

ケツルアズキ種子の炭水化物に関する研究

I. 子葉部の遊離糖および多糖類について

楠 瀬 博 三・沢 村 正 義

(農学部農産製造学研究室)

Studies on the Carbohydrates in the Seed Cotyledon of Black Matpe

I. Free sugars and polysaccharides in the Seed Cotyledon

Hirozo KUSUNOSE and Masayoshi SAWAMURA

Laboratory of Chemical Technology of Agricultural Products, Faculty of Agriculture

Abstract: The components of free sugars in the seed cotyledon of black matpe were D-glucose, D-galactose, D-xylose and L-arabinose. The hot water-soluble polysaccharide from the defatted cotyledon consisted of D-galactose and L-arabinose in the molar ratio of 1.0 : 2.5. The homogeneity of the polysaccharide was ascertained by sedimentation analysis, DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Sephadex G-75. The molecular weight of the polysaccharide was estimated to be 23500 by the gel filtration, and the specific rotation was -46.3° in the aqueous solution. In the IR spectrum of the polysaccharide the characteristic absorption band was observed at ca. 850 cm^{-1} , which suggests that the glycoside bond of the polysaccharide assumes the α -configuration. Partial hydrolysis of the polysaccharide gave rise to three oligosaccharides: di- and pentasaccharides which were composed of D-galactose only. The amount of the periodate consumption for the polysaccharide was 0.72 mole per anhydrogalactose. The components of the 1%, 4% and 17% sodium hydroxide soluble polysaccharides were as follows, respectively: D-glucose, D-fructose, D-xylose and D-galacturonic acid; D-glucose, L-arabinose, D-galactose, D-fructose, L-rhamnose and D-galacturonic acid; D-glucose, D-xylose, D-galactose and D-galacturonic acid. On the other hand, the components of the cold 72% sulphuric acid-soluble polysaccharide were D-glucose, D-galactose and D-galacturonic acid.

緒 言

豆科植物に属するケツルアズキはタイ、ビルマなどに自生し、あるいは栽培されていて、現地では種子を砕き食料として利用されている。わが国では、それが安価なことから緑豆にとって代りモヤシの原料豆として多量に輸入され吾々の食生活に大きく貢献している。筆者らは先にモヤシ胚軸部の炭水化物組成について報告¹⁾したが本報ではモヤシ原料としてのケツルアズキ種子の子葉部炭水化物について若干の知見を得たので報告する。

実験方法および結果と考察

1) 炭水化物抽出用試料の調製

ビルマ産のケツルアズキ種子 (600 g) を95%アルコール (1000ml) と共に 沸騰下に 3 時間処理

して酵素作用を停止させた後水中に24時間浸漬して種皮を軟化させ剥皮して白色の子葉部を得た。この子葉部は再び95%アルコールと共に2時間煮沸する操作を2回繰り返して脱水し、最後に得られた風乾物を80メッシュ以下の粉末となし、エチルエーテルで脱脂して抽出用試料(70g)とした。

2) 抽出用試料の化学組成

i 一般分析²⁾

常法にしたがって分析した結果は Table 1 の通りである。Table 1 から明らかなようにケツルアズキ種子の子葉部(95%アルコール処理物)は約51%の可溶性炭水化物と約31%の粗蛋白質を含み、この2成分で全子葉部の約82%を占める点、原地で主食の代用として利用されている事が十分

Table 1. Chemical composition of the seed cotyledon of *Phaseolus radiatus* Linn. (Black matpe)

	c)
Moisture	12.9
Ash	2.97
Crude fat ^{a)}	0.70
Crude protein ^{b)}	31.2
Crude fiber	1.50
N-free extract	50.9

a) Ethyl ether extract by Soxhlet apparatus for 16 hours.

b) (Total nitrogen by Kjeldahl method) $\times 6.25$.

c) % for drying material.

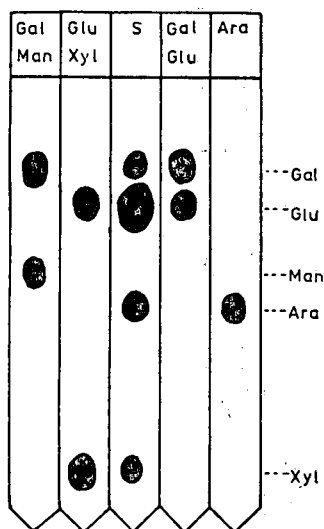


Fig. 1. Paper chromatograms of reducing sugars produced by hydrolysis with 1N-H₂SO₄ at boiling state for 5 hours.

Developing solvent : Ethyl acetate 40 V/V
Pyridine 10
water 5

Descending method at room temperature for 24 hours.
Spraying reagent : Aniline hydrogen phthalate.

価値あるものと考察される。つぎに子葉部の構成糖の種類と相対量を知るために、粉末子葉(1g)を1N硫酸(30ml)と共に沸騰下に5時間加水分解を行ない、炭酸バリウムで中和、濾過後、得られた淡褐色の透明液をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H^+) および Amberlite IR-45 (OH^-) で脱塩し、40°C で減圧下に濃縮してシロップとなし、酢酸エチル：ピリジン：水(40：10：5 v/v)を展開剤とするペーパークロマトグラフィー(PC法)を実施した。その結果は Fig. 1 に示したようにD-ガラクトース、D-グルコース、D-キシロースおよびL-アラビノースの4成分と原点附近にわずかに呈色する部分が認められた。これらの4成分はスポットの大きさと呈色濃度からD-グルコースが多量を占めることが明らかである。しかし、子葉部の1N硫酸による加水分解では未分解残渣として試料の約43%が残り、これが炭水化物か蛋白質あるいはその他の成分かは判別しえなかった。つぎに粉末子葉1gに冷72%硫酸5mlを加え均一に膨潤させてカユ状とした後、冷所(5°C)で120時間放置した。これを冷水で希釈して4%硫酸となし沸騰下に5時間の加水分解を行ない、殆んど残渣を認めない分解液を得た。この分解液は炭酸バリウムで中和後、濾液をイオン交換樹脂で脱塩し、その一定量を日立液体クロマトグラフによって分析した。子葉部の加水分解生成物の約96%がD-グルコースであり、その他にL-アラビノース、D-ガラクトース、D-キシロースおよび少量のL-ラムノースが検出された。その結果は Fig. 2 に示す通りでありD-グルコースは主にデンプンおよびセルロースに由来するものと推測されるが、比較的多量に存在するL-アラビノースとD-ガラクトースは子葉部に含まれる遊離糖の検索の結果からこの両成分よりなる多糖類の加水分解物と推測される。

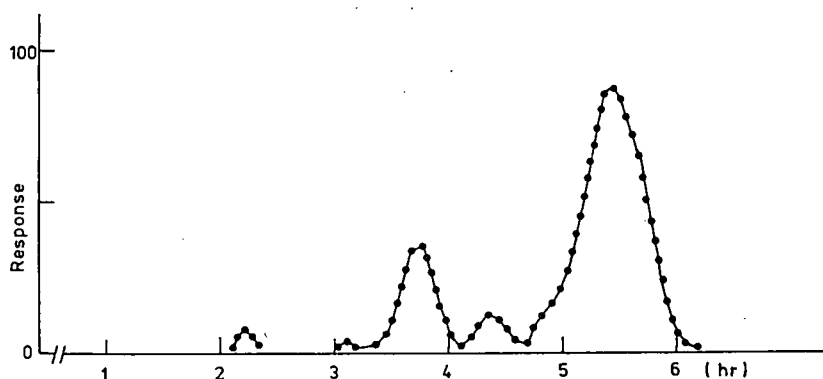


Fig. 2. Elution pattern of reducing sugars produced by hydrolysis of black matpe seed cotyledon with 72% H_2SO_4 .

Column : HITACHI ionexchange no. 2630

Elute : sodium borate solution

Elution volume : 30ml/hour

Color producing reagent : orcin H_2SO_4

ii アミノ酸組成

粉末子葉部(1.4g)を6N塩酸(100ml)と共に沸騰下に16時間加水分解を行なった。分解液を遠心分離(10,000rpm, 20min)して沈殿物を除去し、得られた澄明液を減圧下に濃縮、希釈を反復して最後に少量の濃縮液とした。この濃縮液を緩衝液で希釈して柳本製アミノ酸分析計で分析し、Table 2 に示したように15種類のアミノ酸が検出された。Table 2 から明らかなようにケツルアズキ種子の子葉部に含まれる蛋白質に由来すると推測されるアミノ酸はアスパラギン、グルタミンおよびグリシンが比較的多量に含有されるがメチオニン、シスチンおよびトリプトファンの存在は確認できなかった。

Table 2. *Amino acid components^{a)} of the Black matpe seed cotyledon, polished rice and soy bean*

	Black matpe	Polished rice ^{b)}	Soy bean ^{c)}
Isoleucine	3.2	0.7	1.3
Leucine	1.5	1.4	2.0
Lysine	6.9	0.6	1.9
Methionine	—	0.4	0.3
Cystine	—	0.3	0.4
Phenylalanine	3.6	0.8	1.4
Tyrosine	1.0	1.0	1.0
Threonine	2.3	0.6	1.2
Tryptophan	—	0.2	0.4
Valine	4.9	1.0	1.4
Arginine	3.2	0.9	1.9
Histidine	1.9	0.4	0.7
Alanine	4.5	1.0	1.1
Asparagine	11.7	1.8	2.9
Glutamine	12.3	0.3	0.5
Glycine	13.7	0.7	1.1
Proline	4.1	0.8	1.8
Serine	1.7	0.6	1.4

a) Relative molar ratio.

b), c) Comparative material.

iii 遊離糖の検索

脱脂粉末子葉部 (5 g) を 80 % アルコール (50ml) と共に沸騰下に 2 時間の抽出を 4 回反復した。各抽出液は合わせて自然濾過を行ない、濾液を 40° C で、減圧下に約 50ml に濃縮後、10% 酢酸鉛溶液を少量ずつ加え生成する沈殿物を除去した。濾液に硫化水素ガスを通じ溶解する鉛を沈殿除去し、さらにイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H⁺) および Amberlite IR-45 (OH⁻) で脱塩後、減圧下に濃縮してシロップ状の抽出物を得た。この抽出物を酢酸エチル：ピリジン：水 (10 : 4 : 3 v/v) を展開剤とする PC 法で検索し、Fig-3 のような結果を得た。すなわち、80% 熱アルコール可溶性遊離糖として D-グルコース、D-ガラクトース、D-キシロース および L-アラビノースの他に少量の L-ラムノース と スクロース が検出された。なお、PC 法に使用した残液は 10ml に定容し、その一定量についてフェノール硫酸法で遊離糖含量を D-グルコースとして求めた結果、その含有率は 0.36% であった。また、シロップの残液を 1 N 硫酸で沸騰下に 4 時間加水分解を行ない常法のように処理して PC 法で検した結果、主な糖成分には変化が見られなかったが、D-フルクトースがスクロースの加水分解物として検出された。なお、遊離糖類の相対量は Table 3 に示す通りである。つぎにスクロース以外のオリゴ糖の存在を検するため脱脂試料 (2 g) を 60 % アルコール (100ml) と共に沸騰下に 1 時間抽出し、抽出液を遊離糖の場合と同様に処理して PC 法で検したが鮮明なスポットは認めえなかった。

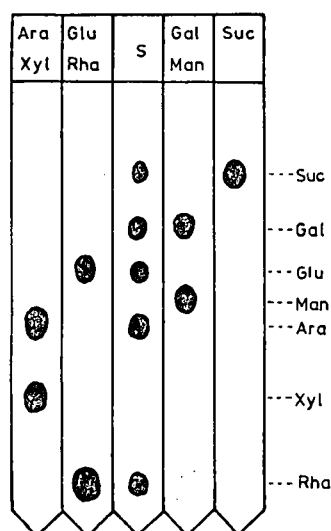


Fig. 3. Paper chromatograms of the free sugars in black matpe seed cotyledon.

Developing solvent : Ethyl acetate 10 V/V
Pyridine 4
Water 3

Descending method at room temperature for 24 hours.

Spraying reagent : aniline hydrogen phthalate.

Table 3. Relative molar ratio of the free sugar in Black matpe seedcotyledon

	80% EtOH extract ^{a)}	Hydrolysate ^{b)}
D-Glucose	5.01	8.28
D-Galactose	3.01	3.28
D-Xylose	0.87	0.49
L-Arabinose	1.08	1.32
L-Rhamnose	0.03	0.07
Sucrose	0.08	—
D-Fructose	—	0.31

a) Extraction with 80% ethanol at boiling state for 2 hours.

b) Hydrolysis products of the extract.

3) 熱水可溶性多糖類の調製

脱脂粉末子葉部 (5 g) を水 (1000ml) と共に沸騰下に 2 時間抽出し、抽出液は東洋濾紙 NO. 25 で予め濾過した後、濾液をさらに遠心分離 (10,000rpm, 15min) して透明な抽出液 (約 900ml) を得た。この溶液はヨウ素デンプン反応が極めて陽性なため、市販の α -アミラーゼ (100mg) と共に 30°C で約 20 時間振盪してデンプンを分解した。分解液は沸騰下に 2 時間加熱して酵素を失活させた後、遠心分離して沈殿物を除去し、ヨウ素反応陰性の透明な溶液を得た。この溶液をセルロース膜で流水中 2 日間の透析を行ない、内液を 40°C 以下で濃縮して約 1/4 容となし、3 倍容のア

セトンによって多糖類の白色沈殿 (1.3 g) を得た。本物質を熱水 (50ml) に溶解させた後、アセトン添加による再沈殿法で3回精製を繰り返し非デンプン質熱水可溶性多糖類 (1.03 g) 試料とした。

4) 非デンプン質熱水可溶性多糖類の理化学的性質

前項のようにして調製し、精製した多糖類は PC 法による予備実験の結果、L-アラビノースと D-ガラクトースのみより構成されていることを知ったので、この多糖類の均一性を検するために超遠心分析および DEAE-セルロースによる分別溶出を実施した。

i DEAE-セルロースによる分別³⁾

DEAE-セルロース (20 g) に蒸留水を加え、十分膨潤させた後、一定量の蒸留水と共に攪拌して、15分間静置し混濁せる上澄液を傾斜法によって除く操作を上澄液が透明になるまで繰り返した。ついで 0.5N 水酸化ナトリウム溶液に浸漬し同様の操作を3回反復した。このような前処理を完了した DEAE-セルロースはガラスフィルター (NO. 2) 上で自然濾過を行ない、洗液が中性となるまで水洗し、さらに 0.2M 四ホウ酸ナトリウム溶液を加え一夜放置して、ガラス管 (2.8×35 cm) に流し込みカラムを調製した。熱水可溶性多糖類 (0.04 g) を 0.1M 四ホウ酸溶液 (10ml) に溶解し、その 2 ml をカラムに注加し、Fig. 4 に示したような溶出液で順次溶出を行ない 4 ml 宛を分取した。各分取液から 1 ml を採取しフェノール硫酸法⁴⁾で発色させ Fig. 4 に示した溶出図形を得た。Fig. 4 から明らかなように1個の大きなピークが認められ、ほぼ1種類の多糖類と推察される。また、試験管番号70~75, 76~80, 81~90, 91~95, 96~100, 101~105および106~110についてそれぞれをセルロース透析膜で流水中3日間、蒸留水中一昼夜の透析を行ない透析内液

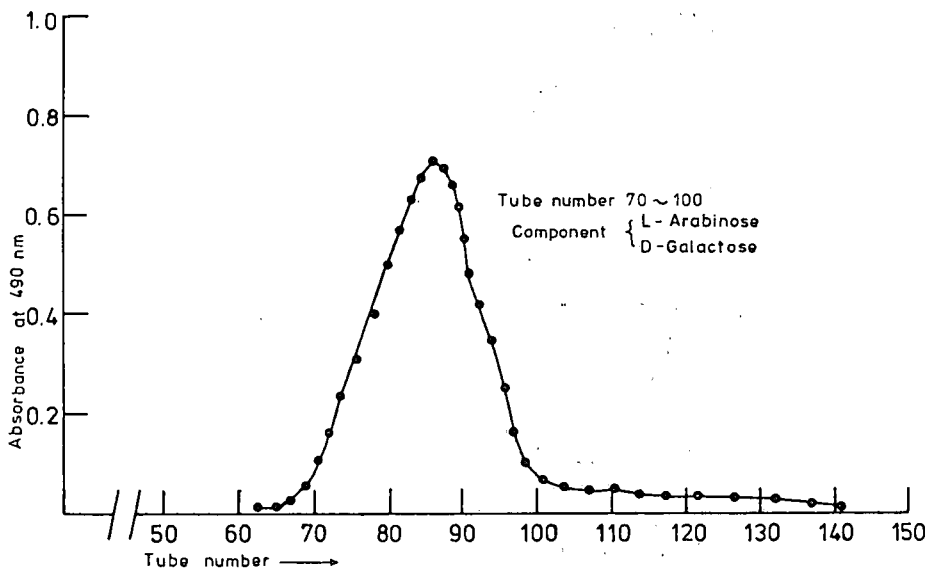


Fig. 4. Elution pattern on DEAE-cellulose column of the arabinogalactan. 0.4% sample solution (5ml) of the arabinogalactan was applied to a column (2.8×35cm) of DEAE-cellulose.

The column was eluted with following solvent at flow rate of 60ml per hour. The elute was collected 4 ml in each tube.

Eluent : water, 0.01M- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.05M- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.1M- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ each 100ml.

に 6 N 硫酸を加えて 1 N 硫酸溶液となし沸騰下に 5 時間加水分解を行ない、常法のように中和、脱色、濾過および減圧濃縮して PC 法の試料とした。その結果、いずれの区分も L-アラビノースと D-ガラクトースのみより構成され、その相対モル比は、ほぼ 2.5 : 1.0 であることを知った。

ii 超遠心分析

熱水可溶性多糖類 (0.033 g) を 0.1M 塩化カリウム溶液 (3 ml) に溶解し、セルロース透析膜で同濃度の塩化カリウム溶液中で一昼夜透析を行ない超遠心分析を実施した。その結果、Fig. 5 に示したような 1 個の鮮明なピークが認められ、沈降係数 $S^{27}=3.42$ と計算された。

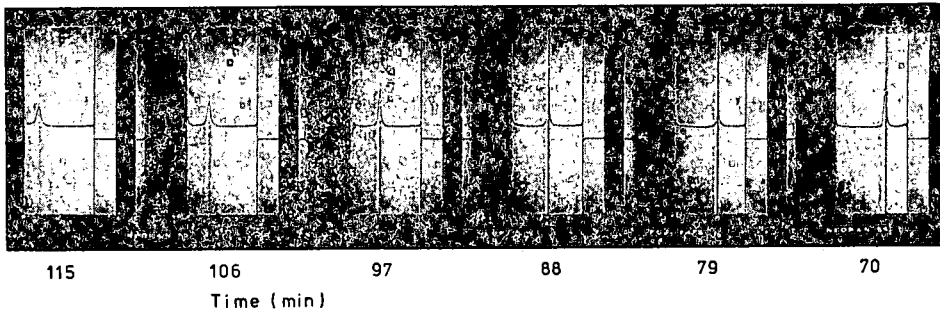


Fig. 5. Sedimentation pattern of the arabinogalactan of Black matpe seed cotyledon.

Sedimentation proceeds from right to left.

The photograph were taken at regular intervals after reaching full speed at 60000 rpm.

Exposure: 12 sec. Concentration: 1% in 0.1M KCl.

iii 重合度の測定⁵⁾

一定量の試料を水 (20ml) に溶解し、0.02N ヨウ素溶液 (20ml) を静かに加え、ウィルステッターシュウデル法にしたがって処理し、試料によつて消費されたヨウ素量より重合度を求めた。その結果は Table 4 の通りであり平均重合度は約 30.2 であった。

Table 4. Degree of polymerization of the arabinogalactan by Willstätter-Schudel method

Sample (mg)	Iodine (mg)	Aldehyde group (mg)	D. P*
52.1	3.30	0.38	30.12
29.6	1.93	0.22	29.81
32.5	2.01	0.23	30.57

* Degree of polymerization.

iv ゲル濾過法

還元性末端基定量法および超遠心分析法による分子量の推定の結果、それぞれの推定値に大きな差異がみられたので、さらに分子量に関する知見を得るためセファデックス G-75 による分子ふるい法を実施した。ゲルは常法のように水で十分膨潤させた後、傾斜法によって微細粒子を除きガラス管に流し込みカラム (1.8×150cm) を作製した。試料 (0.0375g) を 10ml の水に溶解し、その 5 ml を実験に供した。溶出液は 2 ml 宛を分取し、予じめ分子量既知のデキストランにより作成し

た標準曲線から分子量の推定を行なった⁶⁾。その結果は Fig. 6 に示す通りであり、試料は試験管番号 NO. 43~70 の範囲に溶出し、最高ピークの位置は59本目で、分子量は約23500と推定される。

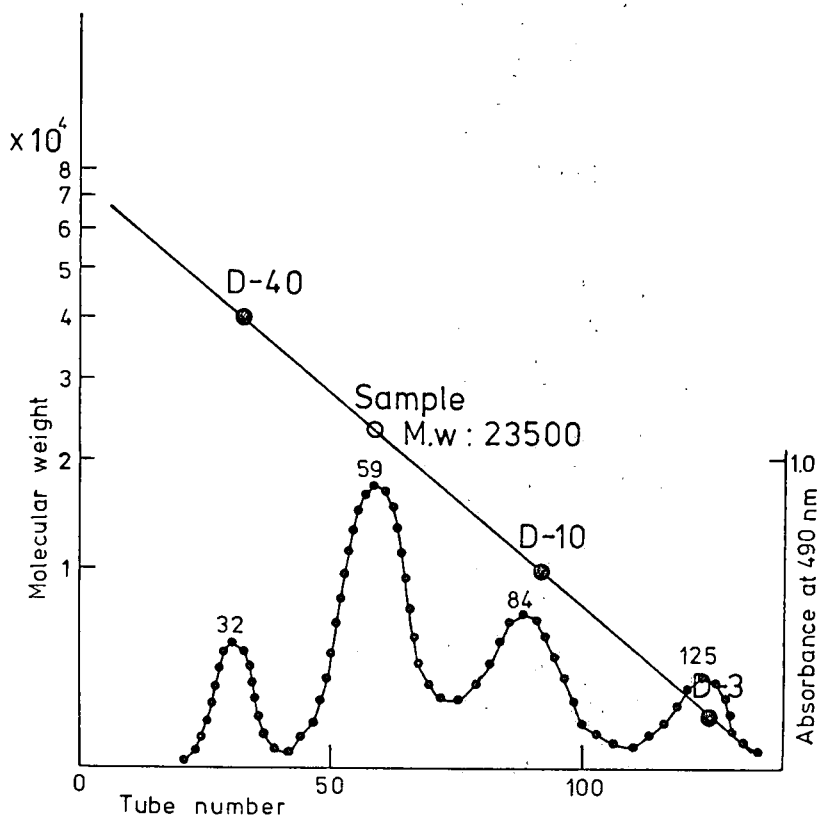


Fig. 6. Determination of the molecular weight by gel filtration on Sephadex G-75 of the arabinogalactan of Black matpe seed cotyledon. The column was 1.8×150 cm ; Flow rate of water was 8ml/hour and 2ml fraction was collected.

Ⅴ 旋光度の測定

試料 (0.2085 g) を水 (20ml) に溶解し、遠心分離 (10,000rpm) により不溶性物質を除去した後旋光度の測定を実施した。なお、糖濃度は100倍に希釈後、その 0.5ml についてフェノール硫酸法で決定し、比旋光度 $[\alpha]_D^{17} - 46.3^\circ$ を得た。

Ⅵ 赤外吸収スペクトルの測定⁷⁾

多糖類は多数の官能基を有するため、その赤外吸収スペクトルは特徴ある吸収スペクトルを示さない。しかし、グリコシド結合が α -型か β -型の区別は可能であり、 α -結合よりなる多糖類では 850cm^{-1} に特徴ある吸収を示すのに対し、 β -結合では 884cm^{-1} に特有のピークを示すことが知られている。このような観点から本アラビノガラクトランの赤外吸収スペクトルをアミロースおよびラミナリンを対照物質として比較測定し、Fig. 7 に示したように本アラビノガラクトランはアミロースに類似の吸収スペクトルを示し、 β -結合よりなるラミナリンとは異なるスペクトルが認められたことから α -結合が多数を占めるものと推測される。

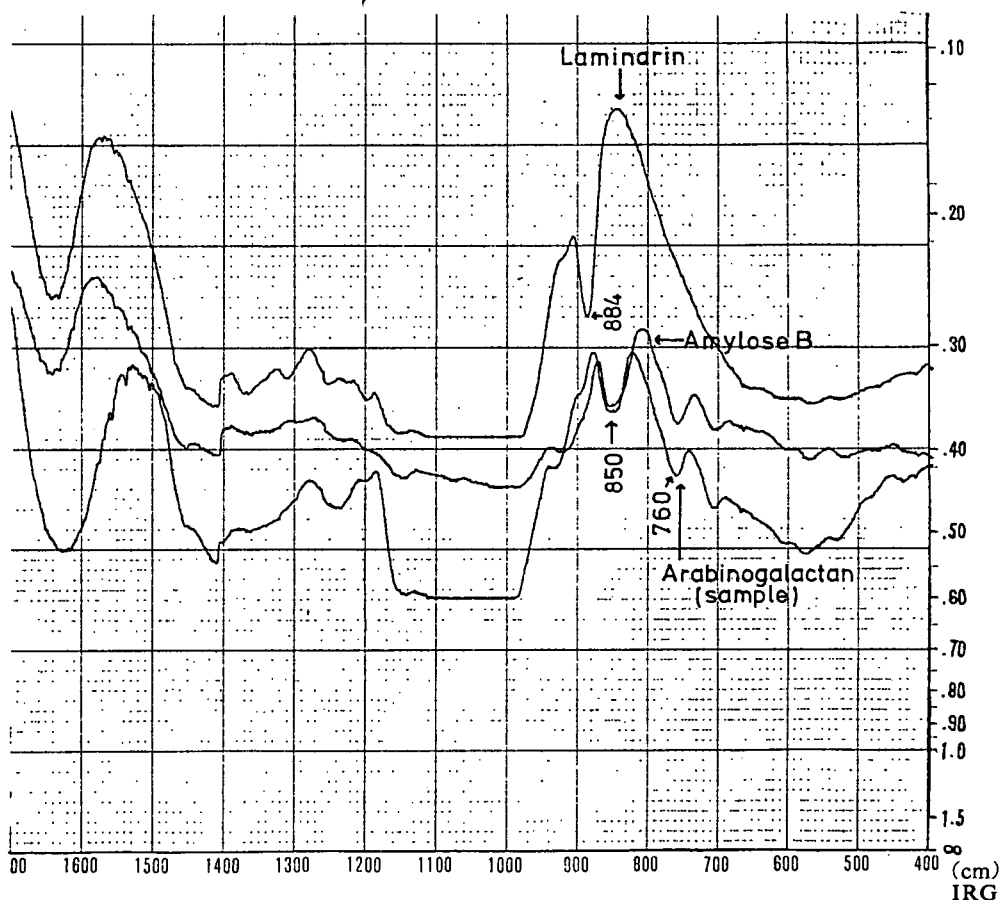


Fig. 7. Comparison of the infrared spectrum of Black matpe seed-arabinogalactan with infrared spectra of amylose B and laminarin.

5) 加水分解度の測定および構成糖組成

ケツルアズキ種子子葉部の熱水可溶性非デンプン質多糖類は超遠心分析法、ゲル濾過法およびDEAE-セルロースによるカラムクロマト法などにより、ほぼ均一と認められたので本多糖類の化学構造推定のため加水分解度の測定を行なった。Table 5に示したように一定量の試料を1 N硫酸(10ml)と共に封管中、105°Cで2、5、8および14時間の加水分解を行ない、中和せずに50ml

Table 5. Hydrolysis ratio of the arabinogalactan of Black matpe seed cotyledon with acid

Time(h)	Sample (mg)	Arabinose (mg)	Ratio (%)	Relative molar ratio	
				Arabinose	Galactose
2	21.2	15.5	73.1	4.3	1
5	16.8	17.2	102.4	2.5	1
8	14.2	12.9	90.7	2.4	1
14	15.9	9.9	62.3	1.6	1

Hydrolysis was carried out with 1N-H₂SO₄ at 105°C in a sealed tube.

に定容し、その 1 ml について重炭酸ナトリウムで中和後、再び 10 ml に定容してソモギー・ネルソン法で還元糖を比色定量した。加水分解度測定に残液は炭酸バリウムで中和後、濾液をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H^+) と Amberlite IR-45 (OH^-) で脱塩した後、 $40^\circ C$ 以下で減圧下に濃縮し PC 法を併用したフェノール硫酸法で構成糖類の相対量を求めた。Table 5 から明らかなように本多糖類は封管中 $105^\circ C$ 、5 時間の加水分解で最高 102.4% の加水分解度を示し、構成糖の相対モル比は L-アラビノース : D-ガラクトース (2.5 : 1.0) であった。分解の初期に L-アラビノースが急速に遊離することが認められ、L-アラビノースの結合が比較的弱いことが示された。なお、液体クロマトグラフィーで少量の存在が認められた L-ラムノースは PC 法では痕跡程度であった。また、さらに長時間、沸騰下に加水分解を継続すると分解液は順次着色度を増し、L-アラビノースの相対量の低い多糖類が残った。

6) 部分加水分解

多糖類が弱い条件下で加水分解を受けると結合の弱い部分が最初に切断されるので、その分解生成物および未分解部分の組成を検することによって元の多糖類の化学構造に関する有力な知見が得られるとの観点から本実験を行なった。Table 6 に示したような各種条件のもとで加水分解を行ない、その分解生成物と一部分のみが分解されて残った多糖類の化学組成とをそれぞれ検索した。各

Table 6. Diluted acid hydrolysis products of the arabinogalactan

Acid concn.	Time(h)	Temp($^\circ C$)	Products (relative molar ratio)	
0.1N H_2SO_4	3	100	Ara (2.9)	Gal (1)
0.5N H_2SO_4	1	100	Ara (3.1)	Gal (1)
1N CF_3COOH	2	90	Ara (1.6)	Gal (1)
0.1N "	4	90	Ara (2.6)	Gal (1)
0.05N "	4	90	Ara (3.5)	Gal (1)
0.02N "	4	90	Ara (7.0)	Gal (1)
0.1N "	2	90	Ara	Gal trace
0.05N "	2	90	Ara	Gal trace
0.02N "	2	90	Ara	—
0.1N "	1	90	Ara	Gal
0.05N "	1	90	Ara	—
0.02N "	1	90	Ara	—

concn : concentration.

Ara : arabinose.

Gal : galactose.

分解液に 4 倍量の無水アルコールを加え、生成する沈殿を分別し、硫酸による加水分解液は中和後、三弗化酢酸による加水分解液は中和せずに、それぞれを $40^\circ C$ 以下で減圧濃縮して少量となし PC 法で糖組成を検索した。その結果は Table 6 に示した通りであり括弧内の数字はフェノール硫酸法で測定した相対モル比である。Table 6 から明らかなように L-アラビノースは元の多糖類を 0.01N および 0.05N 濃度のような穏和な条件で処理しても容易に遊離することが認められた。特

に 0.02N および 0.05N の三弗化酢酸による 1 時間の加熱処理では L-アラビノースのみが遊離し D-ガラクトースは認められなかった。これらの事実から L-アラビノースは比較的弱い結合状態で存在するものと推測され、フラノース型と推察した。しかし、0.02N 三弗化酢酸で 90°C に 24 時間処理しても L-アラビノースを含まない D-ガラクトースよりなる多糖類を得ることは不可能であった。次にアルコール添加によって沈殿した部分加水分解多糖類は乾燥させた後、1N 三弗化酢酸と共に封管し、105°C で 5 時間の加水分解を行なった。分解液を減圧下で、濃縮、希釈を反復し、可及的に酸を除去し、最後に得られたシロップについて糖組成を PC 法で検索した。その結果、Table 7 に示すように、穏和な条件では分解されない多糖類は、いずれも L-アラビノースおよび D-ガラクトースを含み、それらの相対モル比は酸処理条件の相異によって一定しないが、いずれの未分解多糖類も元の多糖類組成よりも D-ガラクトースが多く含まれることが示された。なお、Table 6 および Table 7 からはオリゴ糖の生成については明らかでないが、PC 法の結果から 0.1N 濃度による分解産物にオリゴ糖の存在が認められた。

Table 7. *Hydrolysis products of the degraded arabinogalactan*^{a)}

Acid concn	Time (h)	Residue (mg)	Relative molar ratio ^{b)}	
			Ara	Gal
0.1N H ₂ SO ₄	3	23.5	2.1	2.3
0.5N H ₂ SO ₄	1	3.3	1.8	4.3
1N CF ₃ COOH	2	82.1	19	33
0.1N "	4	45.3	21	52
0.05N "	4	62.9	8	30
0.02N "	4	51.4	16	50
0.1N "	2	48.2	12	31
0.05N "	2	32.9	23	80
0.2N "	2	43.7	8	25
0.1N "	1	52.1	10	43
0.05N "	1	33.8	38	52
0.02N "	1	41.5	14	21

a) The non-hydrolysed residue of the arabinogalactan by heating with diluted acids.

b) Hydrolysis products with 1NCF₃COOH at 105°C for 5 hours.

Ara : arabinose.

Gal : galactose.

Concn : concentration.

7) オリゴ糖の性質

0.1N および 0.05N 三弗化酢酸および硫酸による加水分解生成物は PC 法によりオリゴ糖の存在が認められたので、それらの分取を行なった。試料 (0.5 g) を 50ml の 0.1N 三弗化酢酸と共に沸騰下、2 時間の加水分解を行ない、分解液を減圧下に 40°C 以下で濃縮、希釈を反復し、最後にやや酸性を示すシロップを得た。このシロップから PC 法で L-アラビノースおよび D-ガラクトースの他に少量のオリゴ糖と推測される 3 種類のスポットが検出され、各オリゴ糖の R_{arabinose} 値は

0.45, 0.31および0.18であった。なお、原点附近にアニリン試薬で呈色する物質の存在が認められたが少量のため分析しえなかった。次に各オリゴ糖の化学的性質を明らかにするために活性炭による吸着クロマトグラフィーを実施した。活性炭は水に浸漬して一夜放置後、水と共に攪拌して一定時間静置し傾斜法で懸濁する微粒子を除去した。活性炭を濾別し、エタノールによつて脱水、乾燥後、セライト535と重量比1:1で均質に混合してカラム(3.0×50cm)を作製した。部分加水分解液のシロップを少量の水で希釈してカラムに吸着させた後、蒸留水、5%エタノール、15%エタノール、25%エタノールおよび35%エタノールで順次溶出し、10ml宛を分取してフェノール硫酸法で糖の溶出位置を追跡した。その結果はFig. 8に示すように4個のピークF-1, F-2, F-3およびF-4が得られた。各ピークから斜線部分を採取(約50ml)し減圧下に40°C以下で濃縮してシロップとなしPC法で糖組成を検索した。F-1はL-アラビノースとD-ガラクトースの混合物、F-2, F-3およびF-4は前記 Rarabinose 値を有する単一のスポットでありオリゴ糖と推測した。各フラクションは濃縮して少量となし、それぞれを50mlに定容し各フラクションから一定量(1~0.05ml)を採取してフェノール硫酸法で糖含量を求め、その相対量をFig. 8の各ピークの上部に数字で示した。オリゴ糖と推測されるフラクションF-2, F-3およびF-4はそれぞれ濃縮後1N三弗化酢酸に溶解し、前記と同様に加水分解を行なった結果、いずれのフラクションもD-ガラクトースのみより構成されることを知った。

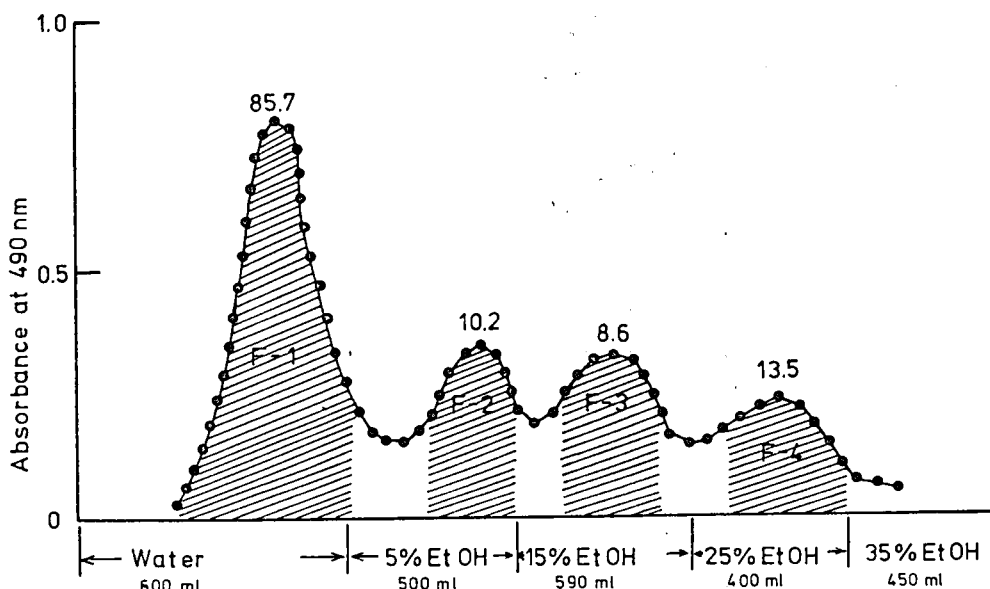


Fig. 8. Fractionation of the mild acid hydrolysates of the arabinogalactan on a column (3×50 cm) of charcoal-Celite (1:1).

Eluting solvents : water and aqueous alcohol

Flow rate : 100ml/hour

Fraction : 10ml

Detection of sugars : phenol-sulphuric acid method

8) 過ヨウ素酸酸化⁹⁾

ケツルアズキ種子子葉部の非デンプン質熱水可溶性多糖類はL-アラビノース含量が比較的多い珍しいアラビノガラクトンである。このアラビノガラクトンのより詳細な化学構造に関する知見は次報に述べるが、先ず過ヨウ素酸消費量を測定した。試料(0.3017g)を25ml以下の蒸留水に溶

解し、これに0.037モル過ヨウ素酸ナトリウム溶液50mlから正確に25mlを採取して加え、それを50 ml に定容して反応溶液とし、一方残りの過ヨウ素酸溶液 (25ml) は水で50ml に定容しブランク溶液とした。この両液から一定時間おきに1 ml を採取し常法のように処理して過ヨウ素酸消費量を求めた。その結果は Fig. 9 に示す通りであり、本アラビノガラクトタンは酸化開始後約23時間でほぼ一定の消費量に達し、ヘキソース残基 (162g) 当り0.72モルの過ヨウ素酸を消費した。この事実から、このアラビノガラクトタンは過ヨウ素酸酸化に抵抗性を有する糖残基を含むことが推測される。

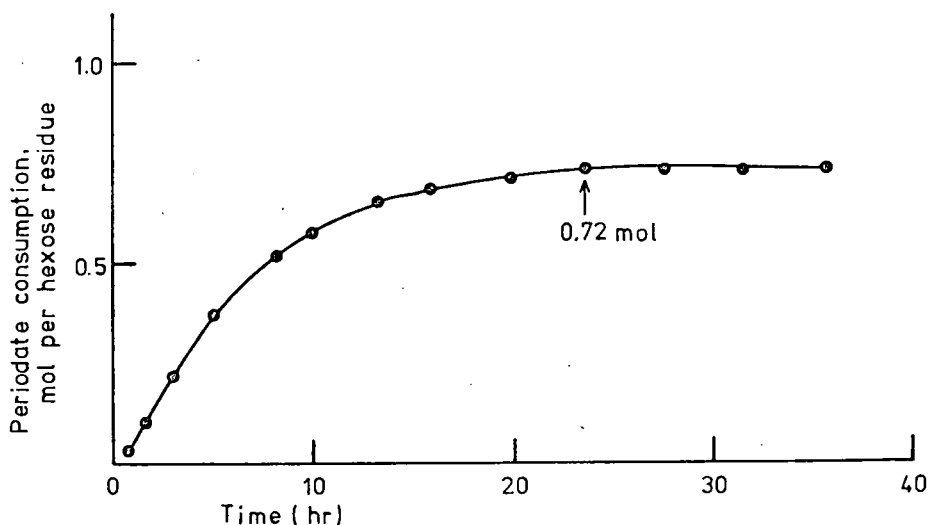


Fig. 9. Periodate oxidation of the arabinogalactan.

The arabinogalactan (0.3017g) was dissolved in water (25 ml) and oxidized by 0.037 M sodium metaperiodate (25 ml) in the dark at 5°C. Appropriate blank was prepared under the same condition.

9) 1%水酸化ナトリウム可溶性多糖類

熱水可溶性多糖類として多量のデンプン質の他に、一種のアラビノガラクトタンが得られたが、抽出を繰り返してもデンプン質を完全に抽出することは不可能と考えられたので、3回の抽出を行った後、不溶性部分を遠心分離 (10,000rpm) で分別した。この不溶性部分を乾燥させることなく1%水酸化ナトリウムと共に室温で2時間振盪抽出する操作を3回繰り返す、それぞれの抽出液は遠心分離して透明な上澄液を得た。各上澄液は合わせて酢酸で中和後、メタノール添加によって多糖類の沈殿を得た。この沈殿を水洗して無機物を除去した後、1N硫酸と共に沸騰下に4時間の加水分解を行ない、分解液を常法のように処理してシロップ状となし、酢酸エチル：ピリジン：水 (40:10:5 v/v) を展開剤とするPC法で検索し、D-グルコース、D-フルクトース、D-キシロースおよびD-ガラクトロン酸のスポットが検出された。

10) 4%水酸化ナトリウム可溶性多糖類

1%水酸化ナトリウムによる抽出残渣を4%水酸化ナトリウムと共にN₂ガス充填下に室温で時々振盪しつつ24時間の抽出を行なった。抽出液は遠心分離により澄明液となし、1%水酸化ナトリウムの場合と同様に処理して多糖類を調製した。この多糖類は1N硫酸による加水分解でD-グルコース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、L-ラムノースおよびD-ガラク

ツロン酸を生成した。

11) 17%水酸化ナトリウム可溶性多糖類

4%水酸化ナトリウムによる抽出残渣を N_2 ガス充填下に17%水酸化ナトリウム溶液と共に時々振盪しつつ24時間の抽出を行なった。抽出液は前記と同様に処理して多糖類を調製し、4%硫酸による加水分解を行なった。加水分解生成物を酢酸エチル：ピリジン：水 (40:10:5 V/V) を展開剤とする PC 法によって検索し、D-グルコース、D-キシロース、D-ガラクトツロン酸およびD-ガラクトースのスポットを認めた。

12) 72%硫酸処理物質の検索

17%水酸化ナトリウムによる抽出残渣は中性になるまで水洗後、十分乾燥した。これに 5°C に冷却した72%硫酸を加えて冷所に7日間静置した。ついで水を加えて4%硫酸となし、沸騰下に5時間の加水分解を行なった。分解液は常法のように中和、濾過、濃縮を行ないシロップ状とし、PC 法で検した結果D-グルコース、D-ガラクトースおよびD-ガラクトツロン酸が検出された。

要 約

ケツルアズキ 種子の子葉部は一般分析により主に可溶性無窒素物 (約51%) と粗蛋白質 (約31%) よりなることを知った。子葉部の 6 N 塩酸による加水分解で15種類のアミノ酸が検出され、それらの中でアスパラギン酸、グルタミン酸およびグリシンが比較的多量に存在し、メチオニン、シスチンおよびトリプトファンは検出されなかった。脱脂子葉部の80%アルコール抽出物には遊離糖としてD-グルコース、D-マンノース、D-キシロースおよびL-アラビノースが検出され、それらの合計含量は粉末子葉部に対し0.36%であった。熱水可溶性非デンプン質多糖類は L-アラビノース：D-ガラクトースが2.5:1.0のモル比で含有されるアラビノガラクトンである。この多糖類は超遠心分析法、DEAE-セルロースによるイオン交換法およびセフデックス G-75 によるゲル濾過法などにより、ほぼ均一と認められ、その分子量は超遠心分析法では約30000、ゲル濾過法では約23500、還元性末端基定量法では約4892と推定された。また、比旋光度は $[\alpha]_D^{17} -46.3^\circ$ を示し、赤外吸収スペクトル分析では α -結合よりなるアミロースの吸収スペクトルに類似し、 β -結合よりなるラミナリンとは異なることが認められた。1 N 硫酸と共に封管中105°C で5時間加水分解を行なうと最高102.4%の分解度を示し、分解生成物はL-アラビノースとD-ガラクトースのみであった。0.1 N 三弗化酢酸による部分加水分解で3種類のオリゴ糖が得られ、それらはすべてD-ガラクトースのみより構成されていた。さらに過ヨウ素酸酸化の結果、本多糖類はヘキソース残基当り0.72モルの過ヨウ素酸を消費し、ギ酸の生成は認めえなかった。1%水酸化ナトリウム可溶性多糖類は1 N 硫酸により加水分解を行なうとD-グルコース、D-フルクトース、D-キシロースおよびD-ガラクトツロン酸が PC 法で検出された。4%水酸化ナトリウム可溶性多糖類は1 N 硫酸による加水分解でD-グルコース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、L-ラムノースおよびD-ガラクトツロン酸が検出された。17%水酸化ナトリウム可溶性多糖類は4%硫酸による加水分解の結果、PC 法でD-グルコース、D-キシロース、D-ガラクトツロン酸およびD-ガラクトースが検出された。72%硫酸可溶性多糖類は4%硫酸に希釈して加水分解を行なうと多量のD-グルコースの他にD-ガラクトースおよびD-ガラクトツロン酸が検出された。

文 献

- 1) 楠瀬博三・林 隆久・佐藤敬子・鴛淵武雄, 市販モヤシの炭水化物に関する研究, 高大学術研, 27, 69~80 (1978).
- 2) 三井哲夫・満田久輝・秦 忠夫 (編), 農芸化学実験書 (第二巻), p. 514, 産業図書, 東京 (1957).
- 3) Neukom, H. Deuel, D. Heri, W. J. Kündig, W., Chromatographische Fraktionierung von Polysacchariden an Cellulose-Anionenaustauschern. *Helv. Chim. Acta*, 43, 64~71 (1960).
- 4) Whistler, Roy L. and Wolfrom, M. L. (ed.), "Method in Carbohydrate Chemistry", vol. I, p. 388, Academic Press • New York and London (1962).
- 5) 船久保英一, 有機化合物確認法中巻 (第1版) p. 295, 養賢堂, 東京 (1954).
- 6) Whitaker, J. R., Determination of Molecular Weight of Proteins by Gel Filtration on Sephadex, *Anal. Chem.*, 35, No. 12, 1950~1953 (1963).
- 7) Gliek, D. (ed.), "Methods of Biochemical Analysis" Vol. III, p. 213, Interscience publishers, Inc., New York • London • Sydney (1966).
- 8) Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L. (ed.), "Methods in Carbohydrate Chemistry", vol. I, p. 386, Academic Press • New York and London (1962).
- 9) Glick, D. (ed.), "Methods of Biochemical Analysis", vol. III, p. 190, Interscience publishers, Inc., New York • London • Sydney (1966).

(昭和54年6月1日受理)

(昭和54年12月21日発行)

