β-結合糖質の
有効活用—ヘ
ミセルロース
の利用—

ヘミセルロース由来の機能性食品素材の 開発と応用

加藤陽治 (かとう ようじ)¹

高橋 匡 (たかはし ただし)²

¹ 弘前大学大学院地域社会研究科地域産業研究講座
教授

² 地方独立行政法人青森県産業技術センター弘前地域
研究所 生命科学部 主任研究員

1. はじめに

細胞壁を構成するヘミセルロース性多糖画分には種々の多糖が混在しており、含まれる多糖の種類、割合、構造も、植物種や、組織の違い、生長の度合いで異なる。一般にヘミセルロース性多糖として、(1→3)-β-D-グルカン、(1→3), (1→4)-β-D-グルカン、キシログルカン、グルクロノキシラン、グルクロノアラビノキシラン、グルコマンナンなどがある¹⁾。これら個々の多糖がさまざまな生理機能(抗腫瘍性、抗潰瘍性、免疫賦活作用、血糖降下作用など)を有することが知られている^{2,3)}。われわれは農産廃棄物を活用してヘミセルロース性多糖由来オリゴ糖とその生理機能を調べると共に⁴⁾、オリゴ糖を利用した食品開発の研究を進めている。これまでのわれわれの取組の一部を紹介する。

2. リンゴ果実ヘミセルロースの活用

2.1 背景

双子葉植物細胞壁の主要ヘミセルロースであるキシログルカンはセルロース様 (1→4)-β-D-グルカンを主鎖とし、その大部分のグルコース残基の O-6 の位置が α-D-キシロース残基で置換された構造を持つ一種のセルロース天然誘導体である。大部分の双子葉植物細胞壁に含まれるキシログルカン多糖は図 1 に示すオリゴ糖を構成単位とし有している。タマリンド種子キシログルカンとの大きな違いは構成糖としてフコースを含む点である。フコース含有キシログルカンやそれに由来するオリゴ糖は、さまざまな機能性を示す可能性がある⁵⁾。

双子葉植物由来農産廃棄物である、おから⁶⁾、落花生殻⁷⁾、ビートパルプ⁸⁾、リンゴ搾り滓にはそれぞれ、約 4 g/kg 生重量、約 12 g/kg 乾重量、約 12 g/kg 乾重量、約 11 g/kg 生重量でキシログルカン多糖が含まれており、フコース含有キシログルカンの良い給源になり得ること、さらに、それを構成するオリゴ糖単位 XXXG, XXLG, XLXG, XXFG, XLLG および XLFG の比は、27:3:5:38:2:25, 28:4:5:34:4:26, 44:1:4:25:1:26, 45:6:3:20:6:20 で、市販工業用セルラーゼ酵素剤を用いてこれらのオリゴ糖を調製できることがわかった。さらに、キシログルカンオリゴ糖あるいは多糖の生理

活性検索の 1 つとして、ヒト大腸ガン培養細胞 COLO 201, および DLD-1 の増殖に及ぼす影響を調べたところ、側鎖構造の違いで増殖抑制効果に違いがあることが示唆された⁹⁾。また、リンゴヘミセルロースとしてガラクトグルコマンナン (Man:Glc:Gal = 5.7:3.0:1.1) の存在も明らかにされ¹⁰⁾、同様な作用が示唆されている¹¹⁾。

一方、リンゴは青森県における主要作物であるとともに、国内における総生産量の約 50% を青森県が占めている。収穫されたリンゴのおよそ 2 割弱が加工用原料となり、そのうち 9 割は果汁へと加工されている。この果汁製造工程における搾汁残渣の量は、青森県内の主要リンゴ加工場を総合すると、毎年 1~2 万トンの規模に上る。これらリンゴ搾汁残渣は、近年、家畜飼料、堆肥・有機肥料、食品素材などへの利用が進み、産業廃棄物として処分される量こそ少なくなったものの、未利用糖質資源としての利活用が期待されている。これまで、リンゴ搾汁残渣を利用した様々な研究開発が進められてきたが、われわれは、リンゴ細胞壁多糖類とその他機能性成分に着目した機能性食品素材の開発に着手することとした。青森県内の加工業者は大半が中小規模で構成されており、新たに資本投資した製造ラインの再構築は困難な状況という理解の上で、実用化を見据えた技術開発が求められた。また、リンゴ加工場ではペクチナーゼ系酵素を使用した清澄果汁を製品化していることから、酵素を活用した技術開発であれば、企業への技術移転にも可能性があると思定し、ヘミセルロースをはじめとして酵素処理による機能性糖質素材のオリゴ糖および有用成分の抽出に向けて研究開発を始めた。

2.2 リンゴ搾汁残渣に含まれるヘミセルロースの有効活用

2.2.1 リンゴ搾汁残渣の酵素処理

リンゴ搾汁残渣の繊維成分は、セルロース 2.1%, ヘミセルロース 0.9% であるのに加えて、リグニンも 1.5% 含まれていることがわかっており¹²⁾、ヘミセルロースを活用する上でも、リグニンの存在を無視することはできなかった。すなわち、リグニンを除去することや¹³⁾、木材細胞構造を磨砕し、粒子の大きさを小さくすることで加水分解率が向上すること¹⁴⁾、また、酸性下で蒸煮処理することでリグニンが低分子化することなどが報告されていることか

図1. 双子葉植物キシログルカンを構成する主なオリゴ糖単位

図2. 2次糖化物までの調製工程

リンゴ搾汁残渣に対して同重量加水し、破碎、加熱後に酵素処理して得られた1次糖化物を遠心分離し、その上清を1次糖化液として回収した。これを新たなリンゴ搾汁残渣に対し同重量添加して破碎、加熱後に2回目の酵素処理を行った。この操作によって得られた酵素処理物を2次糖化物とした。

ら¹⁵⁾、リンゴ搾汁残渣においても、同様にして酵素処理前の加熱処理により、加水分解の向上を図る必要があると考えた。リンゴ搾汁残渣は果汁製造時に一次圧搾され、含水率は約80%であるものの、加水しないことには酵素反応が進まないため、加水した後に破碎および加熱の前処理を行うことで、酵素がセルロース、ヘミセルロースと反応しやすい状態にすることが求められた。

目的とする機能性糖質素材のオリゴ糖を生成、回収するために、図2に示した方法を提案した。すなわち、加水したリンゴ搾汁残渣の酵素処理(セルラーゼ系酵素とバクチナーゼ系酵素の共用)により得られる糖化物について、遠心分離した上清画分を新たなリンゴ搾汁残渣に加え、さらに2回目の酵素処理を行うことで、最終的に濃縮したエキスを製造できると考えた。このようにして得られたエキスについて、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布を測定したところ、酵素処理前にはみられなかった糖類が

図3. リンゴ搾汁残渣酵素処理前後可溶物のBio-Gel P-2クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーによって得られたフラクションのうち、奇数番について加水分解後の構成単糖(◆, フコース; ■, アラビノース; ▲, ラムノース; ●, ガラクトース; ◇, グルコース; □, キシロース; △, マンノース; ○, フルクトース)を分析。分析は、パルスドアンペロメトリー検出器(金電極)付きの陰イオンクロマトグラフィー(日本ダイオネクス, ICS-3000)で行った。

確認されたことから、さらにゲルろ過フラクションについて構成糖分析した結果、搾汁残渣を酵素処理したことで、新たに、ガラクトース、グルコース、アラビノース、キシロース、フコース等によって構成される複数のオリゴ糖が生成されていることを確認した(図3)。これらのオリゴ糖の大部分は、キシログルカンやガラクトグルコマンナンなどに由来するオリゴ糖である。

2.2.2 リンゴ搾汁残渣食酢化試験

市販されている食酢には、オリゴ糖が含まれているものがよくみられるが、ヤーコン酢などもともと原料にオリゴ

糖が多いものの以外は、オリゴ糖を別に添加して製造した食酢がほとんどである。そこで、前述した方法による糖化物を利用した製品として、リンゴ搾汁残渣由来のオリゴ糖を含んだリンゴ酢の製造を提案した。

食酢を製造するには、図4に示したように、アルコール発酵法とアルコール添加法の2つの製法が存在するが、これまでの経験から、アルコール発酵によって製造された食酢では、酵母によって単糖が消費され、また若干の発酵臭がつくことがわかっている。一方、アルコール添加法では酵母による単糖消費がなく、原料の甘味、風味が残ったタイプに仕上がる。アルコール発酵による発酵臭が酢の特徴とする見方もあることから、製法の選択は商品コンセプトによって異なると考え、本研究では、リンゴ搾汁残渣2次糖化物を使ったアルコール発酵法とアルコール添加法の両製法により食酢を製造した。

われわれの試験醸造酢（試験醸造酢1：2次糖化物をアルコール発酵後に酢酸発酵したもの。試験醸造酢2：2次糖化物にアルコールを添加後に酢酸発酵したもの）および市販リンゴ酢（市販酢1：濃縮果汁を使用し、アルコール発酵により製造された市販リンゴ酢。市販酢2：アルコール添加により製造された市販リンゴ酢）それぞれのゲルろ過による分子量分布とゲルろ過各フラクションの構成糖分析の結果を図5に示した。この結果、試験醸造酢1では、アルコール発酵によって単糖が資化されながらも、2次糖化物に生成されていたオリゴ糖は、そのまま残存していることが確認され、試験醸造酢2においては、2次糖化物とほぼ同等の糖構成であることが確認された。以上のことから、リンゴ搾汁残渣を酵素処理することによって生成されたオリゴ糖が、酵母および酢酸菌に資化されることなく、最終的な食酢にまで残存していることが確認された^{16,17)}。なお、これらの試験醸造酢に含まれているオリゴ糖は、市販リンゴ酢には含まれていなかった。

3. 米糠ヘミセルロースの活用

3.1 背景

高等植物細胞壁を構成する多糖類の一部にはフェノール酸（フェルラ酸や

-

クマル酸）がエステル結合している。禾本科植物の主要ヘミセルロースであるアラビノキシランもその1つである。図6にトウモロコシ暗発芽幼植物細胞壁から得られたグルクロノアラビノキシランの構造を示す¹⁸⁾。フェルラ酸はアラビノース側鎖のO-5位にエステル結合している。これらフェノール酸は抗酸化機能成分などとしてその働きが注目されている。しかし、フェノール酸が結合した多糖やオリゴ糖の生理機能は十分解明されていない。フェノール酸含有多糖あるいはそれに由来するフェノール酸含有オリゴ糖類を得るためには、エステル結合を加水分解するアルカリ抽出は避けなければならない。

われわれは、まず、禾本科植物由来農産廃棄物のなかから、麦根（麦芽製造時の副産物）、稲わら、籾殻、米糠、

図4. 食酢製造におけるアルコール発酵法とアルコール添加法

図5. 各醸造酢のBio-Gel P-2 クロマトグラフィー

分析条件は図3と同じである。市販酢1, 2ではゲルろ過で糖の検出がみられなかった部分を除いて分析した。

図6. トウモロコシ幼植物細胞壁グルクロノアラビノキシランの構造

図7. 米糠可溶性画分のSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィ

図8. 紫黒米糠加工品水可溶性画分画

紫黒米糠加工品に蒸留水を加え、搅拌後、遠心操作 (8,000 rpm, 30 分) にて可溶性画分 (WS) と水不溶性画分 (WIS) に分けた。WS を Bio-Gel P-2 (φ 5.0 × 47.5 cm) のゲル濾過クロマトグラフィに供し、糖の溶出パターンより、Fr. I~IV に分画した。

表1. 各画分の糖とフェノール酸の含有量および組成比

画分	全糖量 (mg)		構成糖(wt%)							フェノール酸 (mg)*		フェルラ酸 (mg)	p-クマル酸 (mg)
			Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man				
可溶性*	63,500.0	(100%)	3.0	10.1	0.4	4.4	76.5	5.1	0.6	144.11	(100%)	102.58	41.53
1	19,810.0	(31.2%)	0.7	10.1	1.0	7.4	69.2	9.2	2.4	28.02	(19.4%)	28.02	—
2	40,440.0	(63.7%)	7.7	7.9	—	1.1	79.7	3.5	0.4	17.71	(12.3%)	15.15	2.56
3	795.0	(1.3%)	0.4	5.3	0.1	1.2	86.1	6.8	0.2	11.76	(8.2%)	9.76	2.00
4	347.2	(0.5%)	1.3	8.0	—	0.8	77.9	10.6	1.4	20.23	(14.0%)	14.35	5.88
5	148.7	(0.2%)	1.1	8.5	0.5	0.8	83.4	3.6	2.1	13.19	(9.2%)	6.28	6.91
合計	61,540.9	(96.9%)								90.91	(63.1%)	73.56	17.35

*分画前の全可溶性画分, **フェルラ酸 + p-クマル酸。

トウモロコシ穂およびトウモロコシ茎の6種類を選び、それぞれの試料のフェノール酸含有量および糖含有量を調べた。総フェノール酸量は約10~13 mg/g (フェルラ酸は約56~374 μg/g, p-クマル酸は約219~933 μg/g), および全糖量は約263~462 mg/g (Ara : Gal : Glc : Xyl = 5~23 : 1~5 : 30~60 : 24~54) と種類により差があった。麦根と米糠がフェルラ酸を多く含み、また、調製のし易さからフェルラ酸含有オリゴ糖のよい給源となると考えた¹⁹⁾。

次に、米糠から抽出・加水分解して得られたフェノール酸含有ヘテロオリゴ糖画分をSephadex LH-20 で分画し (図7), 各画分のフェノール酸含量と糖量および構成糖を分析した後 (表1), 機能検索を行った²⁰⁾。ヒトガン培養細胞

(ヒト大腸ガン培養細胞 COLO201, COLO205, DLD-1, および食道ガン培養細胞 TE-1) の増殖に及ぼす影響を調べたところ、糖の主要画分より分子量が小さく、フェノール酸との結合度が高いと思われる画分 (Fr. 3) に増殖抑制効果が示された。これまで大腸癌細胞 COLO201 に対する増殖抑制効果があることを見出してきたが、本実験では4つの細胞株に対し増殖抑制効果があることがわかった。さらに、米糠抽出液のフェノール酸結合型と解離型オリゴ糖の、ラットの腸内環境に及ぼす影響について短鎖脂肪酸を指標に行ったところ、結合型および解離型溶液投与群で、盲腸および大腸内酢酸量と酪酸量が増加傾向にあった。これらの結果から、短鎖脂肪酸に及ぼす影響として、フェ

図9. 紫黒米糠加工品の水可溶性各画分のマウスマクロファージ様細胞に対するNO産生誘導活性

各画分の刺激によりJ774.1細胞から産生される培養上清中のNO₂⁻を、Griess測定試薬(Promega)により測定した。

ノール酸結合の有無での差異は認められなかったが、米糠抽出液は腸内環境に影響を及ぼすことが示唆された。

3.2 紫黒米糠加工品

紫黒米(朝紫)の糠を使用して、ポリフェノール(アントシアニン)やギャバを多く含むと共に、米糠ヘミセルロースのオリゴ糖を含む紫黒米糠加工品を開発した²¹⁾。このものの水可溶性画分をBio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供した(図8)。糖の溶出パターンより、Fr. I~IVに分画した。各画分および分画前の試料それぞれのマウスマクロファージ様細胞J774.1に対するNO産生誘導活性を調べたところ(図9)、Fr. Iが最も活性が高く、Fr. IIIおよびIVには活性は認められなかった。Fr. Iに含まれる澱粉系多糖をアミラーゼ(イソアミラーゼとグルコアミラーゼ)処理で除去後の試料(uronic acids: Rha: Fuc: Ara: Gal: Glc: Xyl: Man = 11.6: 2.0: 0.4: 20.0: 22.4: 22.9: 8.5: 12.2)でも活性が確認された。アラビノキシランやガラクトグルコマンナン等の多糖あるいは比較的重合度の大きいオリゴ糖画分が活性を有すると思われる。

4. おわりに

日常の食生活において摂取する食物繊維の大部分は、植物性食品(細胞壁成分)に由来するといっても過言ではない。その食物繊維は、水可溶性食物繊維と水不溶性食物繊維とに大別され、前者の代表がペクチン、後者の代表が一部のペクチンおよびヘミセルロースとセルロースである。溶解性によってもその栄養効果は異なる。これらを構成する個々の多糖もまた、さまざまな生理機能を有している。多糖の持つ食品・栄養生理学的な機能研究を進める上で、特に生理活性と構造の相関を知るためには多糖の微細構造解析は重要である。農産廃棄物や農産加工時の副産物から有用オリゴ糖断片を調製し、機能と構造の相関性に関わる

研究がさらに進み、それを活用した機能性食品が開発されることを期待したい。

文献

- 1) 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治: 「植物細胞壁多糖と多糖類」, 培風館, 東京 (1991).
- 2) 井上國世監修: 「機能性糖質素材の開発と食品への応用」, シーエムシー出版, 東京 (2005).
- 3) 大野尚久監修: 「βグルカンの基礎と応用」, シーエムシー出版, 東京 (2010).
- 4) Y. Kato: Studies on the fine structure and functional role of plant cell-wall polysaccharides. *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 35-43 (2008).
- 5) 曾根良昭, 牧野千恵, 三崎 旭: 植物キシログルカンから得られたオリゴ糖のラット腸管でのグルコース吸収に及ぼす阻害効果. *栄食誌*, **46**, 391-395 (1993).
- 6) 加藤陽治, 小西照子: おからヘミセルロースに含まれるキシログルカンのオリゴ糖単位での組成分析. *日本食品科学工学会誌*, **46**, 758-762 (1999).
- 7) 加藤陽治, 野呂 治, 東 康夫: 落花生殻に含まれるキシログルカンのオリゴ糖分析. *日本食品科学工学会誌*, **47**, 560-563 (2000).
- 8) Y. Kato and M. Kobayashi: Isolation and characterization of hemicellulose from beet pulp. *J. Appl. Glycosci.*, **47**, 45-48 (2000).
- 9) Y. Kato, J. Uchida, S. Ito and Y. Mitsuishi: Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO201 human tumor cells. in *New Development in Glycomedicine*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 161-164 (2001).
- 10) K. Nara, S. Ito, K. Kato and Y. Kato: Isolation of galactoglucomannan from apple hemicellulosic polysaccharides with binding capacity to cellulose. *J. Appl. Glycosci.*, **51**, 321-325 (2004).
- 11) 伊藤聖子, 奈良一寛, 加藤陽治: リンゴ果実由来ヘミセルロース性多糖の機能検索. 日本農芸化学会2005年度大会講演要旨, **96** (2005).
- 12) 市田淳治, 山口信哉, 松江 一, 太田和孝, 大坊民夫, 山口敬子, 成田優二, 金沢洋作, 村上清一: 地域未利用資源の有効活用リンゴ搾汁残渣の有効利用. キープロジェクト研究報告書, **3**: 32-35 (1996).
- 13) K. Sudo, Y. Matsumura and K. Shimizu: Enzymatic hydrolysis of woods. I. Effect of delignification on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase. *木材学会誌*, **22**: 670-676 (1976).
- 14) Y. Matsumura, K. Sudo and K. Shimizu: Enzymatic hydrolysis of woods. II. Effect of grinding and alkali treatment on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase. *木材学会誌*, **23**: 562-570 (1977).
- 15) S. Hishiyama and K. Sudo: Degradation mechanism of lignin by steam-explosion. *木材学会誌*, **38**: 944-949 (1992).
- 16) 高橋 匡, 市田淳治, 加藤陽治: リンゴ搾汁残渣からの醸造酢製造とその機能性. *日本食品科学工学会誌*, **58**: 37-42 (2011).
- 17) 国立大学法人弘前大学, 地方独立行政法人青森県産業技術センター: 植物材料糖化物, 醸造物およびそれらの製造方法, 特開 2011-148724.
- 18) Y. Kato and D.J. Nevins: Enzymic dissociation of *Zea* shoot cell wall polysaccharides. IV. Dissociation of glucuronarabinoxylan by purified endo-(1→4)-β-xylanase from *Bacillus subtilis*. *Plant Physiol.*, **75**, 759-765 (1984).
- 19) 加藤陽治: 植物細胞壁多糖の構造と機能. *化学工業*, **61**, 1-5 (2010).
- 20) 加藤陽治, 三浦富智, 高垣啓一, 片方陽太郎: 米糠細胞壁由来フェノール酸含有オリゴ糖の生理機能. 飯島記念食品科学振興財団平成17年度年報, 飯島記念食品科学振興財団, 市川, pp. 240-245 (2007).
- 21) 伊藤 汎, 加藤陽治, 野呂 治: 飲食品組成物の製造法, 特許第3760139号, 2006-3-29.