デンプングリコール酸ナトリウムの生化学的分解に関する研究 (第3報)

唾液アミラーゼによる加水分解物中の低分子物質について

(昭和43年5月4日受理)

林 敏 夫*

Studied on Biochemical Hydrolysis of Sodium
Carboxymethylstarch (III)
Low molecular Hydrolyzate Hydrolyzed with Saliva Amylase

Toshio HAYASHI

(National Institute of Hygienic Sciences: 18, 1-chome,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

Low molecular substances produced by the hydrolysis of sodium carboxymethylstarch (Na-CMS, degree of substitution: 0.38) with saliva amylase were studied.

Na-CMS was hydrolyzed with human saliva amylase, and the hydrolyzates were fractionated by Sephadex column to No. 1~5 portions. The fraction 1 showed a different behavior from the other fractions on paper chromatogram, and it was colored to violet (absorption maximum: $540\text{ m}\mu$) by heating with 0.01% 2,7-dihydroxy-naphthalene sulfuric acid solution in water bath. Infrared spectrum of the fraction showed the absorption of carboxyl group. These facts revealed the presence of a carboxymethyl group in the fraction 1, but in the fraction 2~5, respectively carboxymethyl group was not identified. The fraction 1 was not colored with iodine, and the average polymerization degree of the fraction 1 was 7.5 by the determination with 3,5-dinitrosalicylic acid method.

(Received May 4, 1968)

まえがき

デンプングリコール酸ナトリウム (Sodium carboxymethylstarch, Na-CMS) は種々の金属と塩を作り、とくに銅などにより定量的に沈殿する¹⁾が、唾液を用いて加水分解すると一部沈殿しない部分ができる²⁾。この現象はとくに低エーテル化度の Na-CMS にみられるが、これは低エーテル化度のものが唾液アミラーゼにより比較的分解を受け易いためである。なお分解に際してはカルボキシル基は分解を受けることなく、そのまま残っていると思われる。そこで、この場合に生じるカルボキシメチル基を有する最小物質と考えられる物質を分離し、これについてカルボキシメチル基の存在を確かめ、その平均グルコース残基を測定した。

1. 実験方法および実験結果

(1) Na-CMS の加水分解および低分子物質の分離

Na-CMS (平均エーテル化度0.38) 2 g を水 200 ml に溶かし、1 N 塩化ナトリウム溶液 5 ml および新生ヒト唾液(粘性物質を遠心分離して除いた液) 50 ml を加え、Na-CMS 溶液の粘度が低下したのち 0.5 N 塩酸で pH を 6.9 に調整し、40° に10時間加温したのち常温に冷却した。この液に 1 N 硫酸銅溶液をもはや沈殿が生じなくなるまで少量ずつ加え、pH を 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液で 6.2 に調整し、析出した沈殿を遠心分離して除き、上澄液はセラライト (No. 545) を用いてろ過した。ろ液を陽イオン交換樹脂 (アンバーライト IR-120, H 型; 2.5×15 cm) を 2 ml/min の流速で通過させたのち、1 N 水酸化ナトリウム溶液で中和し、45~50° で約 5 ml となるまで減圧濃縮し、Sephadex G-15 のカラムを通

* 国立衛生試験所: 東京世田谷区上用賀 1-18-1

し、水で流出して SO_4^{2-} および Cl^- の反応を示さない部分を集め、ふたたび減圧下で約 5 ml に濃縮し、Sephadex G-25 のカラムに通し、水で流出させて 5 ml ごとに分画した。分画液はその 1 滴をとり、0.01% 2,7-dihydroxynaphthalene- H_2SO_4 溶液 0.5 ml を加え、水浴中に 10 分間加熱したときの呈色を観察し、紫紅色を呈する部分を集めて減圧濃縮し、さらに Sephadex G-25 のカラムを用いて精製し、5 ml ずつに分画したのち、上記試薬により紫紅色を呈する部分を 15 ml ずつ合わせて凍結乾燥を行ない、Fraction 1~5 を得た。

(2) 分画物のペーパークロマトグラフィー

上記方法で得た Fraction 1~5 の各約 1 mg を水 1 滴に溶かしたものを検液とし、つぎの条件のもとにペーパークロマトグラフィーを行なった。

ロ 紙: 東洋汙紙 No. 52 (34 cm × 20 cm)

展開溶媒: イソアミルアルコール・ピリジン・6 N アンモニア水 (6:6:5) の混液

展開方法: 下降法

標準物質: グルコース

展開時間: 約 16 時間

発色試薬³⁾: ① 硝酸銀・アセトン溶液 飽和硝酸銀溶液 0.1 ml にアセトン 20 ml を加え、生ずる混濁が消失するまで水を滴加する。

② 0.5 N アルコール製水酸化カリウム溶液

③ 1 N アンモニア水

発色法: 展開後風乾したロ紙を①液に浸し、風乾

Fig. 1. Paper chromatography by descending method for the Fractions 1~5 obtained from hydrolyzed Na-CMS and some saccharides

Solvent: Mixture of iso-amylalcohol, pyridine and water (6:6:5)

G₁: glucose; G₂: maltose; G₃: malttriose; G₄: malttetraose

Numbers under the spots show R_f

した後②液を噴霧し、しばらく放置するとかっ色のはん点を生じ、同時に back ground も淡かっ色となるのでロ紙を③液に浸し、back ground の色を消失させたのち水洗し、乾燥する。

上記の方法により展開溶媒を用いて Fig. 1 に示すクロマトグラムを得た。なお参考としてマルトース、マルトリオース、マルテトラオースについても同時に行ない、グルコースを基準として展開距離の比 R_f を求めた。

この結果 Fraction 1 は原点からわずかに移動したにとどまり (R_f : 0.03), Fraction 2 は R_f : 0.22, 以下おそく流出したものほど R_f は大きくなった。

(3) 2,7-dihydroxynaphthalene による呈色

Fraction 1~5 ならびに参考試料として Na-CMS (平均エーテル化度 0.38), およびグリコール酸につき 2,7-dihydroxynaphthalene 法⁴⁾を用いて呈色させた液につき吸収スペクトルを測定した。結果は Fig. 2 に示すとおりで、Fraction 1, Na-CMS およびグリコール酸はいずれも波長 540 m μ 付近に極大吸収を示したが、その他のものは波長 490 ~ 495 m μ 付近に極大吸収を有するなだらかな吸収を示し、540 m μ 付近における強い吸収はみとめられなかった。

(4) 赤外吸収スペクトル

Fraction 1, 2 および Na-CMS につき KBr 錠剤法により赤外吸収スペクトルを測定した。その結果は Fig. 3 A~C に示すとおりで、Fraction 1 および Na-CMS は波数 1600 cm^{-1} 付近に $-\text{COONa}$ の吸収がみられたが、Fraction 2 には認められなかった。

Fig. 2. Absorption spectra of hydrolyzed substances obtained from Na-CMS, Na-CMS and glycolic acid reacted with 2,7-dihydroxy-naphthalene

1: Na-CMS, 2: Fraction-1, 3: Fraction-2, 4: Fraction-3, 5: Fraction-4, 6: Fraction-5, 7: Glycolic acid

Fig. 3. Infrared spectra of Na-CMS and hydrolyzed substances (Fraction 1, 2) obtained from Na-CMS

(5) Fraction 1 に対するヨウ素反応

Fraction 1 約 5 mg を水 3 ml に溶かし、0.5 N 塩酸 1 滴、0.01 N ヨウ素溶液 2 滴を加えたときの色は、同容量の水に同じ操作を施した液の色と同じであり、ヨウ素による呈色は認められなかった。

(6) Fraction 1 の重合度

本物の重合度の測定は 3, 5-dinitrosalicylic acid 法⁵⁾ により行なった。すなわち Fraction 1 約 5 mg を精秤して水 2 ml に溶かし、これに 1.5% 3, 5-dinitrosalicylic acid 水溶液 1 ml および 6 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を加え、65° で 4.5 時間加熱後冷却し、水を加えて全量を 25 ml とした液につき、試料を用いずに同様に操作して作製した液を対照として波長 485 mμ における吸光度を測定し、この値と、別に作製したマルトースの検量線より対応するマルトースの量を求め、次式による平均重合度を算出し、Table 1 に示すような結果を得た。

Table 1. Degree of Polymerisation of Fraction 1

Sample weighed (mg)	Equivalent as maltose (mg)	Degree of Polymerisation
5.4	1.44	7.5

$$\text{平均重合度} = \frac{\text{試料採取量 (mg)}}{\text{マルトース (mg)}} \times 2$$

なおマルトース検量線は 0.2~2 mg のマルトースをとり、試料の場合と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作製した。

2. 考 察

Na-CMS が α-アミラーゼにより加水分解されたときに生成する分解物中、比較的分量の大きい加水分解物は pH 6~6.5 付近で硫酸銅などを作用させると銅塩として沈殿するが、分子量の小さいものは沈殿しない。したがって 1-(1) の方法で得られた物質は比較的小さい分子量を有するものと考えられる。このうちカルボキシメチル基を有するものが存在するかどうかを確かめるため種々の検討を加えた。

Sephadex G-25 のカラムを用いて得られた Fraction-1~5 について行なったペーパークロマトグラフィーでは Fig. 1 に示すように中性溶媒と塩基性溶媒を用いた Fraction-1 は原点からわずかに移動したに止まり、Fraction-2 以下遅く流出したもののほど移動距離は大きく、それだけ分子量が小さいことが考えられる。また硫酸中で 2, 7-dihydroxynaphthalene を作用させると Fraction 1 は波長 540 mμ 付近に吸収極大を有する吸収スペクトルが得られた。これは参考のために Na-CMS およびグリコール酸について同様にして発色させた液の吸収スペクトルとも一致したが、この吸収はカルボキシメチル基に由来するものである。一方、Fraction-2~5 は波長 495 mμ 付近にきわめてなだらかな吸収を示し、吸光度は Fraction-1 に比べてかなり低かった (各液の最終濃度はグリコール酸以外は 4~5 ppm)。またグルコースおよびマルトテトラオースも波長 490~495 mμ 付近にピークを有する Fraction-2 と似た吸収スペクトルを示し、これらは Fraction-2 とともに波長 540 mμ 付近にはピークはみられなかった。また図には示さなかったが Fraction-3~5 も同様の吸収スペクトルを与えた。以上の結果より Fraction-1 のみがグリコール酸基を有するものと思われる。

また Fraction-1 および 2 について赤外部における吸収を測定したところ、Fraction-1 は Fig. 3 に示すように波数 1600 cm⁻¹ 付近に -COONa の吸収を示した。この吸収は参考に行なった Na-CMS の場合にも認められたが、Fraction-2 にはみられなかった。この結果 Fraction-1 はカルボン酸塩であることが確認された。

アミロースのヨウ素呈色に関しては 2, 3 の報告⁶⁻⁸⁾ があり、平均重合度と呈色の関係は必ずしも一致していないが、Mould ら⁹⁾ は重合度 10 以下ではほとんど呈色せず、10 以上でとう色から青色を呈したと報告している。Fraction-1 はヨウ素により呈色せず本物質はアミロースとしての平均重合度は比較的低いと考えられたが、実際に測定したところ 7.5 なる値が得られた。以

上のことから唾液により分解される Na-CMS の分解物中、カルボキシメチル基を有するものとしては Fraction 1 が最も小さい単位のものと考えられる。

む す び

Na-CMS をヒト唾液で分解したものからカルボキシメチル基を有する低分子物質を Sephadex カラムを用いて分離し、ペーパークロマトグラフィー、2, 7-dihydroxynaphthalene による呈色、赤外吸収スペクトルなどより、本物質がカルボキシメチル基を有するものであることを確認し、さらにこのものの平均重合度が7.5であることがわかった。

本実験のご指導を賜った大阪大学教授 川崎太郎博士、ご鞭撻いただいた国立衛生試験所食品添加物部長 井上哲男博士、東京薬科大学教授 藤井清次博士ならびにマルトトリオースおよびマルトテトラオースを御分与下さった東北大学農学部柴崎一雄氏に謹謝する。

文 献

- 1) 林 敏夫, 須佐順子, 藤井清次: 食衛誌. **6**, 489 (1965).
- 2) 林 敏夫: 同上, **8**, 151 (1957).
- 3) W.E. Trevelyan, D.P. Procter, J.S. Harrison: Nature, **166**, 444 (1950).
- 4) R. W. Eyler, E. D. Klug, Fiephus: Anal. chem. **19**, 24 (1947).
- 5) K. H. Meyer, et al.: Helv. chim. Acta, **31**, 103 (1948).
- 6) 大橋一二: 農化, **33**, 576 (1959).
- 7) M. A. Swanson: J. Biol. Chim. **172**, 825 (1948).
- 8) W. J. Whelan, J. M. Baily: Biochem. J. **58**, 560 (1954).
- 9) D. L. Mould, R. M. L. Synge: ibid. **58**, 574 (1954).