

ペクチン質の簡易定量法の検討 (1)

山澤和子・山下ルミ (食品学)

はじめに

野菜などのペクチン質の分別抽出は、Bettelheim ら¹⁾、三浦ら²⁾、沢山³⁾、金子ら⁴⁾等諸氏の方法が知られている。これらの操作手順は類似しており、一般的には何れかの方法に則って分画・定量されている。例えば、金子ら⁴⁾の方法は、試料食品からアルコール不溶性固形物を得、これを室温にて12時間水で浸漬し水溶性ペクチンを、この残渣を同温で2時間0.4%ヘキサメタリン酸溶液で浸漬しヘキサメタリン酸可溶性ペクチンを、さらに得られた残渣を0.05M塩酸で1時間煮沸し塩酸可溶性ペクチンを分別定量している。この方法は、細胞壁中の不溶性成分と共有結合しているプロトペクチンがヘキサメタリン酸ナトリウムのようなキレート剤には不溶で塩酸には可溶(共有結合を切断)と考えた操作である。しかし、室温での抽出操作では、多価陽イオンと結合しているペクチン質が完全に溶出するとは考えにくく、またプロトペクチンの存在も疑問視されている⁵⁾。

ヘキサメタリン酸ナトリウムや塩酸は、細胞壁から多価陽イオンを取り去る作用があるとされている。この細胞壁には、分子量、メトキシ基含量および中性糖残基と多価陽イオンなどの含量や種類を異にするペクチン質が存在している。このペクチン質は、ヘミセルロースやその他の細胞壁の不溶性成分との間の相互作用や多価陽イオン存在下での結合により不溶化していると考えられている⁶⁾。

メトキシ基含量の少ないペクチン質はpH2.5以下の酸性溶液には溶けにくく、アルカリ塩類溶液やヘキサメタリン酸ナトリウム溶液には溶けやすい。一方、メトキシ基含量

の多いペクチン質は酸性溶液やヘキサメタリン酸ナトリウム溶液に溶けやすい。それ故、抽出溶媒系をヘキサメタリン酸ナトリウム溶液に続き塩酸とするとメトキシ基含量の異なるペクチン質をヘキサメタリン酸ナトリウム溶液に溶出する事となる。これに対し、瀧上および岡本⁵⁾は、抽出溶媒系を 塩酸→酢酸塩緩衝液→ヘキサメタリン酸ナトリウム溶液の順とすることでメトキシ基含量の異なるペクチン質の分別抽出が可能となることを報告した。しかし、この方法においては抽出操作に長時間を要するという難点がある。

著者らは、この難点を解決し、効率よく短時間でメトキシ基含量の異なるペクチン質を分別定量する方法について若干の検討を加えた。

実験方法

1. 実験材料

モロヘイヤの脱脂乾燥粉末を使用した。

2. 糖の抽出方法

①繰り返し(3回)抽出法

遠心分離用チューブ(50ml)に実験材料の25.0mgを秤取し0.01M塩酸溶液(pH2.0)(HClとする)で25.00gとし十分攪拌した後18℃(流水中)に20時間保持して糖を溶出した。その後、遠心分離(3000rpm、15min.)して上清を得、これを抽出1回目のHClによる糖溶出液(HCl画分)とした。次に、チューブ内の残渣にHClを加え25.00gとし、抽出1回目と同様の操作を行い抽出2回目のHCl画分を得た。さらに、同様の操作を繰り返し行い抽出3回目のHCl画分を得た。

この3回目の抽出残渣を糖の反応が陰性と

なるまで HCl で洗浄した後、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) (Ac-buffer とする) を 25.00g となるまで加え、HCl による抽出と同様に操作し、抽出 1 回目、抽出 2 回目、抽出 3 回目の Ac-buffer による糖溶出液 (Ac-buffer 画分) を得た。

次に、チューブ内の残渣を糖の反応がなくなるまで洗浄した後、2%ヘキサメタリン酸ナトリウム溶液 (リン酸で pH4.0 とする) (NaPO_3 とする) で 25.00g とし 2 時間保持した後遠心分離で上清を得、これを抽出 1 回目の NaPO_3 による糖溶出液 (NaPO_3 画分) とした。その後さらに 2 時間保持し抽出 2 回目、5 時間保持し抽出 3 回目の NaPO_3 画分を得た。

② 超音波処理時間、抽出温度および抽出時間の検討

実験材料 25.0mg を用い①と同様の抽出溶媒系で次の条件下で糖抽出操作を行い HCl 画分、Ac-buffer 画分および NaPO_3 画分を得た。

a: 超音波処理時間

超音波振とう攪拌器 (Iuchi VS-100 III Super 28) を用い、18°C (流水中) において HCl および Ac-buffer で各々 10 時間の抽出中 2 時間毎に、 NaPO_3 で 4 時間の抽出中 30 分毎に、各々 1 分間の攪拌 (1 分間処理) 又は 2 分間の攪拌 (2 分間処理) を付加した。

b: 抽出温度

18°C (流水中)、25°C および 35°C (Yamato Water Bath Incubator BT-25 を使用) の各温度で抽出操作を行った。なお、抽出処理時間は HCl と Ac-buffer による抽出は各々 10 時間、 NaPO_3 による抽出は 4 時間とし、超音波による攪拌は 2 分間処理とした。

c: 抽出時間

HCl および Ac-buffer で各々 20 時間の抽出を行う間に 5 時間毎に、 NaPO_3 で 8 時間の抽出を行う間に 2 時間毎に遠心分離により得た上清の 4.00g を採取し各抽出時間毎の糖溶出液を得た。抽出処理温度は 35°C、超音波処理は前記 B に準じた。

3. 分析方法

各抽出法で得た糖溶出液 (画分) について

次の分析を行った。

① ペクチン質の定量

カルバズール硫酸法^{7,8)} によった。

糖溶出液 1.0ml を試験管にとり、氷水中で冷却しながら濃硫酸 6 ml を加え、温度が上昇しないように混和した。試料の入った容器にガラス玉等で蓋をし、沸騰湯浴中で 10 分間加熱後氷水中で冷却した。これに、発色試薬 (0.1% カルバズールエタノール溶液) を 0.5ml 加え混合し発色させた。なお、空試験は、発色試薬の代わりに 95% エタノール 0.5ml を使用した。これらを 520nm で比色し、ガラクトキロン酸を標品とした検量線から定量した。

② 定量値の換算

2. ② c で得た各抽出時間毎の糖溶出液の糖量算出は次に依った。

HCl および Ac-buffer により 5 時間抽出また NaPO_3 で 2 時間抽出して得た溶出液の糖量は、分析値から算出した。抽出 10 時間 (HCl および Ac-buffer) および 4 時間 (NaPO_3) の場合は 0.84 を、抽出 15 時間 (HCl および Ac-buffer) および 6 時間 (NaPO_3) の場合は 0.68 を、抽出 20 時間 (HCl および Ac-buffer) および 8 時間 (NaPO_3) の場合は 0.52 を各々の分析値に乘じ算出した。

③ 塩化カルシウム添加による沈殿性

0.01M 塩酸溶液および酢酸ナトリウム緩衝液によって溶出したペクチン質 (精製水で透析し、抽出溶媒を除去しておく) 濃度を 0.1% とし、これに同量の 2~6 M 塩化カルシウム溶液を加え、沈殿生成の状態を観察した。

④ 粘度の測定

3. ③ と同様に 0.1% ペクチン質水溶液を調製し、20°C においてオストワルド粘度計を用い溶媒に対する粘度を測定した。なお、0.1% ペクチン質水溶液の調製時、酸の影響を除去するため、0.14M シュウ酸・シュウ酸ナトリウム混液および 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を各々試料の 1/2 量加えた。

結 果

I. 繰り返し（3回）抽出法の糖溶出状況

図1に示したように、Ac-buffer画分では抽出1・2回目の糖溶出量はほぼ同量で、この2回の抽出により総溶出量の約85%を溶出した。しかし、3回目の抽出時にも2回目の溶出量の40%に相当する8.7 $\mu\text{g/ml}$ の溶出を認めた。HCl画分およびNaPO₃画分では、抽出2回目と3回目ではほぼ同量の溶出を示し、これらは抽出1回目の溶出量に比しHCl画分が1.3~1.4倍、NaPO₃画分が1.7倍に相当した。

また、抽出1回目での溶出糖量は、HCl画分で全溶出量の25%に相当する4.4 $\mu\text{g/ml}$ 、Ac-buffer画分で40%に当たる21.7 $\mu\text{g/ml}$ 、NaPO₃画分で20%に当たる2.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。

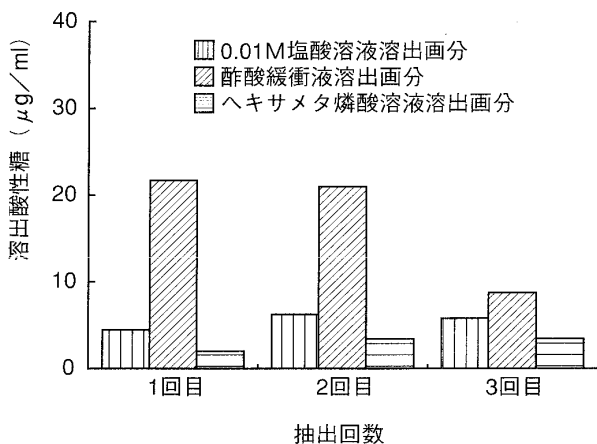


図1 抽出回数と溶出糖量

II. 抽出条件の検討

① 超音波による振とう攪拌処理の付加

抽出操作中の超音波による振とう攪拌付加が、糖溶出に及ぼす影響を検討した(図2)。

溶出した酸性糖の総量は、振とう攪拌を付加しなかった場合(無処理)は31.5 $\mu\text{g/ml}$ であったが、1分間処理により無処理の場合の2.3倍(72.8 $\mu\text{g/ml}$)、2分間処理により2.7倍(84.5 $\mu\text{g/ml}$)を示し、振とう攪拌時間が長くなるに伴って順次増加した。なお、この2分間処理での溶出量は繰り返し抽出法のそれ(76.6 $\mu\text{g/ml}$)の1.1倍であった。

また、抽出溶媒別の溶出糖量は、HCl画分では1分間処理で無処理の5.7倍(25.1 $\mu\text{g/ml}$)、Ac-buffer画分では2倍(41.8 $\mu\text{g/ml}$)およびNaPO₃画分で1.3倍(7.2 $\mu\text{g/ml}$)を示した。2分間処理の溶出量は、HCl画分およびNaPO₃画分では1分間処理の場合とほぼ同量であったが、Ac-buffer画分においては1分間処理の1.3倍(52.4 $\mu\text{g/ml}$)に増加した。

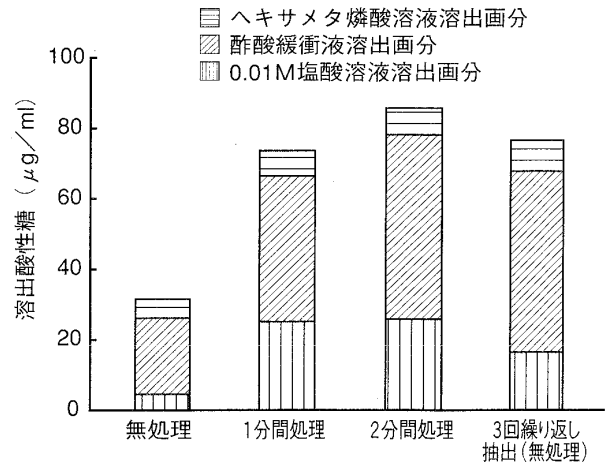


図2 超音波処理が糖溶出に与える影響

② 抽出温度の影響

抽出温度と糖溶出量の関係を検討した(図3)。

糖溶出量は、3画分とも処理温度が高くなるほど多くなった。HCl画分の糖溶出量は、25 $^{\circ}\text{C}$ 抽出(30.2 $\mu\text{g/ml}$)で18 $^{\circ}\text{C}$ 抽出の1.2倍、35 $^{\circ}\text{C}$ 抽出(40.0 $\mu\text{g/ml}$)では1.6倍に増加した。また、Ac-buffer画分においても、25 $^{\circ}\text{C}$ 抽出(67.9 $\mu\text{g/ml}$)では18 $^{\circ}\text{C}$ の1.3倍、35 $^{\circ}\text{C}$ のそれ(73.3 $\mu\text{g/ml}$)は1.4倍に増加した。なお、NaPO₃画分においては抽出処理温度のちがいにによる溶出量に大きな差はなく、25 $^{\circ}\text{C}$ および35 $^{\circ}\text{C}$ 抽出での溶出量は、共に18 $^{\circ}\text{C}$ のその1.2倍であった。

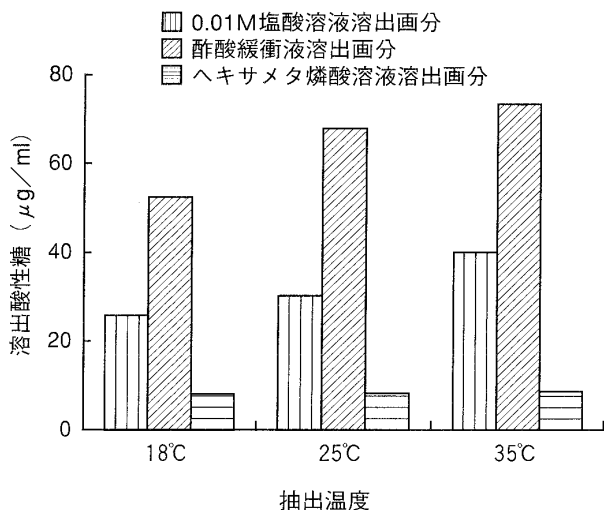


図 3 抽出温度と溶出糖量

③ 抽出時間の影響

糖抽出時間と糖溶出量の関係を経時的に測定した (図 4)。

35°C で抽出した場合、HCl 画分の糖量は、5 時間抽出では 28.6 μg/ml であったが、10 時間抽出で 5 時間抽出の 1.4 倍にあたる 40.0 μg/ml に増した。Ac-buffer 画分の糖量は、5 時間抽出では 60.6 μg/ml であったが、10 時間の抽出で 5 時間抽出の 1.2 倍の 73.3 μg/ml に増加した。また、NaPO₃ 画分の糖量は、抽出 4 時間で 8.6 μg/ml と 2 時間抽出 (7.9 μg/ml) に比し若干増加した。しかし、抽出時間をさらに長くしても、3 種類の抽出溶媒画分とも酸性糖の溶出量に増加を認めなかった。

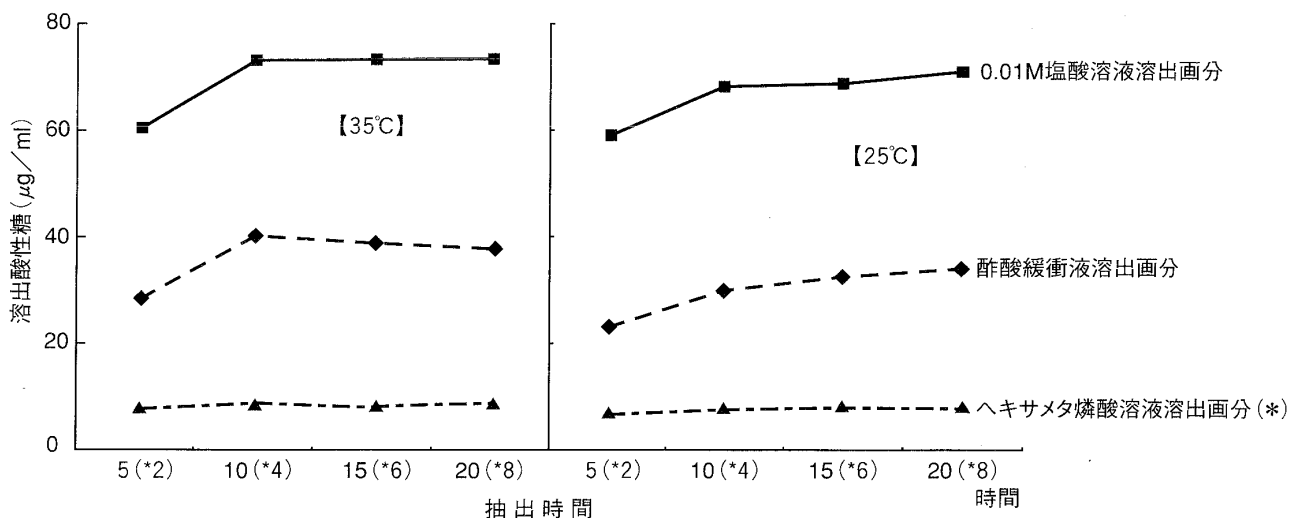


図 4 抽出時間と溶出糖量

なお、25°C で抽出操作を行った場合の溶出糖量は、HCl および Ac-buffer 画分では 20 時間の抽出中に漸次増加の傾向を示した。

Ⅲ. ペクチン質の性状比較

① 塩化カルシウムによる沈殿性

Ac-buffer 画分では、塩化カルシウムの終濃度 1 M で僅かな、2.5M で明瞭な沈殿を認めた。しかし、HCl 画分では塩による沈殿は終濃度 3 M においても認められなかった。

② 粘 度

0.1% ペクチン質溶液の溶媒に対する粘度は、HCl 画分では 1.2 であったが、Ac-buffer 画分では 1.6 を示した。

考 察

I. 繰り返し (3 回) 抽出法による糖溶出状況

18°C において、0.01M 塩酸溶液 (pH2.0)・酢酸ナトリウム緩衝液・2% ヘキサメタリン酸ナトリウム溶液で各々 3 回繰り返し抽出 (1 回の抽出時間は HCl と Ac-buffer による抽出が各々 20 時間および NaPO₃ による抽出が 2 時間 (3 回目のみ 5 時間)) した場合、抽出 1 回目で溶出した酸性糖量は総溶出量の 20~40%、3 回目の抽出時においても特に HCl 画分および NaPO₃ 画分では 2 回目とほぼ同量の

糖溶出を認めた。この結果から、金子ら⁴⁾が採用している抽出時間や温度では糖溶出は極めて不完全と考えられた。さらに抽出を3回繰り返しても糖は完全に溶出されなかった。すなわち、ペクチン質の分画定量法として多用される金子ら⁴⁾の方法では正確な定量値が得難いことから、ペクチン質を完全に溶媒中に溶出させる抽出条件を検討する必要性を推察した。

II. 抽出条件の検討

① 超音波による振とう攪拌処理の影響

抽出処理中、超音波による振とう攪拌をHClおよびAc-bufferによる抽出では2時間毎に5回、NaPO₃による抽出では30分毎に4回、各々1分間（1分間処理）又は2分間（2分間処理）行った結果、溶出した全酸性糖量は、振とう攪拌を行ななかった場合（無処理）に比し、1分間処理で2.3倍、2分間処理で2.7倍を示した。特に、HCl可溶性の酸性糖の溶出は、1分間処理で無処理の5.7倍まで増加した。さらに、糖溶出が緩慢であるAc-bufferにより抽出された糖量は、2分間処理で1分間処理の1.3倍に増加した。このように、抽出処理中の振とう攪拌の付加は、糖を効率よく抽出する有効な処理操作であり、この処理時間は長いほど効果的であった。特に、Ac-bufferのように糖の溶出に時間を要する場合には、超音波処理を施すことは極めて有効と考えられた。

② 抽出温度の影響

溶質の溶出量は抽出処理温度に影響を受け易いことから、抽出処理温度の設定は重要な一因と考えられる。

ペクチン質抽出時の温度について、瀧上および岡本⁴⁾はHClとAc-bufferによる抽出を35℃、NaPO₃による抽出を85℃としている。一方、金子らの方法⁴⁾ではH₂OおよびNaPO₃による抽出を室温としている。

本実験では、18、25および35℃で抽出処理操作を行った。その結果、糖溶出量は、HCl、Ac-bufferおよびNaPO₃による抽出とも処理温度が高いほど多く、特にHCl画分とAc-buffer

画分ではこの傾向が顕著であった。つまり、試料からの糖抽出温度は瀧上ら⁵⁾の報告のように35℃が適していると考えられた。また、金子ら⁴⁾のように室温処理では、分析時の室温によって糖溶出量が変動する事が考えられ、糖含量の経時的な比較検討などが不正確となりかねないと考えられた。

③ 抽出時間の影響

糖を溶出させる抽出処理時間について、金子ら⁴⁾はHClとAc-bufferによる抽出を一昼夜およびNaPO₃による抽出を2時間とし、また瀧上と岡本⁵⁾は、HClとAc-bufferによる抽出を三昼夜およびNaPO₃による抽出を6時間としている。

抽出温度を25および35℃、超音波処理をHClとAc-bufferによる抽出時は2時間毎に、NaPO₃による抽出時は30分毎に各々2分間付加し、抽出時間と糖溶出量の関連を検討した。その結果、35℃で抽出した時の糖量は、HCl画分およびAc-buffer画分では抽出10時間で抽出5時間の、NaPO₃画分では抽出4時間で抽出2時間の各々1.1~1.4倍に増えた。その後抽出を継続しても3種類の抽出溶媒画分とも糖溶出量の増加は認められなかった。すなわち、試料からの糖溶出に要する時間は、35℃で振とう攪拌処理付加（HClとAc-bufferによる抽出で2時間毎に、NaPO₃による抽出で30分毎に2分間）下においては、HClおよびAc-bufferで10時間およびNaPO₃で4時間で完全であると考えられた。

III. ペクチン質の性状の比較

塩化カルシウムによる沈殿性および相対粘度はAc-buffer画分がHCl画分に比し明らかに高く、Ac-buffer画分には多価陽イオンでゲル化する低メトキシペクチン含量が多いと推察された。同様の結果は、大根やジャガイモ⁵⁾、レンコン⁹⁾、ラッキョウ¹⁰⁾、ゴボウ¹¹⁾などで報告されている。なお、Ac-buffer画分のエステル化度(45~56%)はHCl画分のそれ(59~68%)と比し低く、Ac-buffer画分にメトキシル基が少ない⁵⁾ことが認められている。

以上から、ペクチン質を短時間でメトキシル基含量の違いで効率よく分別定量するには、35℃において、0.01M 塩酸溶液 (pH2.0) に続き酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で超音波による振とう攪拌処理を2時間毎に2分間付加し10時間、次にヘキサメタリン酸ナトリウム溶液 (pH4.0) で超音波処理を30分毎に2分間付加し4時間の抽出を行うことが有効と考えられた。これにより、従来のペクチン定量法で問題とされていた ①試料中の酸性糖溶出が不完全、②メトキシル基含量の異なるペクチンの分別不可、③分析に要する時間が長いなどの点が解消された。

要 約

従来のペクチン定量法は、メトキシル基含量別の分画が不良、分析時間が長いなど若干の問題点がある。そこで、0.01M 塩酸溶液 (pH2.0) に続き酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0)、次にヘキサメタリン酸ナトリウム溶液 (pH4.0) を抽出溶媒⁵⁾ に使用し、短時間でメトキシル基含量の異なるペクチン質を分別定量する簡易法について検討した。

- ① 超音波による振とう攪拌を塩酸溶液および酢酸ナトリウム緩衝液で10時間の抽出中2時間毎に、ヘキサメタリン酸ナトリウム溶液で2時間の抽出中30分毎に、各々2分間行った結果、溶出した糖量は振とう攪拌を行なかった場合に比し顕著に増加した。
- ② 抽出を18、25および35℃の3種の温度で行った結果、糖の溶出量は処理温度が高いほど多く、特に塩酸溶液および酢酸ナトリ

ウム緩衝液による抽出ではこの傾向が顕著であった。

- ③ 抽出温度35℃ および超音波による振とう攪拌を一定間隔で2分間付加した場合、糖溶出に要する抽出時間は、塩酸溶液および酢酸ナトリウム緩衝液で10時間、ヘキサメタリン酸ナトリウム溶液で4時間であった。

なお、本研究の一部は平成12年度日本家政学会中部支部大会で発表した。

参考文献

- 1) Bettelheim, F. A and Sterling, C. : *Food Res.*, 20, 118 (1955)
- 2) 三浦 洋, 水田 昂: 園芸誌, 31, 17 (1962)
- 3) 沢山 茂, 内村佳子, 川端晶子: 日家誌, 35, 242 (1984)
- 4) 金子ら: 新・食品分析法, 光琳, p575 (1996)
- 5) 洲上倫子, 岡本賢一: 日栄食誌, 37, 57 (1984)
- 6) 高木幸子: 日調科誌, 24, 150 (1991)
- 7) 日本生化学会編: 生化学実験講座4 糖質の化学(下), 東京化学同人, p375, (1979)
- 8) 福井作蔵: 生物化学実験法1 還元糖の定量法, 学会出版センター, p57 (1985)
- 9) Fuchigami, M. and Kishigami, Y. : *J. Home Ecom. Jpn.*, 42, 223 (1991)
- 10) Fuchigami, M., Sasaki, A., Kishigami, Y. and Sanmoto, A. : *J. Home Ecom. Jpn.*, 42, 683 (1991)
- 11) Fuchigami, M., Kishigami, Y. and Sasaki, A. : *J. Home Ecom. Jpn.*, 41, 957 (1990)