

レンゲ種子胚乳部の熱水可溶性多糖類に関する研究

I. 多糖類の種類と加水分解生成物

楠 瀬 博 三 · 鴛 渕 武 雄

(農学部 農産製造学研究室)

Structural Study of Water-soluble Polysaccharide from the Seeds of *Astragalus sinicus* L.

I. Preparation and hydrolysis products of the polysaccharide

Hirozo KUSUNOSE and Takeo OSHIBUCHI

Laboratory of the Chemical Technology of Agricultural Products,
Faculty of Agriculture

Abstract : A homogeneous galactomannan composed of D-mannose and D-galactose in a molar ratio of 2.14 : 1.00 was isolated in 12.5 % yield from the seeds of *Astragalus sinicus* L. (*Leguminosae*). The galactomannan had $[\alpha]_D^{25}$, +61.5 (c. 0.26 in H₂O); sedimentation coefficient, $S_{20,w}$, 1.45; and the degree of polymerization, 162.7. Two disaccharides, mannobiose and mannotetraose, were detected in the partial acid hydrolysate and acetolysis products of the galactomannan. All of the galactose residues were oxidized by the periodate oxidation, since the hydrolysis of the periodate-oxidized polysaccharide gave only D-mannose. Periodate consumption was 1.20 moles per anhydrohexose unit, and 0.35 mole of formic acid was produced.

From these results, it is suggested that the galactomannan possessed a structure as galactose molecules are linked to the mannose residue of the backbone chain.

緒 論

れんげそう(げんげ) *Astragalus sinicus*, L. は一年生のマメ科植物に属し、本邦各地において飼料ならびに緑肥用として広く栽培されており、また、その種子は“げんげたね”として播種用に供されている。一般に植物種子には貯蔵性炭水化物が含まれ、発芽に際して幼芽の栄養源として利用されている。この貯蔵性炭水化物は、澱粉質である場合が多いが、種類によっては、他の多糖類を含んでいることも、しばしばある。なお、種子以外の部位への貯蔵物質としては、澱粉以外のものとして、グルコマンナンやイヌリン等が一般的によく知られている。

Anderson¹⁾ は、マメ科植物種子の胚乳部には、貯蔵性炭水化物として、粘質物あるいはガム質が含まれていることが多いことを指摘している。著者らは一連の植物性粘質物の化学構造研究の一部として、レンゲ種子胚乳部に含まれる熱水可溶性多糖類の種類と化学構造を明らかにする目的で本研究を実施した。

実 験 の 部

1 試料の調製と精製 市販のレンゲ種子(大晩生種) 2 kgを水洗して、あらかじめ、附着する不純物を除去したのち、丸底フラスコ(3 l容)を用いて、95%アルコールに浸漬し、沸騰下、3時間処理して酵素を不活性化すると共に、アルコール可溶性成分を抽出除去した。かくして清潔にした種子は、60°Cで乾燥したのち粉碎し、60メッシュの篩分によって、胚乳部と種皮とは選別し、胚乳部を多糖類調製の試料に供した。胚乳粉末は約2倍量の水に浸漬して、沸騰水中、2時

間加熱抽水し、東洋濾紙 No. 25 を用いる吸引濾過によって、完全に透明で少しく粘性を帯びた抽出粘液をえた。この抽出粘液は Table 1 に示すごとく澱粉質ならびに蛋白質を、ともに含まず、また有機溶媒の添加によって多糖類を析出し、さらにまたフェーリング溶液の添加によっても多糖類-銅複塩の沈澱物を生じる。なお、収率は風乾種子に対して、およそ12.5%であった。また本研究に使用する試料の調製は、多量の溶媒を必要とせず、比較的容易に多糖類が沈澱物としてえられるフェーリング溶液添加法を採用した。即ち透明な熱水抽出液 2 l に、フェーリング溶液 100 ml を攪拌しつつ添加することにより、粒状の多糖類-銅複塩の沈澱物をえた。沈澱物は水で十分に洗滌してアルカリ成分を除去したのち、70, 85, 95 および 99% の各エタノール液にて、一夜ずつ順次に浸漬した。最後の 99% エタノール浸漬“多糖類-銅複塩”は、濃塩酸を加えて処理し、銅を塩化銅として分離せしめて、多糖類を遊離させた。銅を完全に除去したのち、99% エタノール (2 回) およびエーテル (3 回) で順次洗滌処理し、デシケーター中で減圧下に乾燥して粗試料とした。つぎに粗多糖類は熱水に再度溶解し、東洋濾紙 No. 25 にて濾過したのち、濾液にアセトンを追加することによって沈澱物を 3 個のフラクション F-1, F-2 および F-3 に分画精製した。

2 均一性の検討

(1) 加水分解生成物組成による確認 各フラクション 0.1 g に 5% 硫酸 20 ml を加え、沸騰下に 6 時間加水分解し、常法の如く中和、脱色、濃縮後、少量となしペーパークロマトグラフ法 (PPC 法) によって、その組成を検した結果 Table 2 に示す如く、各フラクションとも、ガラクトースとマンノースの 2 成分のみより構成されることを知った。これら 3 つのフラクションのうち、比較的収量の多い F=2 を再沈澱法によって、さらに 2 回精製したのち、以後の実験試料とした。本物質の比旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} + 6.15$ (C, 0.26, 水) である。

Table 2. Components of each fractions

Fraction	Components*	Yield (g)
F-1	Galactose, Mannose	1.2
F-2	" "	6.5
F-3	" "	2.7

* Hydrolysis Products with 5% H₂SO₄ for 6hr at boiling state.

(2) DEAE-セルロースによる分画²⁾ 市販の DEAE-セルロース 20 g を蒸留水に浸漬し、攪拌後静置して微粒子を除く方法によって整粒した後、0.5 M-NaH₂PO₄ 溶液 (pH=8) にて、十分置換し、ガラス製カラム (20 m/m×400 m/m) に充填した。100 mg の試料を含む溶液 2 ml をカラムの上端部分に注加し、0.05 M 200 ml, 0.01 M 200 ml, 0.02 M-NaH₂PO₄ 100 ml で順次溶出し、溶出液について、フェノール硫酸法³⁾ によって、糖量を測定した結果 Fig. 1 に示すごとく、1 ケのピークのみを認めたことにより、本多糖類は均一なものであると推察される。

Table 1. Results of qualitative experiments of extracted viscous solution

Test reaction	Results
Millon	negative
Biuret	negative
Trichloro acetic acid	negative
Ninhydrin	negative
Iodine	negative
Addition of Fehling solution	Precipitation
Addition of ethanol	Precipitation
Addition of acetone	Precipitation
Addition of saturated cupric sulfate solution	Precipitation

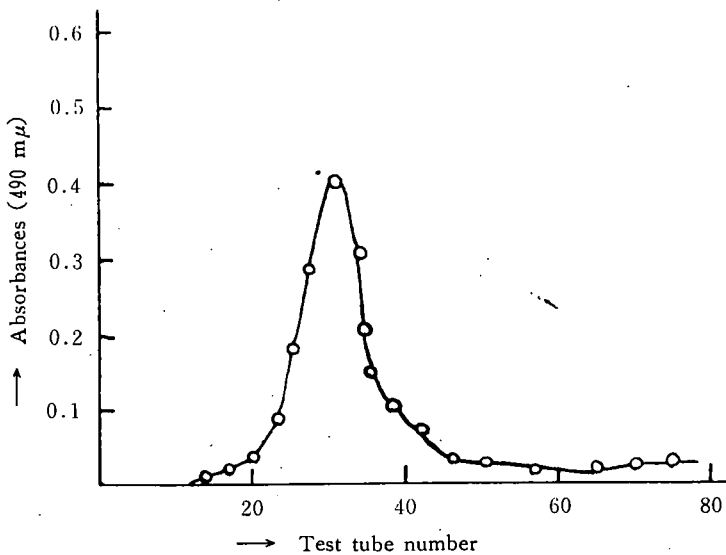


Fig. 1. Elution curve for galactomannan of *Astragalus sinicus* L. for a DEAE-Cellulose column (35 cm×2.0 cm).
Elution solution : 0.05M- NaH_2PO_4 200 ml, 0.01M- NaH_2PO_4 200 ml,
0.02 M- NaH_2PO_4 100 ml.

(3) 超遠心機による分析 試料を 0.15 M-KCl 溶液に、0.4%濃度で溶解後、同じ液で一晩透析を行なった後、日立製分析用超遠心機で、沈降図形および沈降速度を測定した結果 Fig. 2 に示す如く、シャープな1つのピークとして観測されたことにより、本多糖類は超遠心的にも均一であることが明らかであり、その沈降係数 $S_{20,20}$ は1.45である。以上3法のいずれによっても、本試料は均一な単一多糖類であると推察できる。

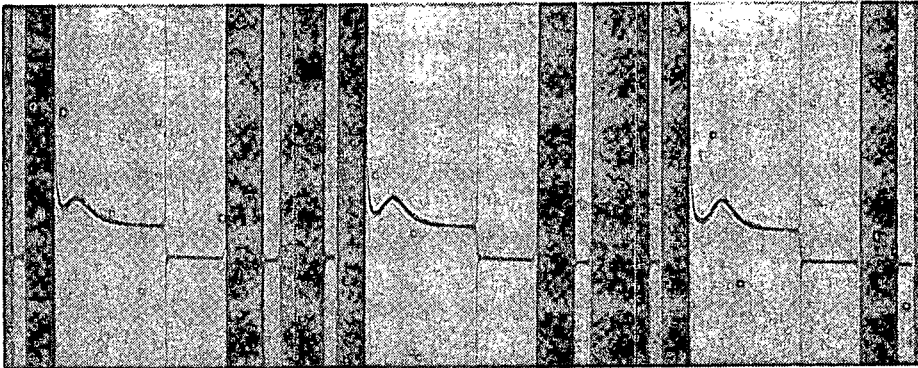


Fig. 2. Ultracentrifuge pattern of the galactomannan from left to right ; 60,000 r. p. m. for 75 min. Sample concentration ; Ca., 0.4%; Solvent 0.15 M KCl.

3 多糖類の重合測定⁴⁾ 超遠心的に均一な試料 0.0523 g を水 20 ml に溶解し、0.02 N ヨウ素液 20 ml を注意深く加え、ついで 0.1 N 水酸化ナトリウム液 10 ml にてアルカリ性とした。約 5 分間振盪後、室温に 1 時間静置して酸化せしめた。つぎに 0.1 N 硫酸 11 ml にて酸性化し、0.02N チオ硫酸ナトリウム液で滴定し、空実験値との差より重合度を算出した。その結果 -CHO 含有率 0.11%、重合度 162.7 をえた。

4 構成糖の定量

(1) 加水分解度の測定 中性多糖類は稀鉍酸により、加水分解を実施した場合、最適条件であれば、理論値に近い加水分解度を示すはずである。しかし実際は、逆反応も起りうるし、また糖自体の分解も考えられるので、理論値をうることは困難である。したがって種々な条件下で、加水分解度を測定し、理論値に最も近い値を示す分解条件を探索することが、各種構成糖の相対的割合を決める場合、絶対に必要である。かゝる観点から次に示す条件下で、加水分解度の測定を実施した。即ち 0.02 N, 0.1 N および 0.5 N 硫酸とともに、沸騰下で分解し、各分解時間における分解生物を、常法に従って処理したのち、ペルトラン法によって還元糖量を定量し、ガラクトースとして示した。これらの結果から、本多糖類は Table 3, 4, 5 に示す如く、比較的短時間で完全に加水分解されるガラクトマンナンであることを確認した。また低加水分解度を示す分解液には、オリゴ糖が含まれていることを、PPC 法によって認めた。

Table 3. *Hydrolysis ratio with 0.02 N-H₂SO₄ at boiling state*

Sample (g)	Treatment hour	Ratio (%) (for galactose)
0.1208	2	25.01
0.1620	4	45.87
0.1313	6	70.08
0.1401	8	95.80

Table 4. *Hydrolysis ratio with 0.1 N-H₂SO₄ at boiling state*

Sample (g)	Treatment hour	Ratio (%) (for galactose)
0.1723	2	34.27
0.1484	4	74.47
0.1835	6	80.38
0.1632	8	99.88
0.1925	21	105.71

Table 5. *Hydrolysis ratio with 0.5 N-H₂SO₄ at boiling state*

Sample (g)	Treatment hour	Ratio (%) (for galactose)
0.1890	2	105.56
0.2046	4	102.25
0.1741	6	104.99
0.1701	8	105.06

Table 6. *Moles rate of Galactose and Mannose in the hydrolysis products of Galactomannan*

Sugars	As*	sugar (r)	Moles rate
Mannose	0.629	47.5	2.03
Galactose	0.236	23.4	1

* Specific absorbance by phenol-sulfuric acid method. (Wave length 490 m μ).

PPC 法によって認めた。

(2) フェノール硫酸法³⁾による糖組成の定量 上記最高加水分解度を示す条件を採用し、試料 0.2 g を 0.5 N 硫酸 20 ml とともに、沸騰下、2 時間の分解処理を行ったのち、常法の如く中和、脱色、脱塩後、減圧濃縮して少量となし、PPC 法 (n-プロパノール:酢酸エチル:水=7:1:2 v/v, 上昇法, 室温, 東洋濾紙 No. 50) にて分離し、それぞれの糖に相当する部分から、各糖を抽出し、フェノール硫酸法により、490 m μ における吸光度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線から各糖量を求めた。それらの結果は Table 6 に示す如く、ガラクトース:マンノースのモル比は 1:2.03 であることを認めた。

(3) 誘導体調製法による定量

ガラクトースの定量 (粘液酸法⁵⁾) ガラクトマンナン 0.9119 g を 5% 硝酸 150 ml とともに、沸騰水浴中で、4 時間加熱分解した。末分解物は濾別除去し、濾液は 95°C の湯浴上で、常圧下、約 25 ml に濃縮した。濃縮液は濾化し、濃硝酸 5 ml を加え (硝酸濃度 25% となるように濃硝酸の追加量を加減する)、80~90°C の湯浴上にて 5~10 ml となるまで濃縮し、冷蔵庫内に放置して結晶を析出せしめた。生じた結晶は小型ガラスフィルターで濾過し、少量の冷水で

洗滌後、100°Cで3時間乾燥、秤量し、次式によってガラクトタン量を算出した。なお本結晶は1回の再結晶(水より)によって、融点209~212°Cを示し、標準粘液酸の融点と、よく一致することを認めた。

$$\text{ガラクトタン (g)} = \text{粘液酸} \times 1.2$$

マンノースの定量⁶⁾(ジフェニールヒドラゾン法) ガラクトマンナン 0.5671 gを、0.5 N 硫酸 50 ml とともに、沸騰下、4時間加水分解を実施した。分解液はN水酸化ナトリウム液にて微アルカリ性(pH=8)となし、ついで氷酢酸 1.0 ml を加え酸性となす。濾過後、湯浴上(80~90°C)で15 ml になるまで濃縮する。あらかじめ0.5 g のフェニールヒドラジンを25%酢酸 1 ml に溶かした液を、前記濃縮液に加えることにより、まもなく結晶が析出する。冷蔵庫内に一夜静置したのち、ガラスフィルターにて濾取し、95°Cで3時間乾燥して、恒量となし、次式によって、マンナンとして算出した。マンナン (g) = フェニールヒドラゾン (g) × 0.6

なお、本結晶は融点183°C (178°C付近から分解をはじめ)を示し、マンノースジフェニールヒドラゾンであることを確認した。これらの結果を Table 7 に示す。

Table 7. Results of chemical quantitative analysis of galactose and mannose

Sample (g)	Mucic acid (g)	Galactan ^{a)} (g)	(%)	(Mole)
0.9119	0.2291	0.2612	28.64	1
1.0210	0.2589	0.2952	28.91	
	Hydrazone (g)	Mamman ^{b)} (g)	(%)	2.25
0.5671	0.5496	0.3666	63.62	
0.6128	0.5982	0.3988	65.08	

a), b) schorger method.

以上の実験結果より、ガラクトースとマンノースの割合は1:2.25モルであることが明らかであるが、この数値は前記フェニール硫酸法による結果と大体一致するから、本多糖類は、量的にはマンノースが主体をなすものと推察される。

5 ガラクトマンナンの過ヨウ素酸酸化⁷⁾

(1) 過ヨウ素酸消費量の定量 試料 0.1528 g を秤取し、25 ml 以下の熱水に溶解し、あらかじめメタ過ヨウ素酸ナトリウム 1 g を水に溶解後、50 ml に定容した溶液 25 ml を正確に、前記試料溶液に注加したのち、50 ml に定容し、密栓、遮光した褐色瓶にて、冷蔵庫内で酸化を行った。一定時間ごとに反応液 2 ml を採り、飽和 NaHCO₃ 液 5 ml を加え、ついで 0.02N-Na₃AsO₃ 液 10 ml、さらに20%のKI液 1 ml を順次加え、暗所に15分間置いたのち、0.5%デンプン液を指示薬として、0.02N-I₂液で滴定し、過ヨウ素酸の消費量を測定した。その結果無水ヘキソース残基当り1.2モルのNaIO₄を消費することを認めた。なお、空実験を併用した。

(2) ギ酸の定量⁸⁾ 試料 1.0 g を 250 ml 以下の水に溶解し、一方 0.1M 過ヨウ素酸ナトリウム液 500 ml を調製後、その 250 ml を正確に試料液に加えたのち、両溶液を、それぞれ 500 ml に定容し、Fig. 3 に示す如き条件で、10 ml を採取して、ヨウ素法によってギ酸を定量した結果、無水ヘキソース残基(A.H.U.)当り0.35モルのギ酸を生成することを認めた。両結果を Fig. 3 に示す。また酸化完了後、酸を含まないエチレングリコール 5 g を加えて過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを分解し、水道水にて4日間透析を実施した。透析内液は濃縮乾涸(40°C以下)したのち、加水

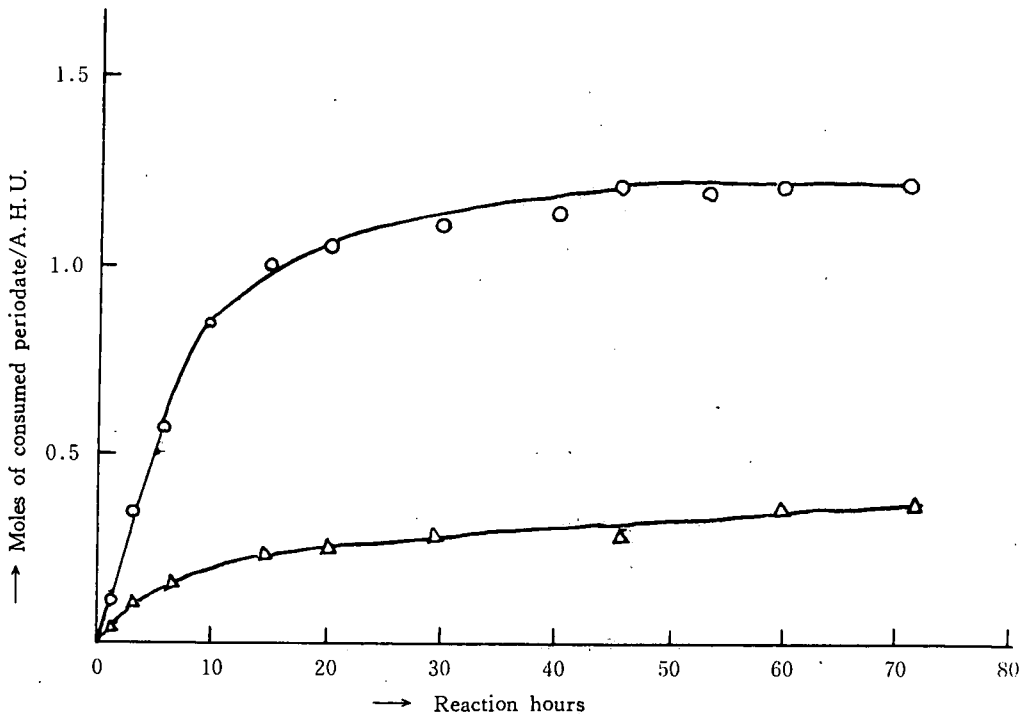


Fig. 3. Periodate oxidation of galactomannan.

○ Periodate consumption (moles/A. H. U.).

△ Liberated formic acid (").

分解を実施し、常法の如く処理して、分解生成物を PPC 法で検した結果、ガラクトースの存在は全く認められず、マンノースは、かなり多量存在することが認められた。これらの結果から、本多糖類では、ガラクトースは、すべて過ヨウ素酸によって酸化される状態で存在し、一方マンノースは酸化に抵抗性を示す存在様式をとっているものと推察できる。

6 オリゴ糖の生成条件とその組成

(1) 部分加水分解 前記加水分解度測定の前項で、予備的に検討した分解条件を採用し、試料各 0.2 g を用い種々な温かな条件で加水分解を実施し、常法の如く処理して PPC 法によって、オリゴ糖生成の最適条件を探索した結果、0.1N 硫酸により 100°C 3 時間の加熱処理が最もよい条件であることを認めた。なお、オリゴ糖は 2 種であり、その R man (D-mannose の移動距離を 1 とした値) は、それぞれ 0.35 および 0.25 である。この他に原点部分にも呈色が認められた。

(2) オリゴ糖の組成および重合度の測定 試料 0.2 g を前記条件で加水分解し、常法の如く処理してえたシラップを東洋濾紙 No. 527 を用いる PPC 法によって分別した。それぞれのオリゴ糖は少量の蒸留水で抽出し、同量の 10% 硫酸にて、硫酸濃度 5% となし、沸騰下、2 時間の加水分解を実施して、その組成を検した結果、いずれもマンノースのみより構成されていることを確認した。なお、原点部分のもの、抽出液の加水分解物中にはマンノース以外にガラクトースの存在も認められた。ついで前記オリゴ糖の重合度を明らかにするために、試料 0.5 g を上記条件で処理し、同様にして調製したシラップは厚手濾紙で分別し、各オリゴ糖を水で抽出した。各抽出液は、濾過し減圧下、40°C で濃縮、乾涸せしめ、それぞれのオリゴ糖をえた。収量は 152 mg および 83 mg であった。各オリゴ糖は真空デシケーター中 (P₂O₅ 上) にて十分乾燥し、Willstätter-Schudel 法⁹⁾

および還元力測定法によって、重合度の測定を試みた。その結果、Table 8 および Table 9 に示す如く、R man 0.35 のオリゴ糖は重合度 2, R man 0.25 は同じく 4 であった。

Table 8. Aldehyde group contents of oligosaccharides by hypiodite method

Sample (g)	-CHO (g)	(%)	D. P *	
R man ^{a)} 0.35	0.0372	0.0028	7.52	2.38
	0.0201	0.0018	8.73	2.05
R man 0.25	0.0326	0.0014	4.43	4.04
	0.0301	0.0013	4.33	4.13

* Degree of polymerization

a) Rf of sample/Rf of mannose.

Table 9. Degree of polymerization of reducing oligosaccharides

Sample (g)	Reducing Power before hydrolysis (Cu mg)	Reducing power after hydrolysis (Cu mg)	D. P *	
R man ^{a)} 0.35	0.0452	82.9	172.4	2.08
	0.0387	71.6	143.2	2.00
R man 0.25	0.0358	66.4	285.5	4.30
	0.0315	58.8	242.3	4.12

* Degree of polymerization

a) Rf of sample/Rf of mannose

(3) ガラクトマンナンのアセトリジス ガラクトマンナン 4.0 g を、あらかじめ 0°C で 2 時間冷却した無水酢酸 36 ml と濃硫酸 3.6 ml の混液に、少量ずつ添加し、室温 (15°C) で 20 時間放置したのち、さらに 25 時間攪拌を継続した。ついで徐々に液温を上げ、80~90°C で、15 分間加熱攪拌し、冷却後遠心分離 (8000 r. p. m. for 15 min) して不溶性物質を除去した。上澄液は氷水中に注加し、生じた沈澱物は水で数回洗滌したのち、吸引濾過し、残渣をデシケーター中 (KOH 上) で乾燥した。(収量 25 g)。本アセチル化物はクロロホルムおよびメタノールに容易に溶解するが、冷水または熱水には溶解しない。このアセチル化物 (CH₃CO-含量 40.1%) 2 g をメタノール 60 ml に溶解し、金属ナトリウムの飽和メタノール溶液 2 ml を加えて脱アセチル化したのち、遠心分離し、沈澱物はメタノールで数回洗滌し、減圧デシケーター中で乾燥した。(収量 0.5 g)。本物質の 1 部分を水に溶解し、PPC 法によって検した結果、R man 0.31 のスポットの他に R man 0.21 および 0.19 の不明瞭なスポットが認められた。なお展開条件は次の如くである。酢酸エチル：ピリジン：水：酢酸 = 5 : 5 : 3 : 1 v/v, 室温, 上昇法, 16 時間展開; 呈色剤: acetone silver nitrate。また一方脱アセチル化試料 0.0362 g を、Willstätter-schudel 法によって、還元性末端基量を測定し、重合度を算出した結果 D. P. 2.4 の値をえた。さらに R man 0.31 のオリゴ糖を N 硫酸にて沸騰状態で、2 時間加水分解を実施したのち、常法の如く処理して PPC 法によって検した結果、マンノースのみを認めた。以上の結果より、ガラクトマンナンの部分加水分解または加酢分解の結果えられたオリゴ糖は、いずれもマンノースのみより構成されていることが明らかである。

総 括

レンゲ種子胚乳部よりえた熱水可溶性多糖類は、他の多くのマメ科植物種子よりえられた多糖類と同様にガラクトマンナンであり、ガラクトース：マンノースが1：2.14のモル比より構成されており、超遠心的に均一で、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} + 61.5$ (C, 0.26, 水), 平均重合度 162.7, 沈降係数 $S_{20, w} = 1.45$ を有する中性多糖類である。また稀鉍酸による部分加水分解およびアセトリシス等によって生成するオリゴ糖は、いずれもマンノースのみより構成されている。さらに過ヨウ素酸酸化により、無水糖残基当り、1.2モルの NaIO_4 を消費し、同時に0.35モルのギ酸を生成する。また過ヨウ素酸酸化多糖類を還元したのち、加水分解すると、マンノースのみが認められることなどから本多糖類はマンノースが骨格をなしガラクトースが側鎖として結合しているものと推察される。

参 考 文 献

- 1) Anderson E. *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 2889 (1949)
- 2) Neukom, H. Deuel, D. Heri, W. J. and Kündig, W., *Helv. chim. Acta*, **43**, 64 (1960)
- 3) Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K. Rebers, P. A. and Smith, F., *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956)
- 4) Willstätter, R. and Schudel, G., *Ber.*, **51**, 780 (1918)
- 5) 右田伸彦, *パルプ及製紙工業実験法*, 三版, p. 108, 共立出版(昭27)
- 6) 同 上 p. 103, "
- 7) Smith, F. and Montgomery, F. *Methods of Biochemical Analysis*. **3**, 193 (1956)
- 8) 同 上
- 9) 4) と同じ

(昭和47年 9月30日受理)