[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.67, No. 12, pp. 1701~1705, 1993]

セルラーゼ共存下におけるゴマ種子リグナン配糖体の β -グルコシダーゼによる加水分解

栗山健一, 無類井建夫
(日清製油株式会社研究所)

平成5年3月5日受理

Effect of Cellulase on Hydrolysis of Lignan Glycosides in Sesame Seed by β -Glucosidase

Ken-ichi KURIYAMA and Tateo MURUI
*Research Laboratory, The Nisshin Oil Mills, Ltd., 1-3 Chiwaka-cho,
Kanagawa-ku, Yokohama 221*

The enzymatic hydrolysis of lignan glycosides in sesame seed was examined. β -Glucosidase only hydrolyzed sesaminol glycoside sufficiently. However, all lignan glycosides tested could be hydrolyzed by a combination of cellulase and β -glucosidase. The optimum condition for this reaction was incubation at 50°C for 20 h with a buffer (pH 4.5-5.0). When cellulase was used with β -glucosidase, the amount of lignans obtained was 3 to 10 times the amount obtained without cellulase. The most abundant aglycon of lignan glycosides in sesame seed was sesaminol.

(Received March 5, 1993)

緒 言

ゴマ種子に特有に存在するセサミノール等のフェノール性リグナン類(リグナン類)は, その抗酸化活性が注目され, 多くの研究がなされている。これらリグナン類は, 複数の糖と結合した配糖体(リグナン配糖体)として存在することがこれまでの研究で示唆されていた⁽¹⁻³⁾。リグナン配糖体の加水分解には従来から β -グルコシダーゼが使用されてきた⁽¹⁻³⁾が, リグナン配糖体の分析法が確立されていなかったことから加水分解法に関する明確な評価はなされていなかった。

著者らは, リグナン類の調製法として, 酵素によるリグナン配糖体の効率的な加水分解条件を検討したところ, セルラーゼを β -グルコシダーゼと併用する方法が有効であることを見出した。本報ではその条件の検討において得られた若干の新しい知見について報告する。

実験方法

1. 試料 ゴマ油製造工場で, 焙煎あるいは非焙煎

の中国産白ゴマ種子をエキスペラーにより圧搾後, ヘキサンで脱脂して用いた(脱脂粕)。

2. 酵素 セルラーゼ(Cell) [EC 3.2.1.4] は *T. viride* 由来(ペーリンガー・マンハイム山之内社製, 0.5 units/mg)を, β -グルコシダーゼ(β Gl) [EC 3.2.1.21] は sweet almond 由来(フナコシ社製, 10 units/mg)あるいは almond 由来(Sigma 社製, 7 units/mg)を用いた。 α -グルコシダーゼ(α Gl) [EC 3.2.1.20] は yeast 由来(Biozyme Laboratories 社製, 100 units/mg)を, β -ガラクトシダーゼ(β Ga) [EC 3.2.1.23] は *E. coli* 由来(オリエンタル酵母社製, 112 units/mg)を, β -アミラーゼ(β Amy) [EC 3.2.1.2] は小麦由来(和光純薬工業社製, 3 units/mg)を, α -アミラーゼ(α -Amy) [EC 3.2.1.1] は *B. subtilis* 由来(和光純薬工業社製, 20 units/mg)を用いた。

3. 粗リグナン配糖体画分の調製 ゴマ脱脂粕を10倍容量の80%メタノール水溶液で室温にて24h抽出し, 濾過した。濾液を濃縮乾固し, 得られた抽出物をヘキサンおよび酢酸エチルでそれぞれ2回分散して洗浄し

た。続いて、抽出物を少量の水に再び分散させ、抽出物の 20 倍容量のメタノールに攪拌しながら徐々に滴下した。静置後、全量を遠心分離して上澄を取り、濃縮乾固して粗リグナン配糖体画分を得た。

4. リグナン配糖体の加水分解 粗リグナン配糖体画分 1 g を 500 ml の栓つき三角フラスコに取り、セルラーゼ 700 mg, β -グルコシダーゼ 200 mg を加え、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 200 ml に溶解した後、ヘッドスペースを窒素で置換して 50°C で 24 h 振盪した。酢酸エチル 400 ml を加えて、3 min 激しく振盪後、遠心分離 (3000 $\times$ g, 15 min) した。酢酸エチル層を取り、40°C 以下で濃縮乾固しアグリコン抽出物を得た (約 100 mg)。

5. GC-MS 分析 アグリコン抽出物 1 mg を TMS-PZ (東京化成工業社製) 1 ml に溶解して室温にて 30 min 放置後、以下の条件で GC-MS に供した。GC-MS 装置, Automass-50 (日本電子社製); カラム, DB-17 HT (5 m $\times$ 0.319 mm 膜厚 0.15 μ m J & W SCIEN-TIFIC 社製); 注入法, スプリット法 (スプリット比 1/10); カラム温度, 270°C; キャリアガス, He; イオン化電圧, 30 eV; イオン源温度, 210°C; インターフェース温度, 260°C。

6. HPLC 分析 粗リグナン配糖体画分またはアグリコン抽出物を以下の条件で HPLC に供した。HPLC 装置は, ポンプ (CCPM, 東ソー社製) にカラム (Soken Pak ODS-W 5 μ , 10 $\times$ 250 mm), 紫外吸収検出器 (UV-8000, 東ソー社製) を接続し, 溶出は, 水:メ

タノール (90:10) から 60 分後に (10:90) となる直線グラジエントを用い, 流速を 1 ml/min, 検出波長は 288 nm とした。

結果および考察

1. 加水分解酵素

粗リグナン配糖体画分を基質とし, グルコシド結合を加水分解する 7 種の酵素を 10 通りの組合せで作用させたときのアグリコンの生成量から各酵素の加水分解能を比較した (Table I)。従来の β -グルコシダーゼを単独で作用した場合 (従来法) のアグリコン生成量を 100 とすると, β -グルコシダーゼあるいはセルラーゼ以外の酵素ではほとんど加水分解は進まなかったが, セルラーゼと β -グルコシダーゼを併用する方法 (本法) では, すべての種類のアグリコンの生成量が従来法よりも優っていた。両酵素を併用する場合, Table II に示したように, アグリコンの生成量は, セルラーゼの添加量に比例して増加し, 粗リグナン配糖体画分に対しセルラーゼは 70 % (wt/wt), β -グルコシダーゼは 20 % (wt/wt) 以上添加することが必要であった。 (Table II において, セルラーゼ 80%, β -グルコシダーゼ 20% を加えた場合のほうが, 全リグナン類量は 0.9% 多いが, 分析精度等を考慮しセルラーゼ 70%, β -グルコシダーゼ 20% でほぼ一定値に達していると判断した)。また, アグリコンのうちピノレジノールと P-1 の生成量は, セルラーゼの存在下では β -グルコシダーゼの添加の有無に影響を受けないが, セサモリノールやセサミノールの生成量を最大

Table I. Effect of Various Hydrolases on Hydrolysis of Lignan Glycosides

Enzymes (units)	pH of buffer	Relative amount of lignans				
		Pinoresinol	P-1	Sesamolinal	Sesaminol	Total
Cell (3) + β Gl (20) ^{a)}	4.5	167.0	340.1	122.5	763.4	313.5
Cell (3)	4.5	164.8	337.4	106.3	90.8	144.5
β Gl (20) ^{a)}	4.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
β Gl (20) ^{b)}	4.5	98.3	110.5	97.5	114.5	102.8
α Gl (20)	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β Ga (20)	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β Amy (3)	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α Amy (3)	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β Amy (3) + β Gl (20) ^{a)}	4.5	100.0	105.4	97.5	97.0	99.1
α Amy (3) + β Gl (20) ^{a)}	4.5	100.0	107.8	98.4	99.0	99.7

Ten milli-gram of mixture of lignan glycosides extracted from sesame seed were incubated with various hydrolases and 20mM acetate buffer (pH 4.5) or 20mM phosphate buffer (pH 7.0) for 24h at 37°C. The amount of lignans by hydrolysis of β -glucosidase is represented as 100%. ^{a)} β -Glucosidase from sweet almond; ^{b)} β -glucosidase from almond.

Table II. Effect of Amount of Cellulase and β -Glucosidase on Hydrolysis of Lignan Glycosides

No.	Cellulase (mg)	β -Glucosidase (mg)	Relative amount of lignans				
			Pinoresinol	P-1	Sesamolol	Sesaminol	Total
1	0	400	57.4	30.0	69.2	10.3	28.1
2	0	200	56.9	28.7	68.2	10.4	27.9
3	100	200	89.5	89.3	85.6	58.8	70.7
4	300	200	94.6	92.0	88.2	77.3	83.2
5	500	200	98.1	93.3	89.7	89.9	91.6
6	600	200	99.2	94.7	90.3	95.8	95.6
7	700	200	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	800	200	100.8	100.7	103.1	100.4	100.9
9	700	100	100.1	99.0	90.7	96.2	95.8
10	700	50	102.1	101.0	90.8	91.0	94.2
11	700	20	101.6	101.3	86.2	55.6	72.1
12	700	0	100.0	100.0	81.0	20.1	49.9

One gram of mixture of lignan glycosides extracted from sesame seed were incubated with various amount of cellulase and β -glucosidase for 24h at 50°C. The amount of lignans by hydrolysis under the condition of No. 7 (700mg cellulase and 200mg β -glucosidase) is represented as 100%.

にするには両酵素の添加が必要で、とくにセサミノールは、セルラーゼ併用の効果が最も顕著であり、従来法に対してセサミノールは約 9.7 倍の生成量を得ることができた。従来法では、 β -グルコシダーゼの増加や (Table II), また反応時間の延長は、ほとんどアグリコンの生成量の増加に効果がなかった。

2. 反応時間と加温温度の影響

本法における反応時間と温度について検討したところ、すべての種類のアグリコンの生成は、50°C で 20 h 以上の加温が最も効果的であった (Fig. 1)。また、反応容器のヘッドスペースを窒素で置換しない場合は、アグリコンの生成量に若干の減少が認められた。

3. pH の影響

本法の至適 pH は、アグリコンの種類によって若干の差は生じるものの、pH 4.5~5.0 であった (Fig. 2)。

4. セルラーゼの作用について

以上の結果から、リグナン配糖体の加水分解にはセルラーゼが有効であることを示し、その最適な反応条件を決定した。セルラーゼのこれらリグナン配糖体の加水分解反応に対する作用に関しては新規な試みであるため、その作用機作に関する若干の検討を加えた。

われわれは、すでにゴマ種子中のセサミノール配糖体類の存在を確認し、それらはセサミノールトリグルコシドを主成分 (80~90%) とし、他にジグルコシド (8~11%), モノグルコシド (1~10%) からなることを明らかにした (投稿中)。セサミノール配糖体類の加水

Fig. 1. Effect of Temperature and Incubation Time for Hydrolysis of Sesaminol-Glucosides. For the condition of hydrolysis see No. 7 of footnote of Table II. The amount of sesaminol by the incubation at 50°C for 24h is represented as 100%. -○-, 30°C; -●-, 40°C; -△-, 50°C; -▲-, 60°C.

分解に関して、セルラーゼの効果が他のリグナン配糖体に比べて大きいことから、カラムクロマトグラフィー等

Fig. 2. Effect of pH on Hydrolysis of Lignan Glycosides. The amount of lignans by incubation at pH 5.0 is represented as 100%.

によって単離したこれら3種のセサミノール配糖体類を用い、セルラーゼおよび β -グルコシダーゼの作用に関して検討した。その結果、1. セルラーゼ単独による反応で、セサミノールトリグルコシドやセサミノールジグルコシドは加水分解され、セサミノールモノグルコシドに変換された。2. セルラーゼ単独による反応で、セサミノールモノグルコシドの大部分(90%以上)は加水分解されなかった。3. β -グルコシダーゼ単独による反応で、セサミノールトリグルコシドは全く加水分解されなかった。4. β -グルコシダーゼ単独による反応で、セサミノールジグルコシドの大部分(約90%)やセサミノールモノグルコシドは加水分解されセサミノールに変換された。5. セルラーゼおよび β -グルコシダーゼを併用した場合、いずれのセサミノール配糖体類も加水分解されセサミノールを生成した。これらの結果から、セサミノール配糖体類の主成分であるセサミノールトリグルコシドの加水分解は、まず、セルラーゼによって、トリグルコシドからジグルコシドまたはモノグルコシドに変換されたのち、共存する β -グルコシダーゼによって、糖とセサミノールに分解される2段階からなっていると考えられた(Fig. 3)。したがって、粗リグナン配糖体画分を基質とし、 β -グルコシダーゼの単独による反応で生成されるセサミノールは(Table II)、セサミノ

Fig. 3. Reverse-Phase HPLC of the Mixture of Lignan Glycosides, Purified Sesaminol-Di-Glucoside and Hydrolyzed Mixture by Cellulase and β -Glucosidase. Column, Soken pack ODS-W 5 μ . Solvent system, (a) 10% methanol in water, (b) 90% methanol in water. Linear gradient from (a) to (b) for 60 min. Flow rate, 1 ml/min. Detection, at 288 nm. Peak a, sesaminol-tri-glucoside; b, sesaminol-mono-glucoside; c, sesaminol; d, sesaminol-di-glucoside.

ールジグルコシドとモノグルコシドが加水分解されて生じたものであり、主成分であるセサミノールトリグルコシドの大部分は分解されておらず、そのためにセルラーゼの併用が、セサミノールの生成量に大きな影響を与えたと考えられた。

一方、セサミノール以外のリグナン類をアグリコンとする配糖体は、セルラーゼの使用量が多いときは β -グルコシダーゼを用いなくとも容易に加水分解された(Table II)。したがって、この加水分解反応において酵素は、リグナン配糖体の種類により、異なる特異性を有していると考えられた。

セルラーゼは、 β -グルコシド結合を加水分解する酵素の総称であり⁽⁴⁻⁷⁾、本法にて用いたセルラーゼのうち、いずれの酵素活性が配糖体に対して有効か、今回の結果からは判断できない。現在これらの酵素活性とリグナン配糖体の加水分解の関係について検討中である。

Table III. Contents and Composition of Lignans from Sesame Seed by Hydrolysis of Cellulase and β -Glucosidase

Sample No.	Composition				Contents (mg/100g sesame seed)
	Pinoresinol	P-1	Sesamolinal	Sesaminol	
A	16.3	10.6	11.6	61.5	156.3
B	22.2	12.6	17.6	47.5	105.8
C	18.5	9.6	15.8	56.1	166.0
D	24.4	8.1	30.0	37.4	110.5
E	23.1	8.1	30.5	38.3	110.5

One gram of the mixture of lignan glycosides extracted from each sesame seed were incubated with 700mg cellulase, 200mg β -glucosidase and 20mM acetate buffer (pH 4.5) for 24h at 50°C.

5. ゴマ種子からのリグナン類の生成

本法に従い、種々のロットのゴマ種子から生成したリグナン類の組成および含有量を調べた (Table III). ロットにより若干その生成量および組成が異なるものの4種のリグナン類の合計は、100~170 mg/100 g であり、いずれもセサミノールが主成分であった。

要 旨

(1) ゴマ種子中に存在するリグナン配糖体の加水分解に関して、7種のグルコシド結合の加水分解酵素を用いて10通りの組合せで検討を行ったところ、セルラーゼと β -グルコシダーゼを併用する方法が有効であり、最も多量のリグナン類を得るためには、粗リグナン配糖体画分に対して、セルラーゼ 70% (wt/wt), β -グルコシダーゼ 20% (wt/wt) 以上添加することが必要であった。

(2) 本法における、至適条件は、pH 4.5~5.0, 50°C で 20 h 以上の加温であった。

(3) セサミノール配糖体の加水分解は、セルラーゼによるセサミノールトリグルコシドからジまたはモノ

グルコシドへの変換と β -グルコシダーゼによるジまたはモノグルコシドからセサミノールへの変換の2段階からなっており、その他のリグナン配糖体の加水分解と異なっていた。

(4) 本法に従い、ゴマ種子中のリグナン配糖体の加水分解で得た4種のリグナン類の生成量は、種子のロットによって多少の差異があるものの種子 100 g 当たり 100~170 mg であり、いずれもセサミノールが主成分であった。

- (1) 並木満夫, 小林貞作:「ごまの科学」, 朝倉書店, 東京, 1989, pp.168—189.
- (2) 大澤俊彦:食品工業, 35, 21—29 (1992).
- (3) H. Katsuzaki, M. Kawasumi, S. Kawakishi, and T. Osawa: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2087—2088 (1992).
- (4) S. P. Shoemaker and R. D. Brown: *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 133—146 (1978).
- (5) S. P. Shoemaker and R. D. Brown: *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 147—161 (1978).
- (6) 岡田巖太郎:化学と生物, 23, 14—22 (1985).
- (7) 村尾沢夫, 荒井基夫, 阪本禮一郎:「セルラーゼ」, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1987, pp. 76—89.