

カードランゲルのゲル化機構について

久下 喬・末次信行*¹・西山浩二*²

TAKASHI KUGE, NOBUYUKI SUETSUGU and KOJI NISHIYAMA

On the formation of curdlan gel

要旨： カードランゲルをガラス製オートクレーブ中で加熱しながらゲルに生じる変化を観察した。その結果、ゲル濃度に依存するが、カードランゲルは 140~160°C で融解することを見出した。また、温度変化に伴うゲル構造の変化をX線回折、酵素による消化性、ゲル強度などの面から追跡した。これらの結果からカードランゲルのゲル化機構について考察を行ない、カードランゲルのゲル化は高分子の結晶化過程で良く説明できることを示した。

緒 言

カードランは微生物が生産する多糖類の1種であって、構成糖は D-グルコースのみであり、そのグルコシド結合の99%以上が β -1,3結合であると言われている¹⁾。カードランは水不溶性であるが、その水懸濁液を加熱すると熱不可逆性のゲルを形成する²⁾。寒天やゼラチンなどのゲルは加熱により可逆的に融解してゾルになるのに対し、グルコマンナン（コンニャクマンナン）やカードランのゲルは100°Cまでの加熱に対しては安定である。また、メチルセルローズ水溶液では加熱によりゲル化が起り、冷却すると再びゾルにもどる。これらの物質によりつくられるゲルがこのようにさまざまな温度依存性をもっていることは、これらのゲルのゲル化機構がそれぞれ異なっていることを示唆するものである。我々はさきにカードランゲルも約150°C前後の温度において熱可逆的に融解することを見出し、そのゲル化機構は寒天類似のものであることを示した³⁾。しかし、なおカードランゲルにおいては疎水結合によりゲル構造が保たれているとの報告もあるので、本報においてはカードランゲルの種々の性質

の温度依存性からそのゲル化機構について再度考察を加えることにする。

試 料

実験に使用した試料は武田薬品工業株式会社より提供されたカードラン 13140 およびその加水分解物3種である。カードラン13140は *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* IFO 13140 が生産するカードランであって、そのグルコシド結合はすべて β -1,3結合であると報告されている⁴⁾。これらの粉末試料を十分に水洗して脱塩後、減圧乾燥して実験に使用した。これらの試料の数平均重合度は、クロモトローブ酸法⁵⁾により測定した結果、それぞれ1910、1720、1350および680であった。^{注)}

カードランゲルおよび粉末の酵素的加水分解に使用した β -1,3グルカナーゼは天野製薬株式会社製“グルクチーム”に含まれる β -1,3グルカナーゼを Horitsu ら⁶⁾の方法により抽出精製して用いた。本酵素の性質を検討した結果、本酵素は endo 型 β -1,3グルカナーゼであった⁷⁾。なお、“グルクチーム”は *Rhizopus niveus* が生産する酵素より調製されたグルコ

京都府立大学農学部天然高分子化学研究室

Laboratory of Biopolymers, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Kyoto

*¹ 現在京都家政短期大学

*² 現在京都栄養士専門学校

昭和54年7月28日受理

注) 武田薬品工業KKの資料によるとこれらの試料の平均重合度は、それぞれ462、415、255および125である。

アミラーゼ製剤である。

実験方法と結果

ゲルの融解

直径約 1 cm の小試験管内において、酸素を除去した水に試料粉末を懸濁させ、60°C 前後で膨潤ゾル化した後、90°C で10分間加熱してゲルを形成させる（このゲルを90°C セットゲルと呼ぶ）。室温で冷却した後、ゲルの上端に小さな剛球（径≒3 mm）を置きオートクレーブ内に設置する。使用したオートクレーブは耐圧硝子工業株式会社製 EM-U 型で、加圧容器（容量 500ml）がガラス製なので外部から容器内部を観察することができる。加圧容器に約200ml の水を入れ窒素ガスを通じて酸素ガスを十分に除去した後、約 0.5°C/min の昇温速度で加熱を行なった。そして剛球がゲル内を素早く底部まで落下する温度を読み取り、ゲルの融点とした。各試料について得られた結果を Table 1 に示す。これらの結果はいずれも 5 回以上の測定の平均値である。

また、これらの融点測定に際して直接観察されたゲルの状態変化はつぎの通りであった。各試料ゲルとも約120°C までは何らの変化も見られないが、130°C 前後になると若干の離水が生じてくる。離水の程度は試料の重合度が低いほど、またゲル濃度が低いほど著しい。90°C セットゲルは幾分不透明であるが 135°C 前後になるとやや透明度が増す。さらに温度が上昇して融点近くまで達すると、各試料ゲルともほとんど完全に澄明になり、その直後にゲル上部に置かれた剛球が素早く底部まで落下するのが見られた。このようにゲルの融解はかなり鋭敏に起こり、カードランは完全に溶解する。溶解後の溶液は澄明で濁りは見られなかった。つぎに温度を低下させると、各試料とも、重合度、濃度に関係なく、136°C 前後より白濁を生じ、さらに温度が下ると凝固してゲルを形成する。このようにして形成されたゲルを以後再生ゲルと呼ぶが、再生ゲル

Table. 1. Melting Points and Gel Concentrations of Curdlan 13140.

Cocn.	DP _n			
	860	1350	1720	1920
1.0%	139.0°C	140.3°C	142.0°C	144.5°C
2.0%	145.5	147.3	148.2	149.4
3.0%	147.7	149.0	152.3	154.0
4.0%	149.0	150.2	154.2	155.2
5.0%	150.8	152.7	157.3	158.5

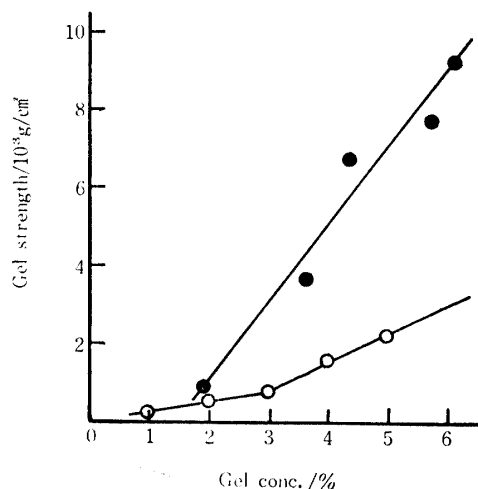


Fig. 1. Relation between Concentration and Strength for 90°C Setting and Regenerated Gels of Curdlan 13140 ($\overline{DP}_n=1920$).

○, 90°C setting gel

●, regenerated gel

を再び上と同様にして加熱しても180°C（装置の加熱限界）までは融解しなかった。

ゲル強度の測定

飯尾電機株式会社製 M301 カードメーターにより室温においてゲル強度を測定した。この場合、90°C セットゲルについては離水によるゲル濃度の変化は無視できるが、再生ゲルの場合は離水が著しかったため、ゲル濃度の決定は再生ゲルの一部を乾燥、秤量することにより行なった。Fig. 1 にその結果を示すが、再生ゲルのゲル強度が 90°C セットゲルに比べて非常に大きいことが見られる。

X 線回折

重合度1920の試料の 3% 90°C セットゲル、140°C セットゲル（90°C セットゲルをおートクレーブ中で140°C に加熱冷却したゲル）、および再生ゲルのそれぞれをガラス製スリ合せホモジナイザーでエタノールを加えながら磨砕脱水を十分に行なった後、減圧乾燥して得られた粉末および元のカードラン粉末について X 線回折を行なった。使用した装置は島津製作所製 X 線回折計 GX-3 型で X 線は CuK_α 線である。なお、測定に際しては相対湿度70%のデシケーター中に各試料を 3 日間放置し調湿して使用した。その結果を Fig. 2 に示す。図より明らかなように、ゲルの高温処理により回折図形が変化する。特に $2\theta=6^\circ$ 近くのピークの変化が顕著であって、処理温度の上昇に伴って鋭くなり、再生ゲルより得た粉末において最も大きな鋭いピークが見られる。

Table 2. Degree of Hydrolysis of Curdlan 13140 by β -1, 3-Glucanase from *Rhizopus niveus*.

Powder				Gel
Original	90°C Setting Gel	140°C Setting Gel	Regenerated Gel	90°C Setting Gel
70.6%	55.5%	36.9%	15.5%	54.1%

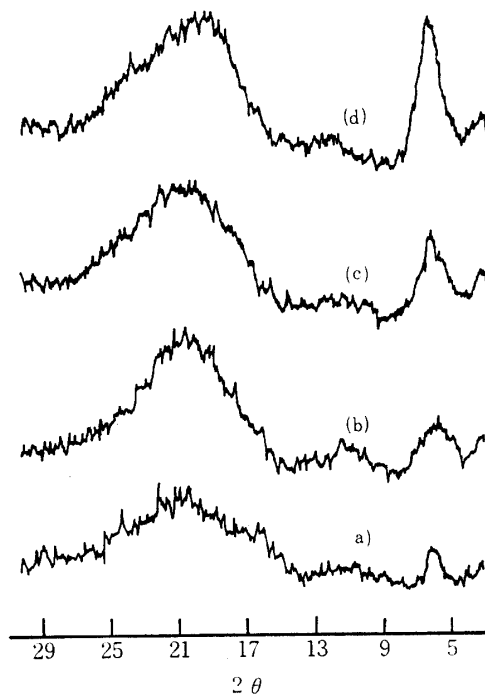


Fig. 2. X-ray Diffraction Patterns of Curdlan Powders prepared from various gels.

- (a), original powder
 (b), 90°C setting gel
 (c), 140°C setting gel
 (d), regenerated gel

酵素分解

X線回折に使用した各試料粉末を酢酸緩衝液 (0.02 M, pH 5.3) に懸濁し, β -1,3 グルカナーゼを30°C^{注)}で72時間作用させた後, 上澄液中に遊離する全糖量をフェノール硫酸法により定量して酵素による分解率を求めた。なお, 90°C セットゲルについてはゲル状態のまま加水分解する実験も同様に行なった。その結果を Table 2 に示す。この結果を X 線回折の結果と比較すると結晶性の良い試料ほど分解率が悪いことが見られ, 結晶性領域は酵素分解に対し抵抗性が大きい構造をもっているようである。

考 察

カードランゲルは熱安定性であり, 加熱により融解

しないものと考えられてきた。しかし, 上述のようにオートクレーブ中で加熱すると, 140~160°C でカードランゲルは完全に融解し, 冷却するとゲルにもどる。したがってカードランゲルのゾル-ゲル転移の温度依存性 (方向性) は, カラゲナン, 寒天, ゼラチンなどのゲルと同じであるが, カードランゲルはこののゲルに比較すると高い転移温度をもっているので熱不可逆性で熱安定性のゲルを与えるものと考えられたのであろう。

カードランゲルを磨碎して脱水乾燥して得られた粉末は Fig. 2 のように結晶性の X 線図形を示した。このことからゲル構造の中に微結晶領域が含まれていることが分る。しかも, 処理温度の高いゲルから得られた粉末ほど良い結晶性を示している。Marchessault⁸⁾ はジメチルスルホキシド溶液から調製した結晶性の低いカードラン繊維を水の存在下, 143°C でアニーリングすることにより結晶性が非常に改良されることを X 線回折法により示し, またこの回折図形の解析から, カードランが3重らせん構造を取っているものとしている。Takada⁹⁾ はアルカリ溶液から調製したカードランフィルムで同様のアニーリングを行なうことにより, カードランは単らせんから3重らせんに転移するものとした。さらに Saito¹⁰⁾ はカードランゲルの ¹³C-NMR測定を行なった結果, ¹³Cシグナルの一部が消失することを認め, その原因は多重らせんが形成されたためであるとしている。このらの事実はすべてカードランがらせん構造を取って結晶し易く, またアニーリングにより容易に結晶が改善されることを示すものである。したがってカードランゲルの三次元網目構造の結合帯の構造として, 多数の多重らせんの集合によって生じる微結晶構造を仮定することは不合理ではない。さらに温度が高くなるほどアニーリングにより完全な結晶になり易いので, 高温にするほど, 融点より低い限り, ゲル中のこれらの微結晶構造が発達するものと思われる。もし酵素が非結晶領域に存在するすべての分子鎖を分解するものとするれば, 酵素による分解率が近似的に非結晶領域に含まれる分子の分率

注) 本実験により生じた還元糖はグルコースからラミナリペンタオースまでのオリゴ糖であったが, その約70%がグルコースであった。

を表わすので、再生ゲルの結晶化度は約85%、90°C セットゲルでは約45%の結晶化度をもつとすることができる。この絶対値は必ずしも意味をもたないが両者の相対的な比較をこの値で行なうことは可能であろう。このように約2倍に達する結晶化度の差が大きなゲル強度の差を与えるものと思われる (Fig. 1)。Maedaら²⁾が、100°C以下の実験ではあるが、ゲルのセット温度に比例してゲル強度が大なることを報告しているがこれもアニーリング効果によるものと思われる。

再生ゲルから得た粉末の水懸濁液を100°Cまで加熱してもゲルを形成せず、アルカリに粉末を溶解した後、透析により徐々にpHを下げることによって始めてゲル化が可能であった。90°Cセットゲルから得た粉末では元の試料粉末同様に加熱によってゲル化した。この理由はつぎのようである。ゲルが形成されるには、高分子鎖間に結合帯が形成されるほか、溶媒と強い親和性をもった部分が系全体に拡がるのに十分な量だけ存在することが必要である。しかるに再生ゲルから得た粉末の結晶化度が上記のように大きいため、100°Cまでの加熱では溶液中に拡がる分子鎖が不足したためであろう。

紺野ら¹¹⁾はカードランの水懸濁液を63°Cまで加熱してゾル化した後に冷却するとゲルが得られるが、このゲルは63°Cで可逆的に融解すること、さらに温度を上げるとこのゾルは熱不可逆的にゲル化することを見出した。そして63°C以下で起こるゾル-ゲル転移は水素結合の生成、破壊にもとづき、高温における不可逆的なゲル化は疎水結合の生成によるものと解釈している。しかし、さきに述べたようにここで見られた熱不可逆性ゲルは見掛け上の熱安定性ゲルであり、140~160°Cで融解するものであるから疎水結合により生成したゲルではなく、上述したようにカードランの結晶化によって生じるゲルである。結晶化には恐らく多数の分子鎖間水素結合の生成が伴っているものと思われる。また、63°C以下で見られるゾル-ゲル転移についても高分子結晶-稀釈剤系における結晶の融点およびガラス温度(二次転移点)の考え方でつぎのように良く説明できるものと思われる。

カードラン粉末には、酵素分解の結果からも分るように、非結晶部が多く含まれているが、室温附近ではガラス温度以下であるため、分子運動が束縛され、溶解も膨潤も起さない。ガラス温度が近づくと非結晶部においては分子運動が活発となり、溶媒との相互作用も大となり粒子は膨潤して分子鎖は系全体に拡がる。系全体に拡がった多数の分子鎖が相互に接触した後温度が上げればアニーリングによって安定な結晶が成長し

て強固な結合帯が生成するので不可逆性ゲルが形成される。もし、分子鎖が拡がった後、温度がガラス温度以下に下げられると分子運動が凍結されるので弱い網目構造ができてゲル化が起こる。このゲルの網目構造には恐らく水素結合も結合点として含まれているであろうが結晶化は起っていないので温度が上れば容易にゾルにもどる。すなわち、紺野らが与えた63°Cは水の共存下におけるカードランのガラス温度に相当し、我々が観察したゲルの融点はカードランの結晶の融点であると理解される。

平井¹²⁾はゲルの弾性率について理論および実験的研究を行なった結果、ゲルの弾性率はガラス温度を転移点として温度とともに急激に減少すること、その後温度とともに上昇する(融点が高くないと通常認められないが)が融解により急低下するものであることを示した。この理論はKonnoら¹³⁾がカードランゲルについて報告した弾性率の温度変化についての結果と定性的には完全に一致するものであって、ゲル弾性の面からもカードランゲルの温度依存性は、ガラス転移点および結晶の融点の考え方によって良く説明できるものである。

最後に試料を恵与された武田薬品工業株式会社の御好意に対し厚く感謝します。

引用文献

- 1) T. HARADA, A. MISAKI and H. SAITO, *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 292 (1968).
- 2) I. MAEDA, H. SAITO, M. MASADA, A. MISAKI and T. HARADA, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1184 (1967).
- 3) T. KUGE, N. SUETSUGU and K. NISHIYAMA, *Agr. Biol. Chem.*, **41**, 1315 (1977).
- 4) 中西 造, 楠井貞雄・木村一次・金丸恒雄・大西功二, 日本農芸化学会関西支部例会講演, **1972**.
- 5) H. AKAI, Y. YOKOBAYASHI, A. MISAKI and T. HARADA, *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 422 (1971).
- 6) H. HORITSU, T. SATAKE and M. TOMOEDA, *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1007 (1973).
- 7) 齊藤英子, 学士論文, 京都府立大学, **1976**.
- 8) R. H. MARCHESSAULT, Y. DESLANDES, K. OGAWA and P. R. SUNDARAJAN, *Can. J. Chem.*, **55**, 300 (1976).
- 9) H. TAKEDA, N. YASUOKA, N. KASAI and T. HARADA, *Polymer J.*, **10**, 365 (1978).
- 10) H. SAITO, T. OHKI and T. SASAKI, *Biochem.*, **16**,

- 908 (1977).
- 11) 紺野 昭・木村 博・中川鶴太郎・原田篤也, 農化, **52**, 247 (1978).
- 12) 平井西夫, 日化, **72**, 837 (1951), **73**, 65, 68 (1952), **74**, 235, 259 (1953).
- 13) A. KONNO, Y. AZECHI and H. KIMURA, *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 101 (1979).

Summary

Curdlan gel were submitted to high temperature treatment in a glass-vessel autoclave. The gel were seen to be melted sharply at temperatures 140~160°C depending on the gel concentrations. Crystallinities of the gels were estimated by means

of an X-ray diffraction method and an enzymatic digestion of powders prepared from the gels. From these results, the process of the gel formation of curdlan seems to be well interpreted by assuming polymer crystallization.