不飽和のアリルアルコール(2重結合1つ)のエステル化度は, プロピルアルコールとほぼ同じであったが, プロパルギルアルコール(3重結合1つ)では, アリルアルコールの場合の約2分の1のエステル化度であった. 脂肪族不飽和アルコールによるエステル化については, これまで全く行な

われていないが, アリルアルコールは, 本反応系を用いればエステル化できることが認められた.

2, 3のアルコールについて反応条件を検討したところ, エタノールでは本実験で行なった反応条件で, エステル化度がいずれも50%以下であった. 低分子ペクチン酸のエチルエステル化⁽¹⁰⁾においても, 高分子の場合

とはほぼ同じ傾向を示した。また、メチル・エチル混合エステル誘導体をつくるとき、ペクチン酸メチルエステルを出発物質としてエチルエステル化を行なうと、反応がきわめて困難で、エステル化度の増加は非常に少なかった。このことからみると、エタノールはメタノールに比べてエステル化反応がかなり劣るものと思われる。エチレングリコールやグリセロールは、エタノールに比べてエステル化反応は容易であり、50% の低アルコール濃度、あるいは 30°C の低温度でも反応がすすみ、この反応はメチルエステル化⁽⁵⁾によく類似している。Deuel⁽⁴⁾はエチレンオキシドと水とを用い、室温でエステル化度 100% の誘導体を得ているが、本反応系ではそのような誘導体は得られなかった。しかし、エチレンオキシドでは、反応時間が長いと生成物は水不溶性となる。本反応系で得た生成物も部分的に水不溶性性がみられたが、アルカリで pH を 6~7 に調整すると溶解した。

ミカンやトマトの PE は、ペクチン酸メチルエステルに対してと同様に、エチルエステルにもやや強い作用力があった。しかし、エチレングリコールエステルには作用力が認められず、これはエチレングリコールエステルについて Deuel⁽⁴⁾が行なった結果と一致する。また、グリセロールエステルも PE で分解されないことが、本実験の結果から確認できた。*C. rolfssii* の endo-PG について、梶ら⁽⁶⁾はペクチン酸のほかにペクチンやメチル化ペクチンにも若干作用力のあることを報告している。この endo-PG はペクチン酸のメチルエステルやグリセロールエステルに対してはきわめて作用力が弱い、エチレングリコールエステルには、やや強い作用力を示した。

前報⁽⁶⁾のメチルエステル化の実験と合わせて考察すると、ペクチン酸のエステル誘導体合成では水がかなり含

まれていても、メタノール、エチレングリコールおよびグリセロールの場合には、エステル化度の高い誘導体が得られることがわかった。反応系における水の割合を低くすれば、エステル化度はさらに高まると思われるが、本実験では行なわなかった。本反応は操作が簡単であり、そのうえ大量に調製できるので、工業的規模での実施も可能と考えられる。

本稿を終るにあたり終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました京都大学農学部小野寺幸之進教授に深甚の謝意を表します。本研究を行なうにあたり、御鞭撻を頂いた本学部榎谷隆之教授、酵素試験について御助言を頂いた梶明教授、ならびに endo-PG を御恵与下さった丸金醤油株式会社大崎武久氏に深く感謝いたします。

本報告の概要は昭和 45 年 5 月 16 日、日本農芸化学会関西支部例会講演会において発表した。

- (1) H. Deuel and E. Stutz: *Advances in Enzymol.*, **20**, 341 (1958).
- (2) H. W. Buston and H. R. Nanji: *Biochem. J.*, **26**, 2090 (1932).
- (3) L. R. MacDonnell, R. Jang, E. F. Jansen and H. Lineweaver: *Arch. Biochem.*, **28**, 260 (1950).
- (4) H. Deuel: *Helv. Chim. Acta*, **30**, 1523 (1947).
- (5) 真部正敏: 日本農芸化学会関西支部例会 (昭和 45 年 5 月); *農化*, **45**, 195 (1971).
- (6) A. Kaji and T. Okada: *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 203 (1969).
- (7) Z. I. Kertesz: *J. Biol. Chem.*, **121**, 589 (1937).
- (8) R. J. McCulloch and Z. I. Kertesz: *Arch. Biochem.*, **13**, 217 (1947).
- (9) E. F. Jansen and L. R. MacDonnell: *Arch. Biochem. Biophys.*, **8**, 97 (1945).
- (10) 真部正敏: 昭和 46 年度日本農芸化学会大会講演.