

天然保存料ペクチン分解物に関する衛生化学的研究

伊藤 弘一*, 藤田 博**, 平田 恵子***, 植松 洋子***, 鈴木 公美***,
飯田 憲司***, 斎藤 和夫***, 広門 雅子****, 安田 和男****

Hygienic Studies on Pectin Digests as Natural Preservatives

KOICHI ITO*, HIROSHI HUZITA**, KEIKO HIRATA***, YOKO UEMATSU***, KUMI SUZUKI***,
KENZI IIDA***, KAZUO SAITO***, MASAKO HIROKADO**** and KAZUO YASUDA****

Keywords: ペクチン分解物 pectin digests, 変異原性 mutagenicity, エームス試験 ames test, サルモネラ *salmonella typhimurium* TA100, オリゴガラクトン酸 oligogalacturonic acid, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 天然保存料 natural preservatives

はじめに

ペクチンは果実や野菜類など多くの植物中に存在する植物性多糖類であり、主成分はD-ガラクトン酸が-1,4結合した高分子の酸性多糖で、ガラクトン酸の他中性糖を含有する複合糖類である。

竹中ら¹⁾及びNakeebら²⁾はペクチンを低分子化したペクチン分解物が抗菌作用を有することを明らかにし、横塚ら³⁾も発酵中のワインでブドウ由来のペクチン分解物がエタノールとの相乗効果により有害な細菌の生育を抑制することを明らかにした。この抗菌性により、ペクチンを酵素により分解したペクチン分解物は既存添加物名簿に保存料として記載されている。また同様にペクチンを酵素で分解したオリゴガラクトン酸も製造用剤として記載されている。いずれもガラクトン酸を主成分としたオリゴ糖の混合物である。

本研究は天然保存料等の安全評価の一環として行われたプロジェクト研究「天然添加物の品質に関する研究」におけるテーマ研究「天然添加物の微生物に対する変異原性について」⁴⁾で変異原性が認められたペクチン分解物について、その変異原性を究明したので報告する。

試料及び方法

1. 試料

上記プロジェクト研究⁴⁾において変異原性が認められ

たペクチン分解物(以下試料Aとする)及び新たに入手したオリゴガラクトン酸2種、ペクチン分解物1種(以下試料B, C, Dとする)を試料に用いた。なおペクチン分解物及びオリゴガラクトン酸を総称してペクチン分解物類とする。

2. 変異原性試験

1) 試薬 システイン(和光純薬社製), 亜硫酸水素ナトリウム(和光純薬社製), スーパーオキシドディスムターゼ(以下SODとする)(和光純薬社製), カタラーゼ(シグマ社製)。

菌株 *Salmonella typhimurium* TA100^{5,6)}を普通ブイヨン(Nutrient broth No.2, OXOID)で一夜培養し用いた。これらの株は, B. N. Ames教授(カリフォルニア大)より分与を受けたものである。

2) 試験方法 Ames法の変法であるプレインキュベーション法^{6,7)}により行った。代謝活性化には, アロクロール1254(ジールサイエンス社製)により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット(Crj:CD日本チャールス・リバー社製)の肝臓ホモジネートから調製したS9^{6,7)}を用いた。S9mix^{6,7)}中のS9量は, 10%(50u1/プレート)とした。

ペクチン分解物及びオリゴガラクトン酸の水溶液又は分画溶液0.1mlを小試験管に入れ, 代謝活性化する

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 同毒性部病理研究科

*** 同生活科学部食品添加物研究科

**** 同生活科学部食品研究科

場合にはS9mix 0.5ml, 代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5mlを加え, 更に一夜培養した菌液を0.1ml加え, 37℃で20分間の前培養を行った。これに45℃に保温した軟寒天⁷⁾ 2 mlを加え混合後, 最少グルコース寒天培地⁷⁾に重層した。37℃で2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した。

各濃度にプレート2枚を用い, 結果は, 平均値で示した。更にMooreら⁸⁾のプログラムによる回帰分析を行い, 検定において有意な場合変異原性は陽性とした。

3. 化学分析試験

1) 試薬 標準品としてガラクチュロン酸(シグマ社製)を使用した他, 試薬は全て特級品及びHPLCクロマト用を用いた。

2) ペクチン分解物類の性状分析

水分: カールフィッシャー分析計を用いて測定を行った。

pH: 1%溶液(固形物として)についてpH計を用いて測定を行った。

ガラクチュロン酸: 試料0.1gを2 Mトリフルオロ酢酸を用いて100℃, 2.5時間加水分解後, 分解液を濃縮乾固する。残さに一定量の水を加えて検液とする。試験管に検液と2%食塩水を取り, 振とう後, 氷冷して濃硫酸4 mlを攪拌しながら徐々に加え, 70℃で10分間加熱する。加熱後, 水中で20~30秒間冷却し, 発色試薬(0.1%3,5-ジメチルフェノール氷酢酸溶液)を0.2ml加え, 10分放置後, 400nmと450nmの吸光度を測定し, 450nmの吸光度から400nmの吸光度の差を求め, あらかじめ同様に操作し, 作成した検量線(ガラクチュロン酸として20~80 µg)からガラクチュロン酸の含量を求めた。

総窒素: 試料約2 gをケルダールフラスコにはかり取り, ケルダール分解ペレット(日本ゼネラル社製)及び水を加えて加熱分解する。得られた分解液についてケルダール窒素分析計を用いて総窒素を測定した。

アンモニア性窒素: 試料を0.5mol/L NaOHにて処理した後, ケルダール窒素分析計を用いてアンモニア性窒素を測定した。

3) 変異原性物質の分析

HPLC分析: 各試料を0.01%の濃度となるように移動相に溶解し, HPLC試料溶液とした。HPLC分析条件は以下に示した。

カラム: Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6mm × 250mm), 移動相: 70%アセトニトリル, 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 40℃, 検出器: UV検出器(254 nm)

分取HPLC: 試料Aを1%の濃度となるように移動相に溶解し, カラムは shodex Asahipak NH2P-50 10E (10mm × 250mm)の分取用カラムを用い, 上記の条件で分取を行った。

結果及び考察

1) ペクチン分解物の変異原性 試料Aは, 図1に示した様にTA100, S9無添加において復帰コロニー数が増加し変異原性が見られた。この変異原性は, S9を添加することにより減少したが, 完全に失われるものではなかった。なお試料Aの変異原性は他の試験菌株であるTA97, TA98及びTA102においても検出されている⁴⁾。

2) 変異原性の加熱による影響 試料Aに変異原性が検出されたことから, この変異原性物質を同定するために, まず変異原性物質の性質についての検討を行った。ペクチン分解物は製造過程で加熱されていることから, 加熱による影響を調べた。試料Aを100℃で加熱したところ変異原性は増加する傾向が見られた。ただし, 同時に試験に用いた菌の死滅も見られ, 高濃度では復帰コロニー数の減少が見られた(図2)。次に加熱時にpHを変えて再加熱を行ったところ酸性下での変異原性の増強が著しかった(図3)。以上の結果から試料Aの変異原性物質は, 加熱により生成する可能性が考えられ, アミノ酸, 糖などの既知加熱生成変異原^{9,10)}又はそれらと類似の化合物であると推察された。

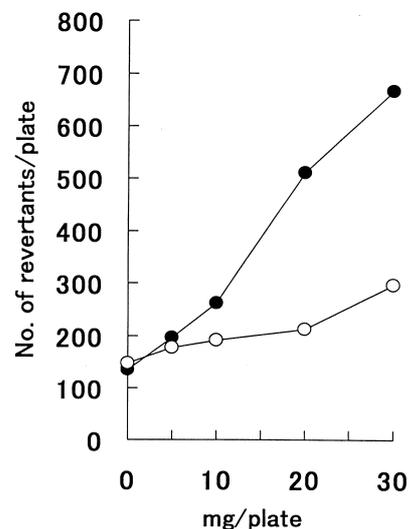


図1. ペクチン分解物のAmes試験における変異原性 TA100 - S9, ○: -S9, ●: +S9

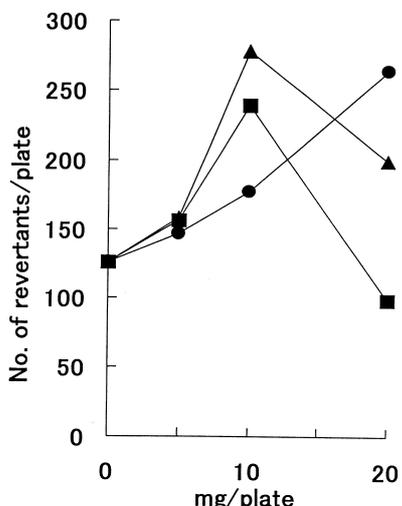


図2 . ペクチン分解物の加熱処理時間による変異原性
TA100 - S9, : 0min, : 60min, : 120min .

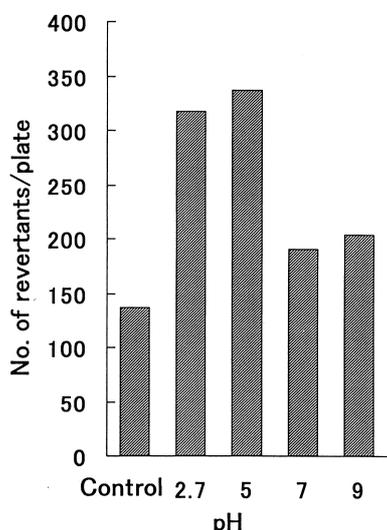


図3 . 100 , 90分加熱処理時のpHによる変異原性の変化
ペクチン分解物 20mg/plate . TA100 - S9, ControlはDW .

なお、今回のペクチン分解物とは製法が異なるがペクチンの加熱分解物の変異原性を示すことが報告¹¹⁾されている。

3) ペクチン分解物液液分画抽出物の変異原性 変異原物質を調べる目的で、チャート1に示すように試料Aを液液分画処理し¹²⁾、いずれの画分に変異原性があるかを調べた。画分aには極性の強い中性物質及び両性物質が抽出される。この画分において変異原性が認められたため、変異原性物質は極性の強い中性物質又は両性物質であることが推察された。

4) ペクチン分解物類の性状と変異原性 試料Aの性状と変異原性の関係を解明するため、市販品3種(B, C, D)と試薬のガラクトuron酸を比較対照として分析し、表1に示した。各試料の名称はメーカーの表示によって分類した。ペクチン分解物、オリゴガラクトuron酸及びガラクトuron酸はpH 2 ~ 3の酸性を示した。またガラクトuron酸の含有量は55 ~ 82%であり、日本食品添加物協会が定めたペクチン分解物の含量規格¹³⁾50%をいずれも上回っていた。日本食品添加物協会のガラクトuron酸測定法はカルバゾール法¹⁴⁾を採用しているが、本法は中性糖の影響を受けやすいため、本調査ではこれらの影響の少ない3,5 - ジメチルフェノール法¹⁵⁾を改良して用いた。広門らは試料Aのカルバゾール法での測定値を109%と報告している¹⁶⁾が、著者らが3,5 - ジメチルフェノール法で測定したところ66%であった。このことにより試料Aには中性糖が含有されていることが推察された。各試料の総窒素量を測定したところ試料Aが高い含有量を示し、同様の形状である試料Bと比較すると約8倍の

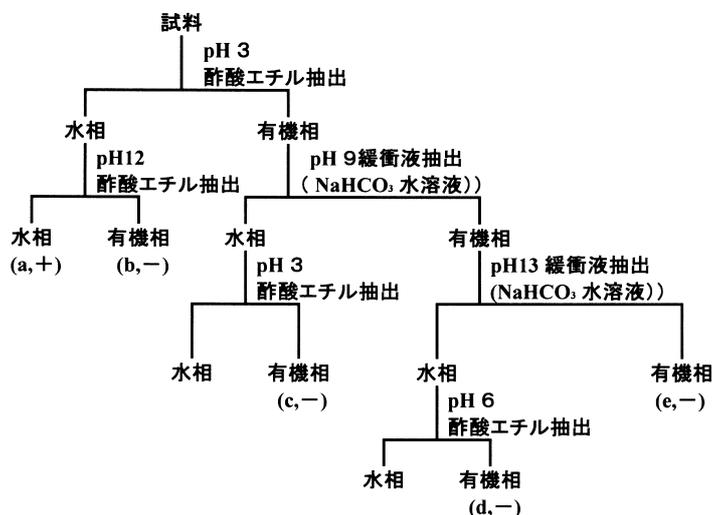


チャート 1 . ペクチン分解物類の分画抽出物の変異原性 (a, +) : a画分抽出物の変異原性は陽性を示す

表 1 . ペクチン分解物の性状及び変異原性

試料	A	B	C	D	E
	ペクチン分解物	オリゴガラクトン酸	オリゴガラクトン酸	ペクチン分解物	ガラクトン酸
化合物形状	茶褐色液体	茶褐色液体	ベージュ色粉末	淡黄白色鱗片	白色粉末
水分(%)	37	38	-	-	-
pH	2.83	3.68	2.46	3.49	2.47
ガラクトン酸(%)	66.4*	78.2*	82.4	55.3	100
総窒素量(%)	0.5403*	0.0682*	0.1823	0.0428	0
アンモニア性窒素(%)	0.0154*	0.0366*	0.0043	0.0000	0
還元糖	+	-	-	-	-
変異原性	+	-	-	-	-

* : 固形物換算値

含有量であった。また各試料を希NaOH溶液により加水分解後ケルダール法により窒素を測定したところ、試料A, B, Cにおいてアミド基由来のアンモニア性窒素を検出した。一方変異原性は試料Aの他に、試料Cのオリゴガラクトン酸においても弱い活性が認められた。

ペクチン分解物類の製造原料のペクチンは植物原料よりの製造過程の違いにより3種類がある。ペクチンはポリガラクトン酸が部分的にメチルエステル化したものであるが、エステル化度の大きい高メトキシルペクチンとエステル化度の小さい低メトキシルペクチンがある。また低メトキシルペクチンにはアミド基を分子中に持つアミド化タイプのものがある。

表1により、変異原性を示す試料Aは加水分解によるアンモニア性窒素を検出することにより、アミド基を分子中に持っていると思われる。このことにより、製造原料はアミド化タイプの低メトキシルペクチンであることが推察できる。また総窒素量が高い試料Aに変異原性が認められ、低い試料Bには認められないことは、ペクチン分解物製造時にアミド基由来の含窒素化合物が生成し、変異原性物質が生じたと思われる。

5) メイラード反応生成物の変異原性 試料Aの変異原性は加熱により増加し、また本試料にアミノ基が含まれていること、広門らが本試料より還元糖であるグルコース及びフルクトースを検出した¹⁶⁾ ことにより、アミノ・カルボニル反応であるメイラード反応により変異原性物質が生じた可能性がある。メイラード反応生成物は加熱生成変異原性物質の一種であるが、この変異原性の発現には活性酸素が関与しているとの報告がある¹⁰⁾。そこで試料Aについてもそれらとの類似性を検討するために、活性酸素の作用を抑制する酵素及び化合物を添加し変異原性試験を行った(図4)。その結

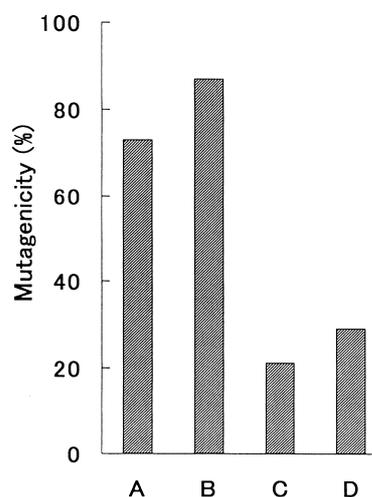


図4 . ペクチン分解物の変異原性の抑制

ペクチン分解物 20mg/plate, TA100 - S9.

A: スーパーオキシドディスムターゼ200 μ g, B: カタラーゼ100 μ g

C: システイン5mg, D: 亜硫酸水素ナトリウム5mg

果, SOD, システイン, 亜硫酸水素ナトリウムで変異原性の抑制が見られた。これはメイラード反応生成物に類似の反応性であることから、ペクチン分解物の変異原性物質は、メイラード反応生成物である可能性が推察された。

ペクチンにはグルコース及びフルクトースは含まれてはいない¹⁷⁾が、試料Aからはそれらが検出されたことにより、本試料の原料であるペクチンには物性等を調整するためにショ糖が添加されていると思われる¹⁸⁾。すなわちペクチン分解物の製造の最終段階で使用した酵素を失活させるために加熱処理を行う際、ショ糖がオリゴガラクトン酸酸性下で加熱分解され、還元糖であるグルコースとフルクトースが生成されたものと思われる。

6) ペクチン分解物類のHPLC分析 表1に示した各試料についてHPLC分析を行った。上記の条件で行った

ところ，図5に示すように試料Aのペクチン分解物において保持時間約13分に他の試料には見られない特異なピークを検出した．

7) ペクチン分解物の分取HPLC 試料AのHPLC分析における保持時間13分のピークについて分取を行い，得られた物質について変異原性試験を行った．分取クロマトグラムと変異原性試験結果を図6に示す．

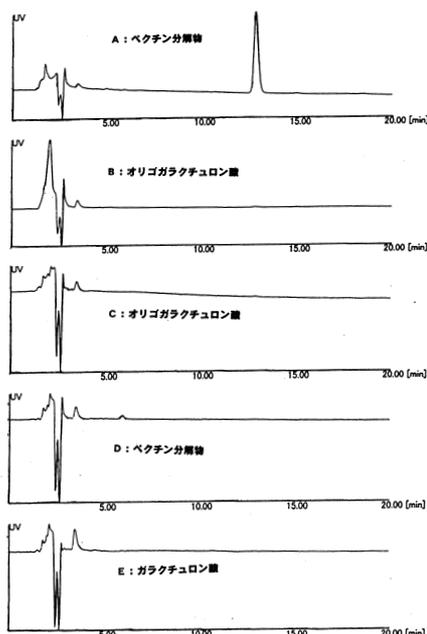


図5．ペクチン分解物類のHPLCクロマトグラム

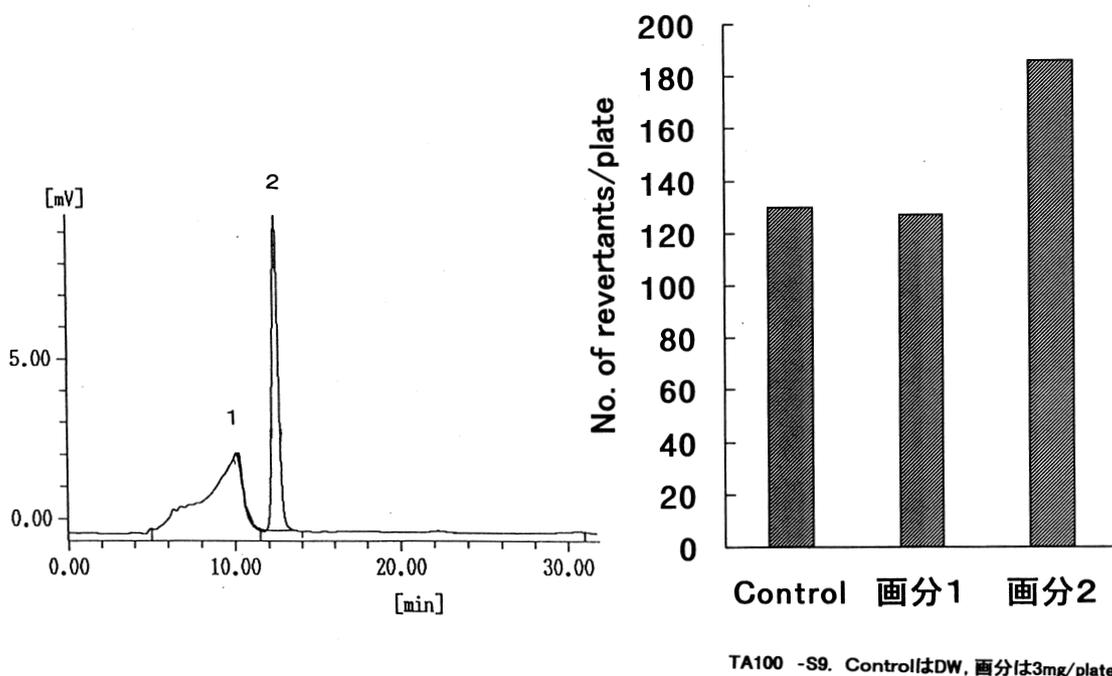
分析条件：カラム：Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6mm × 250mm), 移動相：70%アセトニトリル, 流速：1.0ml/min, カラム温度：40℃, 検出：UV検出 (254nm)

ピーク1にはガラクトチュロン酸及び糖類が溶出するが，この画分に溶出する物質の変異原性はコントロールと等しく，変異原性は認められなかった．一方ピーク2については変異原性があり，本ピーク画分に溶出する物質が変異原性を示す原因物質の一つであることがわかった．得られた物質は淡黄白色の粉末で，UVスペクトルは270nmに吸収を示した．

まとめ

天然保存料の安全性評価の一環としてペクチン分解物の変異原性試験を行ったところ陽性を示す製品が認められた．そこでその原因究明のため，ペクチン分解物中の変異原性物質の究明及びペクチン分解物の品質評価のための成分分析法の改良を行った．

1. 変異原性陽性試料の変異原性はS9無添加の場合に観察され，加熱によりさらに増加した．またSOD，システイン，亜硫酸水素ナトリウムを加えることにより変異原性は減少した．
2. 本試料について液液分画し，得られた抽出物の変異原性を調べたところ，変異原性物質は極性の強い中性物質又は両性物質であることが推察された．
3. ペクチン分解物について変異原性陽性試料と陰性試料を比較検討をしたところ，陽性試料には還元糖であるグルコースが存在し，試料中のペクチン分解物は分子中にアミノ基を有した．このことにより変異原性物質はペクチン分解物製造時のメイラード反応物質であることが推察された．



TA100 -S9. ControlはDW, 画分は3mg/plate.

図6．分取HPLC画分の変異原性

4 . ペクチン分解物の規格項目であるガラクチュロン酸の分析を3,5-ジメチルフェノール法により行ったところ中性糖の影響を受けずに定量を行うことができた .

文 献

- 1) 竹中 哲夫, 武藤 修, 八並 一寿, 他 : 日本食品工業学会 誌, 41, 785-792, 1994.
- 2) El Nakeeb, M. A. and Yousef, R. T. : *Planta Med.*, 18, 295-302, 1970.
- 3) 横塚 弘毅, 松土 俊秀, 櫛田 忠衛, 他 : 発酵工, 62, 1-7, 1984.
- 4) 藤田 博, 広門 雅子, 平田 恵子, 他 : 東京衛研年報, 47, 309-313, 1996.
- 5) McCann, J., Spingarn, N.E., Ames, B.N., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983, 1975.
- 6) Maron, D. M. and Ames, B.N. : *Mutation Res.*, 113, 173-215, 1983.
- 7) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, 20, 1178-1189, 1975.
- 8) Moore, D. and Felton, J.S. : *Mutation Res.*, 119, 95-102, 1983.
- 9) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., et al. : *Proc. Japan Acad.*, 53, 58-61, 1977.
- 10) Seon-Bong, K., In-Soo, K., Dong-Min, Y. : *Mutation Res.*, 254, 65-69, 1991.
- 11) Kuroda, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1893-1895, 1985.
- 12) 大岳 望, 鈴木 昭憲, 高橋 信孝, 他 : 物質の単離と精製, 1976, 東京大学出版会, 東京 .
- 13) 日本食品添加物協会編 : 第 2 版化学的合成品以外の食品添加物自主規格, 176, 1993, 日本食品添加物協会, 東京 .
- 14) Dietz, J.H. and Rouse, A.H. : *Food Res.*, 18, 169-177, 1953.
- 15) Scott, R. W. : *Anal. Chem.*, 51, 936-941, 1979.
- 16) 広門 雅子, 平田 恵子, 植松 洋子, 他 : 東京衛研年報, 47, 175-181, 1996.
- 17) 食品化学新聞社編 : 別冊フードケミカル 5, 78-86, 1993, 食品化学新聞社, 東京 .
- 18) 食品化学新聞社編 : 天然添加物と新食品素材'88, 64-65, 1988, 食品化学新聞社, 東京 .