仙草多糖類の構成糖

志村晃一, 平澤マキ, 清水章子, 村 清司,
徳江千代子[§], 荒井綜一

東京農業大学応用生物科学部栄養科学科

Analysis of Constituent Sugars in a Polysaccharide of
Hsian-tsao, *Mesona procumbens* Hemsl

Koichi Shimura, Maki Hirasawa, Akiko Shimizu,
Kiyoshi Mura, Chiyoko Tokue[§] and Soichi Arai

Department of Nutritional Science, Faculty of Applied
Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The polysaccharide of Hsian-tsao (HTP), *Mesona procumbens* Hemsl., does not itself form a gel, but induces gel formation in the presence of added starch, although the mechanism is still unclear. To understand the effect of a HTP on gel formation, we investigated its constituent sugars by methylation analysis. HTP was found to consist of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose, and galacturonic acid. Although methylation may not have proceeded to completion, rhamnose was found as 2-O-, 3-O-, and 4-O-methyl derivatives. Incomplete methylation suggests that HTP has a compact conformation of high heterogeneity.

(Received Oct. 5, 2006 ; Accepted Jan. 27, 2007)

Keywords : Hsian-tsao, polysaccharide, gel, methylation analysis, constituent sugars

キーワード : 仙草, 多糖類, ゲル, メチル化分析, 構成糖

食品ハイドロゲルは, 素材の力学的物性や官能特性を改善する役割を持ち, 食品分野で広く利用されている¹⁾. 食品ゲルの構成成分として多糖類, 例えばデンプンやペクチンなどがあり, それぞれ異なる物性を示し, 用途に合わせて利用されている. デンプンを混合することでゲルを形成し, これまでになかった食感を作り出す改良剤として注目を浴びているものに仙草多糖類がある.

仙草 (*Mesona procumbens* Hemsl) はシソ科の双子葉植物である. 台湾では, 乾燥したその茎葉を水で煎じたものが暑気あたり, 高血圧, 筋肉痛や関節痛解消などの薬として利用されている²⁾. 食品物性学的に興味深いのは, この煎汁にタピオカデンプンを加えて糊化し, 冷却すると褐色の寒天様ゲルとなる点である. 現地ではこれをポピュラーなデザートとして愛用しているという. 食品加工学的に関

心を引くのは, 仙草抽出液単独ではゲル化しないにもかかわらず, デンプンを加えて加熱糊化すると強いゲルを形成する現象である. クライオ走査顕微鏡で仙草ゲルの切断面を観察したところ, 膨潤・変形したデンプン粒の表面を薄膜が覆っていることからデンプンと仙草多糖類の間で特殊なゲルが形成されると考えられている³⁾. ゲル化の詳しい機構については不明であって, これを解明する上で, 仙草多糖類の構造を解析することは非常に重要である. そこで本研究では, ゲル強化に関与すると考えられる仙草多糖類の構成糖の分析を行った.

1. 実験方法

(1) 仙草多糖類の抽出

株全体を5~7日自然乾燥させた仙草を台湾省新竹県関西鎮農会から取り寄せた. 仙草多糖類の抽出は堀内らの方法²⁾に準じて行った. すなわち, 仙草の葉20gに5%炭酸水素ナトリウム200mlを加え, 湯煎で80℃, 4時間抽出し, ガーゼで濾過した. 濾液を遠心分離(5000rpm, 10min)し, 上清を2日間透析して低分子物質を除去した. 透析内液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し, エタノールを75%(w/w)になるよう, 攪拌しながら加えた. これを24時間放置した後, 生じた沈殿を遠心分離(5000rpm, 10min)により回収し, 凍結乾燥した. これを仙草多糖類(hsian-tsao polysaccharide extraction: HTP)とした. 粗HTPを蒸留水に溶解(5g/L)し, 分画分子量20万の限外濾過膜(Q2000 076E, 東洋濾紙)を用いて洗浄(攪拌型ウルトラホルダー: UHP-76K, 東洋濾紙, 窒素圧: 0.2MPa)を4回行い, ふるい上を凍結乾燥した. その粗タンパク質含量は2.66%(乾物基準)であった.

(2) 仙草多糖類の構成糖の分析

限外濾過法を4回行って得た試料を用いて仙草多糖類の構成糖の分析を行った. すなわち, 試料20mgに対し, 1.5Nトリフルオロ酢酸を2ml加え, 100℃で6時間加水分解した. 酸を除去した後, ピリジン1mlを加え, この溶液0.2mlに対して, TMS化剤(TMS-HT, 東京化成工業)を1ml加え, 80℃, 3分間定温放置しTMS化⁴⁾を行いガスクロマトグラフィー(GC)により分析した. すなわち, 島津GC-1700を用い, キャピラリーカラム: SPTM-2380(30m×0.25mm膜厚0.2μm SUPELCO), カラム温度: 120℃-180℃(5℃/min, 上昇), 試料気化室温度: 280℃, 検出温度: 280℃, スプリット比: 1:92, キャリヤーガスN₂: 1.6ml/minで分析を行った. 標準品の相対保持時間と比較し構成糖の推定をし, その組成比をクロマトパック(C-R8A, 島津)で3回繰り返して, 平均値を求めた.

(3) 仙草多糖類の分画

この4回精製粉末を0.1M塩化ナトリウムに溶解(5g/L)し, 遠心分離(15000rpm, 10min)をした. 上清を濾紙(No. 5B, 東洋濾紙)を用いて濾過し, 濾液9mlをLaiら⁵⁾の方法に基づき, ゲル濾過(Toyopearl HW-65 2.6×96

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), ctokue@nodai.ac.jp

Fig. 1 Two major fractions A and B obtained by gel filtration chromatography of hsian-tsao polysaccharide

A : fraction A.

B : fraction B.

cm, 東ソー) を行った。溶出液 : 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液, 溶出 : 流速, 1 ml/min ; 分画 4 ml で行い, フェノール硫酸法⁶⁾により分析し, 仙草多糖類を2つ(AとB)に分画した (Fig. 1)。

(4) メチル化分析

1) メチル化

試料 A より 3.3 mg, 試料 B より 3.5 mg をそれぞれリアクティブバイアルに採取して完全メチル化を行った。まず五酸化二リン中一晩乾燥させ, 乾燥した試料が入った反応溶液にジメチルスルホキシド 0.6 ml 添加し, 2 時間攪拌した。ついで粉末水酸化ナトリウム 20 mg とヨウ化メチル 0.15 ml を添加し, 30 分間攪拌した。この反応試料にクロロホルム 1 ml を用いて, 完全メチル化多糖類の抽出を2回行った。その後, 超純水 2 ml を加え, 洗浄を7回行った。クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム 1 g を添加し, 室温で1時間脱水処理を行った。クロロホルム層を濾過し, さらに濾液を乾固し, これを完全メチル画分とした。

2) ガスクロマトグラフィー-質量分析法

加水分解用チューブに乾固した完全メチル画分を用い, 以下に示した方法でメチル化分析を実施した。まず, 反応試料に 90% ギ酸 0.5 ml を添加し, 100℃で2時間加水分解した。減圧乾固を行った後, 2 N トリフルオロ酢酸 0.5 ml を添加し, 100℃, 6 時間加水分解を行い, 再び減圧乾固した。この残渣を少量の超純水で3回洗浄後, 1% 水素化ホウ素ナトリウム 0.5 ml を添加し, 室温で一晩放置した。その後, 酢酸で過剰の NaBH₄ を分解し, 減圧乾固した。残渣をメタノール 2 ml で5回洗浄し, 減圧乾固した後, 無水酢酸・ピリジン (1 : 1) を 0.5 ml 添加し, 100℃で1時間加熱し, 乾固した。残渣にクロロホルム 1 ml 添加し, 抽出を行った。更に超純水 1 ml を混和し, 洗浄を5回行った。ク

ロロホルム層に無水硫酸ナトリウム 1 g 添加し, 室温で1時間脱水処理を行った。クロロホルム層を濾過, 乾固し, 残渣を再びクロロホルムに溶解した。試料 A は 100 μl, 試料 B は 30 μl のクロロホルムで溶解した。これを GC およびガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS) で測定した。GC 測定条件は, 装置 : Hewlett-Packard HP5890, カラム : SPB-5 (スぺルコジャパン) ; タイプ : fused silica capillary 30 m × 0.25 mm I.D., キャリヤガス : He, カラム温度 : 60℃ (1 min) - 280℃ (8℃/min, 上昇), 注入口温度 : 280℃, 検出モード : FID, 検出器温度 : 280℃, 注入量 : 1 μl, 注入モード : split less で行った。電子衝撃法ガスクロマトグラフ-質量分析法 (EI-GC/MS) の測定条件は, 装置 : 質量分析計 ; 日本電子 JSM DX-303, ガスクロマトグラフ ; Hewlett-Packard HP5890A, データ処理 : 日本電子 JMA DA50000 である。GC 部は上述と同様であり, MS 部においては, イオン化方式 : 電子衝撃法, 電子加速電圧 : 70 V, イオン化電流 : 300 μA, イオン化温度 : 250℃, イオン化加速電圧 : 3.0 KV, 走査速度 : 1 sec/scan (m/z 35 ~ 500), 走査間隔 : 1 秒の条件で測定した。

ガスクロマトグラムの各ピークの面積から部分メチル化アルジトールアセテートの組成比を求め, マススペクトルを部分メチル化アルジトールアセテートの標準マススペクトル⁷⁾と照らし合わせるにより, クロマトグラム上の主要なピークを同定した。

2. 実験結果および考察

仙草の葉 20 g から得られる HTP 凍結乾燥物の収量は 1.45 g であった。さらにこれを4回限外ろ過膜ふるい上の収量は 0.81 g であった。

限外濾過膜で4回分画した仙草多糖類をガスクロマトグラフィーで測定した結果, 構成糖としてはラムノースが最も多く (12.9%), ついでガラクトン酸 (12.3%), グルコース (9.5%), キシロース (8.7%), ガラクトース (8.2%), アラビノース (4.1%) およびマンノース (3.0%) が認められた。多糖類が少なくとも7種類の単糖で構成されることは例の少ないことである。ガラクトン酸を除き, Yang ら⁸⁾が確認した単糖と一致した。特にガラクトン酸の割合が約5%, キシロースは約3%増加し, 推定できなかった部分が約5%減少した。仙草多糖類を構成する単糖は, 少なくともラムノース, アラビノース, キシロース, マンノース, グルコース, ガラクトースおよびガラクトン酸の7種類であることが確認された。なお, 46.2%の未同定物質が存在していたが, 試料のタンパク質 (N×6.25) 含量は 2.66% であって, その他未同定成分は検出されないことから, この未同定物質は糖質であり, 未同定の原因は仙草多糖類の構造が複雑で通常の方法では完全には分析し得ないためと判断された。

一方, 仙草多糖類をゲル濾過法により分画した2つ (A および B) の画分 (Fig. 1) の収量は, A 画分 31.8 mg (分

Fig. 2 Chromatogram of methylated alditol acetates of sugar from fraction A

Peak number 1 : 2,3,5-tri-*O*-methyl arabinose or xylose, 2 : 2,3,4-tri-*O*-methyl arabinose or xylose, 3 : 2,3,4-tri-*O*-methyl rhamnose, 4 : 3,4-di-*O*-methyl arabinose or xylose, 5 : 3,4-di-*O*-methyl rhamnose, 6 : 2,4-di-*O*-methyl rhamnose, 7 : 2,3-di-*O*-methyl arabinose or xylose, 8 : 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl glucose or mannose, 9 : 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl galactose, 10 : 4-*O*-methyl rhamnose, 11 : 3-*O*-methyl rhamnose, 12 : 3,4,6-tri-*O*-methyl hexose, 13 : 2,3,6-tri-*O*-methyl hexose, 14 : 2,3,6-tri-*O*-methyl hexose, 15 : 2,4,6-tri-*O*-methyl galactose or mannose, 16 : 2,3,4-tri-*O*-methyl glucose or mannose, 17 : 2,3,4-tri-*O*-methyl galactose, 18 : 2,6-di-*O*-methyl hexose, 19 : 2,3-di-*O*-methyl hexose, 20 : 2,4-di-*O*-methyl hexose.

Fig. 3 Chromatogram of methylated alditol acetates of sugar from fraction B

Peak number 1 : 2,3,5-tri-*O*-methyl arabinose or xylose, 2 : 2,3,4-tri-*O*-methyl arabinose or xylose, 3 : 2,3,4-tri-*O*-methyl rhamnose, 4 : 3,4-di-*O*-methyl arabinose or xylose, 5 : 3,4-di-*O*-methyl rhamnose, 6 : 2,4-di-*O*-methyl rhamnose, 7 : 2,3-di-*O*-methyl arabinose or xylose, 8 : 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl glucose or mannose, 9 : 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl galactose, 10 : 2-*O*-methyl rhamnose, 11 : 3-*O*-methyl rhamnose, 12 : 3,4,6-tri-*O*-methyl hexose, 13 : 2,3,6-tri-*O*-methyl hexose, 14 : 2,3,6-tri-*O*-methyl hexose, 15 : 2,4,6-tri-*O*-methyl galactose or mannose, 16 : 2,3,4-tri-*O*-methyl glucose or mannose, 17 : 2,3,4-tri-*O*-methyl galactose, 18 : 3,6-di-*O*-methyl hexose, 19 : 2,3-di-*O*-methyl hexose, 20 : 2,4-di-*O*-methyl hexose.

子量 ; 約 38000), B 画分 30.6 mg (分子量 ; 16000 以下) であった。それぞれをメチル化分析し、結果は Fig. 2 および Fig. 3 に示した。末端部分と考えられるメチル化糖は、A, B 画分ともに 2, 3, 5-トリ-*O*-メチルアラビノース (またはキシロース, いずれもフラノース構造), 2, 3, 4-トリ-*O*-メチルアラビノース (またはキシロース, いずれもピラノース構造), 2, 3, 4-トリ-*O*-メチルラムノース, 2, 3, 4, 6-テトラ-*O*-メチルグルコース (またはマンノース) および 2, 3, 4, 6-テトラ-*O*-メチルガラクトースであった。ウロン酸の分子種は同定できなかった。多分ヘテロ構造のためメチル化は完全には進行していないと考えられる。

今後は、仙草多糖類のこうしたコンパクトなヘテロ構造の解析に適した分析法を開発し、その構成糖の全体像を解明したい。

3. 要 約

仙草多糖類の構成糖は少なくともラムノース, アラビノース, キシロース, マンノース, グルコース, ガラクトースおよびガラクトツロン酸の 7 種類であると考えられた。また, メチル化分析により A, B 画分ともに 2, 3, 5-トリ-*O*-メチルアラビノース (またはキシロース, いずれもフラノース構造), 2, 3, 4-トリ-*O*-メチルアラビノース (またはキシロース, いずれもピラノース構造), 2, 3, 4-トリ-*O*-メ

チルラムノース, 2, 3, 4, 6-テトラ-*O*-メチルグルコース (またはマンノース) および 2, 3, 4, 6-テトラ-*O*-メチルガラクトースが同定された。

本研究を行うにあたり、試料提供をしてくださった台湾省新竹県関西鎮農会に感謝する。

文 献

- 1) 吉村美紀, 食品混合ゲル, 日調科誌, **34**, 424-431 (2001).
- 2) 堀内久弥, 張 璟芳, 高橋由利子, 村 清司, 徳江千代子, 仙草 (*Mesona procumbens* Hemsl.) 水抽出物を加えたデンプン糊のゲル化現象, 食科工, **47**, 509-515 (2000).
- 3) 堀内久弥, 高橋由利子, 張 璟芳, 村 清司, 徳江千代子, 相良康重, 木村利明, 仙草水抽出物とデンプンとのゲルの弾性率の温度依存性, 食科工, **48**, 176-181 (2001).
- 4) 中村道徳, 貝沼圭二, 生物化学実験法 19「澱粉・関連糖質実験法」, 第2版 (学会出版センター, 東京), pp 244-246 (1989).
- 5) L.S. Lai and H.F. Chiang., Rheology of decolorized hsiantso leaf gum in the dilute domain, *Food Hydrocolloids*, **16**, 427-440 (2002).
- 6) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 7) 日本生化学会編, 「生化学データブック I」, (東京化学同

-
- 人, 東京), pp. 606-659 (1979).
8) Yang, C.C. and Huang, S.H., The gel-forming properties and chemical compositions of the gums extracted from leaf, stem and root of the hsian-tsao herb (*Mesona procumbens* Hemsl.), *Food Science* (Chinese), **17**, 260-265 (1990).
(平成 18 年 10 月 5 日受付, 平成 19 年 1 月 27 日受理)
-