[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 53, No. 2, pp. 61~67, 1979]

カルシウムイオンによる低メトキシルペクチンの 会合機構について†

川端晶子, 澤山 茂, 鎌田俊雄*

(東京農業大学栄養学科, *工業技術院東京工業試験所)

昭和 53 年 9 月 12 日 受理

On the Mechanism of Association of Low-Methoxyl Pectin due to Calcium Ions (Studies on the Gelling Mechanism for Pectin Part I)

Akiko KAWABATA, Shigeru SAWAYAMA and Toshio KAMATA*

Department of Nutrition, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156

*National Chemical Laboratory for Industry, Shibuya-ku, Tokyo 151

As a means for elucidating the gelling mechanism for pectin, the association of low-methoxyl pectin (LM-pectin) due to Ca^{2+} was examined from the molecular weights and molecular size, using the one-concentration approximation method in light scattering measurement over and below the critical concentration.

The critical concentration of the LM-pectin was found to be 0.02 g/dl.

10~30% Ca^{2+} based on the amount of pectin was added to the 0.004~0.1% LM-pectin in 0.1 M NaCl aqueous solution. Thereafter the weight-average molecular weights (M_w) and radius of gyration (R_G) were measured up to the reaction time of 240 min. The changes in molecular weights and size due to the intra- and intermolecular cross-linkage were found to be dependent on the level of pectin and the amount of Ca^{2+} added. The behavior of the changes over the critical concentration was different from that below it.

The solution diluted to 1/5 of the critical concentration slightly increased the molecular weights due to the intramolecular cross-linkage, but slightly contracted the molecule due to the intramolecular cross-linkage. As the level of pectin became a little higher, some increase in the molecular weights due to the intermolecular cross-linkage occurred. The intermolecular cross-linkage proceeded with the elapse of time, and the molecules gradually stretched and expanded to the rodlike shape.

Over the critical concentration, the higher the level of pectin or Ca^{2+} was, the more the intermolecular cross-linkage proceeded and the molecular weights increased. But the cross-linked particles contracted to the size smaller than that of the molecule of the original sample due to the intra- and intermolecular cross-linkage.
(Received September 12, 1978)

緒 言

ペクチン溶液は、一定条件下でゲルを形成する性質をもち、イオン結合型と水素結合型ゲルに大別することができる⁽¹⁾。イオン結合型ゲルとは、低メトキシルペクチン-多価金属イオン-水系によるゲルである。カルシウムのような2価の金属イオンは、近接する鎖状のペクチン

分子中の遊離カルボキシル基間で架橋し、網目構造をつくる⁽²⁾。ペクチンやカルシウムの濃度を変えることによって、ゲルの構造やテクスチャーを変化させ、ゲルの広範囲の利用を可能にすることができる。ペクチンゲルのレオロジック性質については、Blackら^(3,4)、Cheftelら⁽⁵⁾、Mitchellら⁽⁶⁾、Kimら⁽⁷⁾や著者ら⁽⁸⁾の研究報告があるが、ゲル化機構については不明な点も多い。そこで、著者らは、ゲル化機構解明の手がかりとして、カル

† ペクチンのゲル化機構に関する研究 (第1報)

シウムイオンによる低メトキシルペクチンの会合機構を、臨界濃度 (critical concentration)⁽⁹⁾ 前後の濃度において光散乱法⁽¹⁰⁾を用い、分子量および分子の広がりの変化から検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 実験材料 試料ペクチンは、Sunkist Growers 社製のアンモニウム塩化法によって調製された Low methoxyl pectin (LM ペクチン) を精製⁽¹¹⁾し実験に供した。カルパズール・硫酸法⁽¹²⁾で定量した精製 LM ペクチンのガラクトース・グルコース含量は 80.8%, 島津アルコキシル基定量装置による重量法⁽¹³⁾で定量したメトキシル基含量は 6.1% であった。

2. 測定方法 1) 光散乱測定: 前報⁽¹⁰⁾において、ペクチンの分子量と分子の広がりを測定するために、光散乱 1 濃度近似法⁽¹⁴⁾が有効な測定法であることを確認したので、濃度の異なる LM ペクチン 0.1M NaCl 溶液に一定量のカルシウム (Ca^{2+}) 濃度になるように、塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液を添加し、時間経過にともなう LM ペクチンの分子量 (M_w) と分子の広がりを示す慣性半径 (R_g) の変化を追跡した。光散乱測定には、前報⁽¹⁰⁾同様、島津製光散乱光度計 PG-21 型および DL-10A 型を用い、30° から 135° までの散乱光の角度分布を測定した。また偏光解消度を測定し、その補正

を行った。

まず、無じん水を用いた 0.1M NaCl に LM ペクチンを溶解した試料溶液を 100,000 g で 60 分間、Spinco Model L4 超遠心機を用いて遠心し、Corning 社製の Ultra fine glass filter を用いて濾過し、光散乱測定用の円筒セルに入れて測定に供した。光散乱測定は 436 nm の波長を用い室温で行った。 Ca^{2+} 溶液も上記同様遠心し、ペクチン溶液中の Ca^{2+} 濃度が一定量になるように、上記 filter を用いて円筒セル中に加え、静かにセルを動かして拡散させ、 Ca^{2+} 添加直後の測定に供した。その後は静置したまま、240 分まで経時的に散乱光の角度分布を測定した。

2) 臨界濃度: Yamagata⁽⁹⁾の次式により、上記測定法によって求められた分子量および慣性半径から臨界濃度を求めた。

$$C_c = \frac{100}{N_A} \cdot \frac{M_w}{\langle L^2 \rangle^{3/2}} \quad (1)$$

$$\langle L^2 \rangle^{1/2} = 2R_g \quad (2)$$

$$\langle L^2 \rangle^{3/2} = \langle 2R_g \rangle^3 \quad (3)$$

ここで、 C_c は臨界濃度 (g/dl), M_w は重量平均分子量, N_A はアボガドロ数, L は臨界濃度における溶質分子の linear dimension, R_g は慣性半径である。本実験試料 LM ペクチンの M_w は 36×10^4 , R_g は 670 Å であり、臨界濃度は 0.02 g/dl が求められたので、その前後

Table I. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin due to Association

Reacting time (min)	Ca ²⁺ 10%/pectin		Ca ²⁺ 20%/pectin		Ca ²⁺ 30%/pectin	
	$M_w (\times 10^4)$	$R_g (\text{\AA})$	$M_w (\times 10^4)$	$R_g (\text{\AA})$	$M_w (\times 10^4)$	$R_g (\text{\AA})$
Original	36	670	36	680	37	680
Immediately after adding Ca ²⁺	72	720	138	1000	620	1810
5	73	780	169	1160	670	1630
10	75	780	161	1040	920	1970
15	75	770	169	1070	1020	2020
20	72	720	164	990	1020	1960
30	76	760	177	1090	1480	2310
60	72	690	177	990	1480	2080
90	75	680	223	1010	1920	2510
120	74	680	262	1180	2190	2540
150	75	710	269	1200	2720	2910
180	76	720	277	1180	3200	3100
210	78	720	266	1050	3400	3800
240	78	750	270	1150	3700	4100

M_w , weight-average molecular weight, R_g , radius of gyration.

The light scattering measurement was carried out with the elapse of each reacting time on the 0.05% LM-pectin solution in 0.1M NaCl with added 10, 20 and 30% calcium based on pectin.

の濃度において会合機構を検討した。

実験結果および考察

1. 臨界濃度以上における会合機構

1) 0.05% LM ペクチン溶液: ペクチン分子が溶液中で最密充てんされると考えられる臨界濃度よりも高い 0.05% LM ペクチン溶液に、ペクチンの 10, 20 および 30% になるように Ca^{2+} を加え、反応時間の経過を追って散乱光の角度分布を測定したが、散乱図形の例を Fig. 1 に示した。いずれの場合もプロットは直線にのり、低角度の落込みはみられなかった。このことは会合が比較的均一に進んだことを示しており、極端にごく少量の巨大粒子が生成するようなことはなかったことを意味する。Table I に、会合による分子量と慣性半径の経時変化を示した。原料ペクチンの分子量は 36×10^4 慣性半径は $670 \text{ \AA}$ であるが、10% の Ca^{2+} を添加すると、直後に分子量は約 2 倍、慣性半径は約 10% 増となり、その後もやや増加するがあまり大きな変化は認められなかった。20% の Ca^{2+} を添加すると、直後に分子量は約 4 倍、240 分後に 7.5 倍となるが、慣性半径は約 50~75% 増であった。また、30% の Ca^{2+} を添加すると、

Fig. 1. K_c/R_θ Versus $\sin^2(\theta/2)$ Plots of the 0.05% LM-Pectin in 0.1M NaCl Aqueous Solution after Addition of 30% Calcium Based on Pectin. This figures show a relationship between K_c/R_θ and $\sin^2(\theta/2)$ obtained by one-concentration approximation method in light scattering. ●, original sample; reacting times, ○, immediately after addition of Ca^{2+} ; ▼, after 5 min; △, after 60 min; ◆, after 240 min.

240 分後に分子量は 100 倍、慣性半径は 6 倍となり、顕著な増加が認められた。LM ペクチン溶液に Ca^{2+} を添加すると、瞬間的に分子間および分子内架橋が起こり、 Ca^{2+} 濃度が高いほど時間の経過とともに架橋は進み、分子量および分子の広がりが増大することが認められた。

Fig. 2 に分子量と慣性半径の関係をその対数値で示したが、 $R_g \propto M_w^\alpha$ の指数 α は 0.41 が求められた。前報⁽¹⁰⁾で、果実ペクチンの α は 0.55 が求められ、ペクチンの分子鎖は極端に伸びきっているのではなく、通常のラン

Fig. 2. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.05% LM-Pectin Solution after Addition of Calcium. R_g , radius of gyration; M_w , weight-average molecular weight; ●, original sample; △, Ca^{2+} 10%; ○, Ca^{2+} 20%; ●, Ca^{2+} 30%; α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$; 240, final reacting time (min).

Fig. 3. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.07% LM-Pectin Solution after Addition of Calcium. ●, original sample; ○, Ca^{2+} 10%; ●, Ca^{2+} 20%; α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$; 240, final reacting time (min).

Fig. 4. Schemes Showing Molecular Contractions due to the Inter- and Intramolecular Cross-linkage. Concentration of pectin, 0.07%; amount of added calcium, 10% based on pectin; ●, cross-linkage due to Ca^{2+} ; A, pectin aqueous solution, random coil; B, immediately after addition of Ca^{2+} , increase in the molecular weight due to the intermolecular cross-linkage; C, after 30 min, increase in the molecular weight and molecular contraction due to the inter- and intramolecular cross-linkage; D, after 240 min, increase in the molecular weight and molecular contraction due to the inter- and intramolecular cross-linkage.

Fig. 5. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.1% LM-Pectin Solution after Addition of Calcium. Amount of added calcium, 10% based on pectin; α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$; 240, final reacting time (min).

ダムコイルであることを確認し報告したが, 0.41はこの値よりも小さく, Ca^{2+} による架橋結合により原試料分子よりも縮小することが認められた。一方, Ca^{2+} 濃度を高くしていくに従い, 分子の広がり小さくなるのではないかと推測されたが, Fig. 2 にみられるように, Ca^{2+} 添加量 30% までは, その変化を明瞭に識別することはできなかった。

2) 0.07% および 0.1% LM ペクチン溶液: 0.07% LM ペクチン溶液に, ペクチンの 10% および 20% の Ca^{2+} を加えた場合の分子量と慣性半径の経時変化を Fig. 3 に示したが, α は 0.39 が求められた。また, 分子間および分子内架橋による分子の収縮の模式図を Fig. 4 に示した。 Ca^{2+} を添加すると瞬間的に分子間架橋がおこり, 分子量の増加がみられる。30 分後には, 分子間および分子内架橋による分子量の増加とともに分子は

Fig. 6. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.007% LM-Pectin Solution with Added 10% Calcium. Numbers denote reacting times (min); α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$ for original pectin.

収縮するが, 240 分後にはさらに, 分子間および分子内架橋による分子量の増加と分子の収縮がおこる。

Fig. 5 に, 0.1% LM ペクチン溶液に, ペクチンの 10% の Ca^{2+} を加えた場合の分子量と慣性半径の経時変化を示した。 α は 0.37 が求められ, ペクチン濃度が高くなるに従って α の値はわずかに減少する傾向にあることが認められた。

Fig. 7. Schemes of Molecular Elongations due to the Intermolecular Cross-linkage. Concentration of pectin, 0.007%; amount of added calcium, 10% based on pectin; ●, cross-linkage due to Ca^{2+} ; A, pectin aqueous solution, random coil; B, immediately after addition of Ca^{2+} , increase in molecular weight due to the intermolecular cross-linkage (60%); C, after 30 min, elongation and expansion of molecules with a proceeding intermolecular cross-linkage, and proceed of the intramolecular bonds; D, after 240 min, gradual increase in numbers of intramolecular bonds, and slight contraction of average molecular dimension.

以上の結果から、臨界濃度以上では、ペクチン濃度および Ca^{2+} 濃度が高ければ高いほど分子間架橋は進み、分子量は増大するとともに、分子内および分子間架橋によって架橋粒子の広がり原試料分子（鎖状分子で $\alpha=0.55$ ）より次第に縮小していくことが認められた。一方、 Ca^{2+} 濃度を高くしていくと分子間および分子内架橋が進み、さらに分子の広がり小さくなっていくので

Fig. 8. Change with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.007% LM-Pectin Solution with Added 30% Calcium. Numbers denote reacting times (min); α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$ for original pectin.

はないかと考えられたが、その変化を明瞭に識別することはできなかった。

2. 臨界濃度以下における会合機構

1) 0.007% LM ペクチン溶液：臨界濃度よりも低い 0.007% LM ペクチン溶液に、ペクチンの 10% の Ca^{2+} を加えた場合の分子量と慣性半径の経時変化を Fig. 6 に示し

た。 Ca^{2+} 添加直後、分子量と分子の広がりは一時的に増大するが、時間の経過とともに不規則な挙動を示し、30 分以後は原試料分子の $\alpha=0.55$ の線よりもかなり高い位置に点がみられる。総体的に分子間架橋による分子量の増加が多少おこり、時間の経過とともに分子間

Fig. 9. Changes with the Time Elapsed in Molecular Weights and Radius of Gyration of Pectin in the 0.004% LM-Pectin Solution with Added 10% Calcium. Numbers denote reacting time (min); α , index of $R_g \propto M_w^\alpha$ for original pectin.

Fig. 10. Schemes of Molecular Contraction due to the Intramolecular Bonds. Concentration of pectin, 0.004%; amount of added calcium, 10% based on pectin; ●, cross-linkage due to Ca^{2+} ; A, pectin aqueous solution, random coil; B, immediately after adding Ca^{2+} , slight contraction of molecules due to the intramolecular bonds, little increase in molecular weight; C, after 30 min, gradual increase in numbers of intramolecular bonds; D, after 240 min, contraction of molecules due to a remarkable intramolecular bonds.

架橋が進行して分子は次第に棒状に伸び広がる傾向にあるが、最大分子量は約 60% 増であった。分子間架橋による分子の伸長の模式図を Fig. 7 に示した。 Ca^{2+} 添加直後に分子間架橋による分子量の増加がみられる。30 分を過ぎると、分子間架橋の進行とともに分子は伸び広がるとともに、分子内架橋もわずかに進行する。240 分後には分子内結合の数が次第に増加し、平均的な分子の広がりはやや縮小する。

Fig. 8 に、 Ca^{2+} 30% 添加の場合の分子量と慣性半径の経時変化を示した。添加 Ca^{2+} が多くなると、まず分子の表面のカルボキシル基と Ca^{2+} が接触して分子間架橋が進むが、時間の経過とともに Ca^{2+} は分子内に浸透して架橋し、やや分子は縮小する。しかし、10% 添加の場合よりやや低い、 $\alpha 0.55$ の線よりも上に点がみられる。最大分子量は約 50% 増であった。

2) 0.004% LM ペクチン溶液：さらに希薄な 0.004% LM ペクチン溶液に、10% の Ca^{2+} を添加した場合の分子量と慣性半径の経時変化を Fig. 9 に示した。 Ca^{2+} 添加直後に分子量はわずかに増加するが、慣性半径はほとんど変化せず、その後、時間の経過とともに Ca^{2+} は徐々に分子内に浸透して分子内架橋が進むため、原試料分子の $\alpha 0.55$ の線よりも低い位置に点がみられる。Fig. 10 に、分子内架橋による分子の収縮の模式図を示したが、臨界濃度の 1/5 ぐらいの希薄溶液になると、 Ca^{2+} 添加直後は分子内架橋により分子はわずかに収縮し、分子量の増加はごくわずかであることが推測される。30 分後には、分子内架橋の数が次第に増加し分子は次第に縮小する。さらに、240 分後には多数の分子内架橋により分子は縮小する。

以上の結果から、臨界濃度以下では特異な現象を示し、分子間架橋による分子量の増加は予想どおりきわめ

て少なく、ペクチン濃度が臨界濃度の 1/5 ぐらいになると、分子内架橋により分子は縮小する。

要 約

ペクチンのゲル化機構解明の手がかりとして、カルシウムイオンによるアンモニア鹼化法によって調製された低メトキシルペクチンの会合機構を、臨界濃度前後の濃度において光散乱 1 濃度近似法を用い、分子量および分子の広がりの変化から検討し、以下のような結果を得た。

(1) 低メトキシルペクチン-0.1 M NaCl 溶液に Ca^{2+} を添加すると、分子内および分子間架橋がおこり、分子量や分子の広がりの変化がおこる。また、時間の経過とともに分子内および分子間の架橋は進行する。

(2) 分子内および分子間架橋による分子量や分子の広がりの変化は、ペクチン濃度や添加 Ca^{2+} 濃度に依存し、ペクチン分子が溶液中で最密充填されると考えられる臨界濃度以上と以下では異なった挙動を示す。

(3) 臨界濃度以上では、ペクチン濃度および Ca^{2+} 濃度が高ければ高いほど分子間架橋は進み、分子量は増大し、架橋粒子の広がりや分子内および分子間架橋結合により原試料分子よりも次第に縮小していく。

(4) 臨界濃度以下では、分子間架橋による分子量の増加がわずかにおこり、時間の経過とともに分子間架橋が進行して分子は次第に棒状に伸び広がっていく。臨界濃度の 1/5 ぐらいの希薄溶液になると、分子間架橋による分子量の増加はほとんどみられず、分子内架橋によって分子は縮小する。

本稿を終えるにあたり、電子計算機によるデータ処理にご協力をいただきました工業技術院東京工業試験所服部滋博士および中原久恵氏に深謝いたします。

-
(1) Z. I. Kertesz : "The Pectic Substances," Interscience, New York, 1951, p.193.	(7) W. J. Kim, V. N. M. Rao and C. J. B. Smit : <i>J. Food Sci.</i> , 43 , 522 (1978).
(2) D. A. Rees : <i>Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.</i> , 24 , 267 (1969).	(8) 川端晶子, 澤山 茂 : 農化, 50 , 555 (1976).
(3) S. A. Black and G. J. B. Smit : <i>J. Food Sci.</i> , 37 , 726 (1972).	(9) Y. Yamagata : <i>J. Appl. Phys.</i> , 8 , 1344 (1969).
(4) S. A. Black and G. J. B. Smit : <i>ibid.</i> , 37 , 73 b (1972).	(10) 川端晶子, 澤山 茂 : 農化, 51 , 15 (1977).
(5) H. Cheftel and J. Mocquand : <i>J. Soc. Chem. Ind. (London)</i> , 66 , 297 (1947).	(11) 川端晶子, 澤山 茂 : 栄養と食糧, 28 , 7 (1975).
(6) J. R. Mitchell and J. M. V. Blanshard : <i>J. Texture Stud.</i> , 7 , 341 (1976).	(12) T. Bitter and H. M. Muir : <i>Anal. Biochem.</i> , 4 , 330 (1962).
	(13) 日本分析化学有機微量分析研究懇談会編 : 有機微量定量分析, 南江堂, 1967, p.439.
	(14) T. Kamata and H. Nakahara : <i>J. Colloid Interface Sci.</i> , 43 , 89 (1973).
-