

# チクロヘプタグルカン(ベーターシャルディングーデキストリン)沃素複合体の性質とその比色定量法について\*

宮 崎 芳 光

(生物化学研究室)

昭和 45 年 12 月 28 日 受理

## Quality of Cycloheptaglucan ( $\beta$ -Schardinger Dextrin) Iodine Complex and Its Colorimetry

Yoshimitsu MIYAZAKI

(Laboratory of Biochemistry)

Received December 28, 1970

### Summary

The colorimetric determination was carried out for cycloheptaglucan-iodine complex.

One thousandth normality of iodine solution was added to the sample solution until the volume became three times, and optical density was determined at 400 m $\mu$  against the blank.

The error was within plus or minus four per cent.

The results obtained by this iodine method almost agree with those by the measurement of reducing power with 3,5-dinitrosalicylic acid reagent in the determination of cycloheptaglucan digested with Taka-amylase A.

Dissociation constant of this complex was found to be  $5.3 \times 10^{-4}$  in graphing according to assumption of the formation mechanism of the complex.

チクロヘプタグルカン (CHG) が沃素と黄色の複合体を形成することは, French<sup>1)</sup> により知られていたが, 詳細な報告はない. また CHG の定量法として Tilden らの検鏡法があるが, これに二三の難点のあることは French が指摘した通りである. そこで, この複合体の性質を調べ, 酵素反応時における条件下での比色法を設定した. また, タカアミラーゼ A (TAA) の CHG に対する作用をこの定量法と 3,5-ジニトロサリチル酸を用いた還元力の定量法によって測定し, 比較検討した.

### 実 験 試 料

1) チクロヘプタグルカン (CHG): このデキストリンは, *Bacillus macerans* をデンプンに作用させた時に, ヘキサ, ヘプタ, オクタ, 等の混合物として得られる. 分離法は French により研究され, 改良法が河野および二国<sup>2)</sup>により報告されている. この実験に供した CHG は, 粗結晶を更に精製して用いた. その過程を Scheme 1. に示す. デキストリン, 有機溶媒複合体の生成を French は一般に, 全溶液の 1/8 容のプロモベンゼンを添加して行なっているが, 河野らの報告では, 全液量の 1/50 容のプロモベンゼンで (ヘプタ+オクタ) 区分が完全に沈澱したと

\* 本報告の大要は日本農芸化学会全国大会で発表した. (1968 年, 於名古屋)



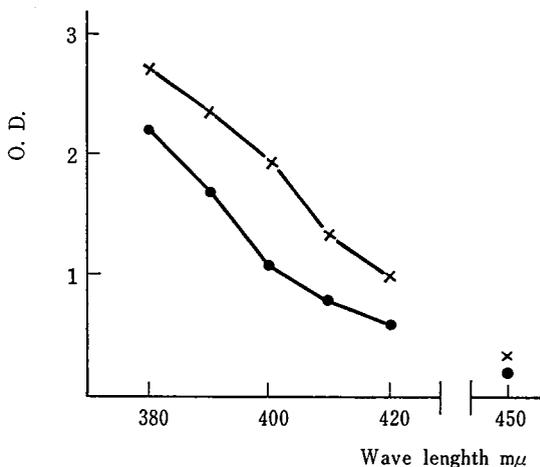


Fig. 1. Optical Density of CHG Complex with Iodine, and Iodine Solution versus Wave Length.

-x- | 0.001N iodine sol. 4 ml | ●- | 0.001N iodine sol. 4 ml  
 CHG sol. (1%) 1 ml | distilled water 2 ml  
 distilled water 1 ml

cell: 10mm, cont: distilled water.

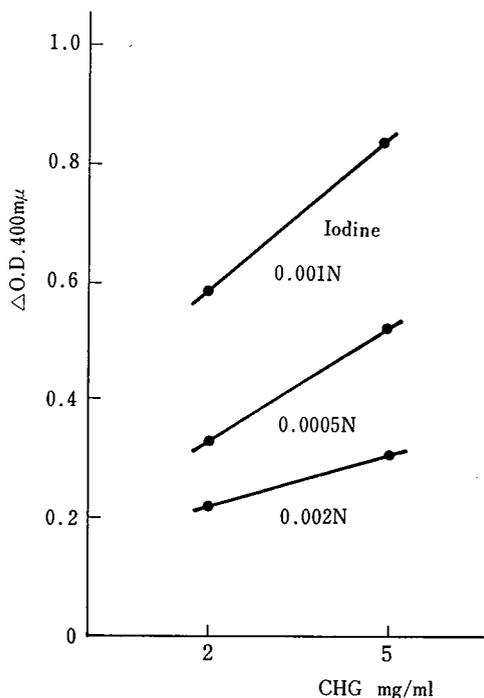


Fig. 2.  $\Delta$ O.D. 400mμ of CHG Complexes with Iodine versus Amounts of CHG.

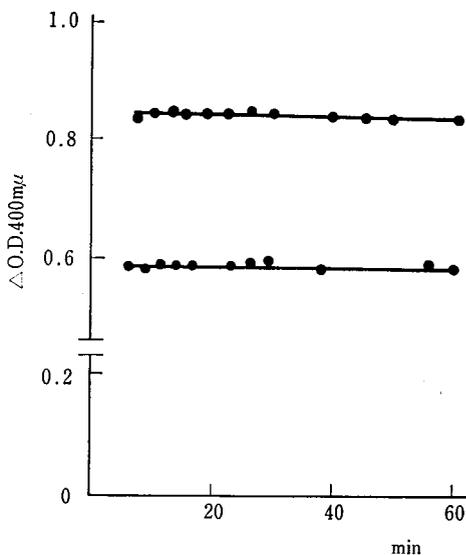


Fig. 3.  $\Delta$ O.D. 400mμ of CHG Complexes with Iodine versus Times.

定である。

試料溶液 1 ml 中の CHG の mg 量を横軸に取り  $\Delta$ O.D., 400mμ を縦軸に取った検量線を

Fig. 4 に示す. この際, 試料溶液に対する, 添加沃素溶液の容量比は常に 1:2 である. 検量線からわかるように, 比色測定の場合, CHG の量は試料溶液 1ml あたり 5mg 以下が好ましく, 濃い場合は, 予め試料溶液を稀釈して測定するとよい.

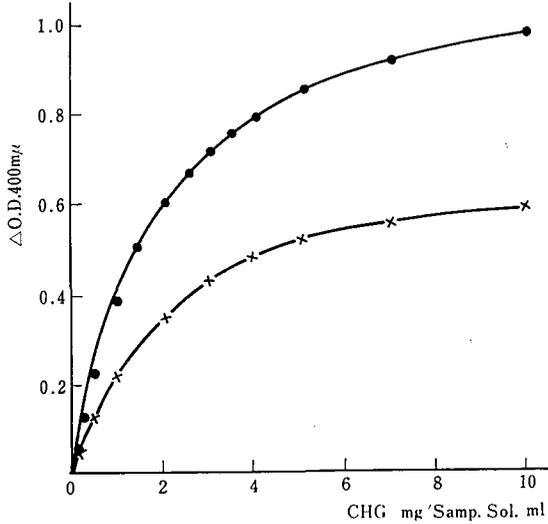
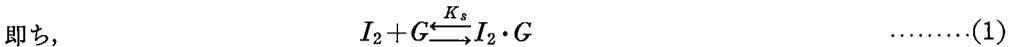


Fig. 4. Standard Curve of CHG Complex with Iodine.  
 -●-: 0.001N iodine sol.; -×-: 0.0005N iodine sol. cell: 10mm.

2. 複合体の解離定数の推定

Fig. 4 の曲線から, 複合体と遊離体は平衡系を形作っていると考えられるので, 複合体濃度が ΔO.D. 400mμ に比例すると仮定して, 解離定数を求めてみた.



ここで,  $I_2$ : 沃素,  $G$ : CHG,  $I_2 \cdot G$ : 複合体,  $K_s$ : 複合体の解離定数,  $A$ : ΔO.D. 400 mμ,  $k$ : 比例定数と表わせば,

仮定より,  $[I_2 \cdot G] = kA$  又,  $[G] \gg [I_2]$

従って, 
$$K_s = \frac{[I_2 - I_2 \cdot G][G]}{[I_2 \cdot G]} = \frac{[I_2 - kA][G]}{kA}$$

$$\therefore kA = \frac{[I_2][G]}{K_s + [G]} \quad \therefore \frac{1}{kA} = \frac{K_s}{[I_2][G]} + \frac{1}{[I_2]}$$

$$\therefore \frac{1}{A} = \frac{K_s \cdot k}{[I_2]} \cdot \frac{1}{[G]} + \frac{k}{[I_2]} \quad \dots\dots(2)$$

$$\therefore \frac{[G]}{A} = \frac{k}{[I_2]} \cdot [G] + \frac{K_s \cdot k}{[I_2]} \quad \dots\dots(3)$$

従って  $\frac{[G]}{A} = 0$  のとき

$$\frac{k}{[I_2]} \cdot [G] = -\frac{K_s \cdot k}{[I_2]}$$

$$\therefore [G] = -K_s \quad \dots\dots(4)$$

(3)式から  $\frac{[G]}{A}$ ,  $[G]$ , を両軸として作図し,  $[G]$  軸と直線の交点から解離定数は求められる。作図の結果を Fig. 5 に示す。図の CHG 低濃度部においての, 直線からのずれは  $[G] \gg [I_2]$  の不成立のためであると考えられる。解離定数が, 沃素濃度に無関係なのは(4)式から明らかである図から複合体の解離定数を,  $5.3 \times 10^{-4}$  と推定した。

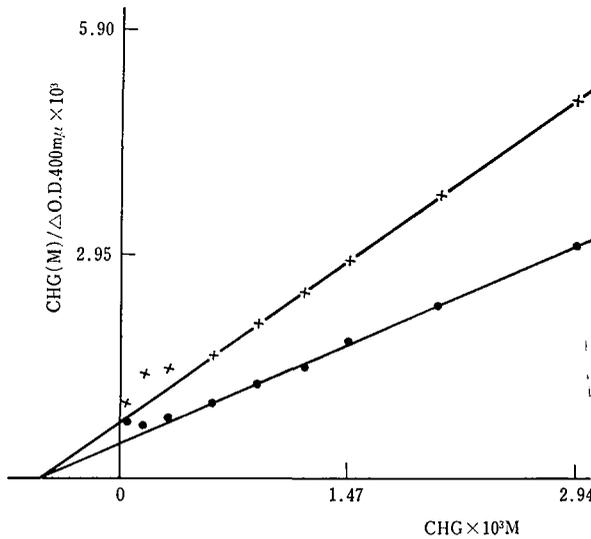


Fig. 5. CHG/ΔO.D. 400mμ versus CHG Plot, which is introduced from Data shown in Fig. 4.  
 -x-: 0.0005N iodine solution, -●-: 0.0001N iodine solution.

### 3. 複合体による呈色に及ぼす緩衝液の影響

緩衝液の種類および濃度が呈色に与える影響を Table 2 に示す。McIlvain 緩衝液は呈色を大

Table 2. Changes in ΔO.D. 400mμ due to the Formation of Complex of Cycloheptaglucan with Iodine under Various Conditions.

Buffer (1ml)	kinds	Acetate				McIlvain	
	conc.	0.05M	0.2M	0.5M	0.05M	0.05M	
	pH	4.7	5.3	5.85	5.85	5.5	6.0
CHG (1%, ml)		1	1	1	1	1	1
Iodine 0.001N (ml)		4	4	4	4	4	4
ΔO.D. 400mμ		0.830	0.835	0.839	0.835	0.010	-0.31

きく乱す。このことはこの複合体が, 沃素, アミロース複合体と同様に, 沃素が電子受体となり<sup>5)</sup>, いわゆる, 電荷移動複合体を形成しているため, この緩衝液の成分であるクエン酸が, 電子供与体として作用し, 複合体形成を妨げた結果と考えられる。酢酸ナトリウム緩衝液は, 供試濃度お

よび pH の範囲内では影響を及ぼしていない。

Table 3 には、酢酸緩衝液の各濃度での実験誤差を求めた結果を示す。最大±4%の測定誤差が存在する。

Table 3. Formation of Cycloheptaglucan Complex with Iodine in a Given Ratio by Volume.

Sample solution	Acetate-buffer (pH 5.85)	0.5M	0.05M	0.5M	0.5M	—	0.5M
	CHG (1%, ml)	0.5	0.5	1	1	—	2
Iodine 0.001 N (ml)		2	2	3	4	2	6
CHG mg (found)		5.1	5.2	4.8	10.0	9.8	10.2
CHG mg (calcu)		5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0
Error (%)		+2	+4	-4	0	-4	+2

#### 4. CHG の TAA による分解の測定

CHG の TAA による消化の様子を、時間を函数として、沃素比色法と還元力測定法の両法で測定し、比較検討した結果が Fig. 6 である。横軸は時間を示し、縦軸は、沃素法では CHG の消

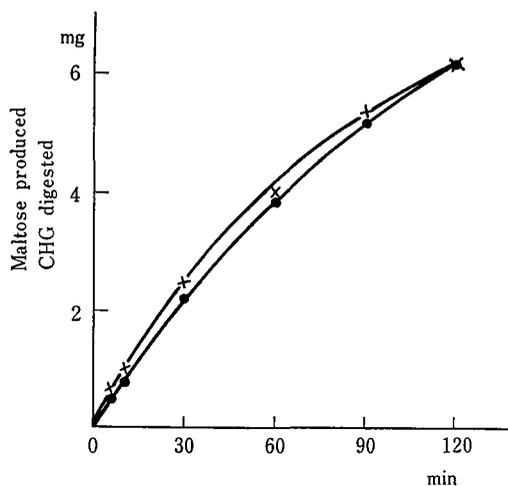


Fig. 6. Digestion of CHG by TAA.

-x-: CHG digested;

-●-: Maltose produced (3,5-dinitrosalicylic acid)

費量、還元力測定法では3,5-ジニトロサリチル酸を用いて、生成物をマルトーズと仮定して算出した量であり、共に mg で示してある。反応開始後、やや還元力測定法による数値が低いが、時間の経過と共に一致してくる。これは反応開始直後の生成物であるマルトテトラオーズが漸次低分子のマルトーズに変化するためと考えられる<sup>6)</sup>。しかしながら、両測定値は非常によく似ており、CHG の TAA による分解を測定するには、試薬の安定性からみて、還元力測定法が有利であろう。ただし、3,5-ジニトロサリチル酸による比色法では、比色の条件を検量線作製の場合と同一にせねば、測定値が信頼出来ないことに留意する必要がある。

本研究を行なうに当たって、チクロヘプタグルカンの粗結晶を頂いた、二国二郎教授、福井俊郎教授に深甚の謝意を表する。

## 摘 要

チクロヘプタグルカンと沃素の複合体の性質を調べ、比色法による CHG の定量法を設定した。すなわち、試料溶液 1 容に、0.001N 沃素溶液 2 容を加え、ブランクを対照として、光学密度を 400 m $\mu$  で測定し、検量線から算出する。測定誤差は  $\pm 4\%$  以内である。CHG の TAA による消化を、この定量法と還元力測定法によって比較測定したところ、殆んど一致した結果を得た。またこの複合体の解離定数を、 $5.3 \times 10^{-4}$  と推定した。

## 文 献

- 1) FRENCH D.: *Advances in carbohydrate chemistry*, **12**, 189 (1957)
- 2) 河野啓一・二国二郎: *澱粉工業学会誌* **9**, 23 (1961)
- 3) 池中徳治: *蛋白質核酸酵素* **6**, 227 (1961)
- 4) FUWA, H.: *Jour. Biochem.* **41**, 583 (1954)
- 5) 八木一文: *食品化学の基礎* p. 77 共立出版 (1963)
- 6) 宮崎芳光: *日農化西日本支部大会講演* (1967)
- 7) MATSUBARA, H. • IKENAKA, T. • AKABORI, S.: *Jour. Biochem.* **46**, 425 (1959)