落花生殻に含まれるキシログルカンの オリゴ糖分析[†]

加藤陽治*・野呂 治**・東 康夫**

Analysis of the Oligosaccharides of Xyloglucan in Peanut Hulls

(Studies on Production of Fucose-containing
Xyloglucan Oligosaccharide Part II)

Yoji KATO* Osamu NORO** and Yasuo AZUMA**

*Laboratory of Food Science, Faculty of Education,
Hirotsuki University, 1 Bunkyo-cho, Hirotsuki,
Aomori 036-8560

**Development Department, Tohoku Chemical Co.,
3-1 Kanda 1-chome, Hirotsuki, Aomori 036-8061

To obtain fundamental information on the production of fucose-containing xyloglucan oligosaccharides from peanut hulls by hydrolysis with industrial enzyme preparations, we have studied the structure of the oligosaccharide units of xyloglucan in peanut hulls. The oligosaccharide units of xyloglucan in peanut hulls were XXXG, XXLG, XLXG, XXFG, XLFG, and XLFG [where each (4)- β -linked D-glucosyl residue in the backbone is given a one-letter code according to its substituents: G= β -D-Glc; X= α -D-Xyl-(6 β)- β -D-Glc; L= β -D-Gal-(2)- α -D-Xyl-(6 β)- β -D-Glc; F= α -L-Fuc-(2)- β -D-Gal-(2)- α -D-Xyl-(6 β)- β -D-Glc] in an approximate molar ratio of 33:4:5:25:6:27. An industrial hemicellulase preparation, Cellulosin T2, was found to be an appropriate enzyme source for producing xyloglucan oligosaccharides from peanut hull polysaccharides.

(Received Jan. 17, 2000; Accepted Mar. 15, 2000)

近年、さまざまな機能をもつオリゴ糖が開発され、種々の食品に利用されている¹⁾。しかし、植物細胞壁構成多糖に由来するものは数が少ない²⁾⁻⁴⁾。われわれは、植物細胞壁構成多糖のなかでもヘテロ多糖に注目し、そ

れに由来するオリゴ糖の大量調製法の検討およびその生理活性検索を行っている⁵⁾。

前報⁵⁾では、豆腐製造時の副産物であるおからの有効利用も考え、おからへミセルロースよりキシログルカンのオリゴ糖調製について基礎的な検討を加えた。今回は落花生殻を用いて、殻構成多糖中のキシログルカンの構造について構成するオリゴ糖レベルで検討したので、その結果について報告する。

実験材料及び方法

(1) 落花生殻より多糖の抽出

市販殻付き落花生から得た殻(188.4g)を0.5lの蒸留水とともにホモゲナイザーで磨砕し、これに1.0lの24%水酸化カリウム溶液を加え、24時間、室温にて攪拌した。これを東洋濾紙No.2で濾過し、濾液を得た。残渣に1.0lの24%水酸化カリウムを加え室温にて24時間攪拌し、同様に濾過し濾液を得た。この残渣について24%水酸化カリウム抽出操作を繰り返した。最終残渣は酢酸と蒸留水で順次洗浄し風乾した(収量:163.9g)。それぞれの濾液を合わせ、4倍量のメタノールを加え、生じた沈澱を遠心操作(5000rpm, 30分)にて集めた。これを水に溶解し脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥し落花生殻多糖(PHP)6134mgを得た。

(2) 構成糖分析

各試料を酸で加水分解し、分解物中の中性単糖はアルジートルトリフルオロアセテートとした後、ガスクロマトグラフィーで定量した⁶⁾。酸性糖量は加水分解試料液から適量とりカルバゾール・硫酸法⁷⁾にてガラクトン酸相当量として求めた。

(3) キシログルカンの定量

緑豆キシログルカンを標準キシログルカンとしてヨード法にて定量した⁸⁾。

(4) オリゴ糖の分析

パルスドアンペロメトリー検出器(金電極)付きの日本ダイオネックス社のイオンクロマトDX-300による陰イオンクロマトグラフィー(以下HPAEC-PAD)で行った⁹⁾。

標準キシログルカンオリゴ糖はXG, XX, LG, FG, XXG, LXG, LLG, XXXG, LFG, XLXG, XXLG, XLFG, XXFGおよびXLFGである⁹⁾。これらキシログルカンオリゴ糖の表記法はFryら¹⁰⁾によって提唱されたもので、主鎖の各(1→4) β -結合のグルコース残基の分岐様式によっ

[†] フコース含有キシログルカンオリゴ糖の製造に関する研究(第2報)(前報, 文献5))

* 弘前大学教育学部食物学研究室(〒036-8560 青森県弘前市文京町1)

** 東北化学薬品株式会社開発部(〒036-8061 青森県弘前市神田一丁目3-1)

て一文字コードで示され、G= β -D- グルコース、X= α -D- キシロース - (1 $\rightarrow$ 6) - β -D- グルコース、L= β -D- ガラクトース - (1 $\rightarrow$ 2) - α -D- キシロース - (1 $\rightarrow$ 6) - β -D- グルコース、F= α -L- フコース - (1 $\rightarrow$ 2) - β -D- ガラクトース - (1 $\rightarrow$ 2) - α -D- キシロース - (1 $\rightarrow$ 6) - β -D- グルコースである。さらにイソプリメベロース [α -D- キシロース - (1 $\rightarrow$ 6) - β -D- グルコース] を用いた。

(5) 落花生殻のキシログルカンを構成するオリゴ糖の分析

PHP (800 μ g/ml 20 mM 酢酸緩衝液) に *Penicillium* sp. M451 由来の精製キシログルカナナーゼ 5 μ l を加え、40 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた。反応液の一部を採り HPAEC-PAD 分析を行った。反応液の一部 (0.5 ml) に *Eupenicillium* sp. M9 由来の精製イソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素 2 μ l を加えさらに 40 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させ、反応物の HPAEC-PAD 分析を行った⁵⁾⁹⁾。

(6) PHP の市販粗酵素標品による加水分解

(株)阪急バイオインダストリーのセルロシン PE 60 (ペクチナーゼ, *Aspergillus niger*, 600 000 単位/g)、セルロシン TP 25 (キシラナーゼ, *Trichoderma viride*, 25 000 単位/g)、セルロシン HC 100 (キシラナーゼ, *A. niger*, 1 000 単位/g) 及びセルロシン T 2 (セルラーゼ, *T. viride*, 6 000 単位/g) を用いた。ペクチナーゼ標品はヘミセルラーゼやセルラーゼを、セルラーゼ標品はヘミセルラーゼやペクチナーゼを、キシラナーゼ標品はセルラーゼなどを有している。セルラーゼ及びキシラナーゼの力価は、CMC (pH 4.2) 及びアラビノキシラン (pH 3.5) をそれぞれ基質とし、40 $^{\circ}$ C、1 分間に 1 μ mol のグルコースに相当する還元力の増加をもたらす酵素量が 1 単位である。また、ペクチナーゼ力価はリンゴ果汁 (pH 3.5) 25 ml を基質とし、45 $^{\circ}$ C、1 時間で含まれるペクチンを分解する酵素量が 30 単位である (阪急バイオインダストリー株式会社酵素製剤販売カタログ)。

PHP (それぞれ 30 mg/5 ml の 50 mM 酢酸緩衝液, pH 5.5) に各種酵素 0.2 mg を加え、表面をトルエンで覆い、40 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた。反応液を沸騰湯浴中で 10 分間加熱し、冷却後、Bio-Gel P-2 のカラム (1.8 $\times$ 44 cm) にのせ、蒸留水にて溶出した。溶出液は 2 ml ずつ集め、フェノール・硫酸法¹¹⁾にて糖量を測定した。試験管番号 16 $\sim$ 21, 22 $\sim$ 30 および 31 $\sim$ 41 をそれぞれまとめ、画分 I、II および III とした。画分 II を構成糖分析と HPAEC-PAD 分析に供した。

(7) PHP からオリゴ糖の調製

PHP (2.514 g/500 ml 20 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5) にセルロシン T 2 (17 mg) を加え、表面をトルエンで覆い 40 $^{\circ}$ C で反応させた。反応 30 時間後、反応液の一部を採りヨウ素呈色反応⁸⁾によりキシログルカン多糖が低分子化されたことを確認し、沸騰湯浴中で 10 分間加熱し、酵素を失活させた。これを約 100 ml まで濃縮し、300 ml のメタノールを加えた。遠心上清を濃縮乾固し 30 ml の水に溶解し、10 ml ずつ 3 回にわけ、Bio-Gel P-2 のカラム (5.0 $\times$ 66 cm) にのせ、蒸留水で室温にて溶出した。溶出液は 10 ml ずつ集め、フェノール・硫酸法¹¹⁾にて糖の定量を行った。3 回のクロマトグラフィーで得た七糖、八糖、九糖および十糖に相当する画分を集め濃縮乾固させた。それぞれ 1 ml の蒸留水に溶解し、Bio-Gel P-2 のカラム (2.3 $\times$ 140 cm) にのせ、蒸留水で 50 $^{\circ}$ C にて溶出した。溶出液は 4.4 ml ずつ集め、糖の定量を行った。それぞれの画分が均一のピークを与えるまで再クロマトを繰り返した。最終的に得られた試料は凍結乾燥した。

実験結果及び考察

(1) 落花生殻に含まれるキシログルカンの構造

落花生殻より 24% 水酸化カリウムで多糖 (落花生殻多糖, PHP) を抽出した。得られた PHP の糖含有率は約 61% で、糖組成はウロン酸 : ラムノース : フコース : 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 = 28.4 : 4.9 : 1.9 : 7.2 : 29.6 : 3.5 : 15.4 : 9.0 であった。ヨード法によりキシログルカン量を調べると、PHP 重量の約 12% で、PHP 全糖量の約 20% であった。キシログルカンは落花生殻に約 0.4% 含まれることがわかった。

PHP 標品中に含まれるキシログルカンを構成しているオリゴ糖単位を調べた。すなわち、キシログルカンに特異的に作用する精製 M 451 キシログルカナナーゼで PHP を加水分解し、その一部をさらに M 9 イソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素で加水分解した。両加水分解物を HPAEC-PAD 分析に供し、標準キシログルカンオリゴ糖との溶出位置からそれぞれのオリゴ糖の同定と定量を行った。PHP に含まれるキシログルカンは XXXG : XXLG : XLXG : XXFG : XLLG : XLFG = 33 : 4 : 5 : 25 : 6 : 27 で構成されており、フコース含有オリゴ糖が約 52% 占めることがわかった。

(2) PHP よりフコース含有オリゴ糖の調製

まず、フコース含有キシログルカンオリゴ糖調製のための酵素検索のため、市販粗酵素標品 4 種類を用いて、PHP に対する作用様式を調べた。PHP (30 mg) をセル

ロシン PE 60, TP 25, HC 100 および T2 でそれぞれ加水分解し, 各分解物を Bio-Gel P-2 のカラムクロマトグラフィーに供した. 画分 I (ボイドボリューム画分), 画分 II (分子量約 990~2000) および画分 III (単糖~五糖溶出画分) に分け, その収量 (mg, グルコース相当量) 比を求めると, PE 60 で 8.3:2.5:6.0, TP 25 で 8.3:3.5:6.8, HC 100 で 9.0:3.8:4.8, T2 で 9.8:3.5:6.3 であった. キシログルカンオリゴ糖が含まれる画分 II の構成糖を調べると, グルコース, キシロース, ガラクトース, アラビノースおよびフコースの比率は, PE 60 では 56:28:12:4:0, TP 25 では 56:33:8:1:3, HC 100 では 58:33:5:2:2, T2 では 54:34:8:0:4 であった. T2 以外の酵素加水分解物にはアラビノースが含まれておりキシログルカンオリゴ糖以外にアラビノースを含むオリゴ糖なども含まれていることが示唆された. さらに, それぞれの画分 II に含まれるオリゴ糖のなかでキシログルカンに由来するオリゴ糖 (XXXG~XLFG) の占める割合を HPAEC-PAD で調べると, PE 60 で 40%, TP 25 で 46%, HC 100 で 63%, T2 で 70% であり, キシログルカンオリゴ糖以外のオリゴ糖生成が一番少ないのが T2 加水分解物であることがわかった. これらの結果より, 落花生殻多糖標品 (PHP) からのフコース含有キシログルカンオリゴ糖調製にはセルロシン T2 が適していると判断した.

そこで, つぎに PHP (乾燥重量 2.514 g, 約 300 mg のキシログルカンを含む) を市販粗酵素標品セルロシン T2 により加水分解し, 分解物を Bio-Gel P-2 のカラムクロマトによる分画に供した (Fig. 1). 七糖から十糖 (XXXG~XLFG) 相当画分の再クロマトを繰り返し, 最終的に分子量的に均一な標品を得た. 収量は七糖画分が 41.8 mg, 八糖画分が 12.4 mg, 九糖画分が 36.0 mg, および十糖画分が 30.4 mg であった. キシログルカン多糖の約 40% を精製オリゴ糖として得ることができた. 九糖画分には XXFG と XLLG が含まれているので, 目的九糖 (XXFG) とフコースを含まない XLLG との分離方法の確立が課題である.

われわれはこれまでに農産廃棄物のビートパルプ¹²⁾ およびおから⁵⁾ に含まれるキシログルカンの構造解析を行い, ビートパルプ中のキシログルカンは XXXG:XXLG:XLXG:XXFG:XLLG:XLFG=44:1:3:25:1:26 で, おからのそれは 33:2:4:27:3:31 であることを報告した. 落花生殻のそれは 33:4:5:25:6:27 であるので, これら農産廃棄物中のキシログルカン多糖を構成するフコース含有オリゴ糖は約 50~60%

Fig. 1 Resolution by gel-filtration on Bio-Gel P-2 of the Cellulosin T2 hydrolyzates of peanut hull polysaccharides (PHP)

Arrows BD, 10, 9, 7, and G indicate the elution positions of blue dextran, deca-(10), nona-(9), and hepta-(7) saccharides, and glucose.

であることがわかった. いずれもフコース含有キシログルカンオリゴ糖調製の素材になりうると判断された. また, オリゴ糖生成の際に使用する酵素として, 市販のセルロシン T2 がおからと落花生殻のいずれの場合でも共存多糖を加水分解する酵素活性が少なく目的オリゴ糖生産の際の有効酵素の一つであると考えた.

要 約

フコース含有キシログルカンオリゴ糖を生産するための基礎的知見を得るために, 落花生殻多糖標品中のキシログルカンの構成オリゴ糖単位の構造解析および落花生殻多糖標品に対する市販酵素標品の加水分解機構を調べた. 落花生殻に含まれるキシログルカン量は殻重量の約 0.4% であった. 落花生殻キシログルカンを構成するオリゴ糖単位は, XXXG, XXLG, XLXG, XXFG, XLLG および XLFG で, そのモル比は 33:4:5:25:6:27 であった. また, 工業用ヘミセルラーゼ酵素標品セルロシン T2 が落花生殻多糖標品からキシログルカンオリゴ糖

を生産するのに有効な酵素の一つであることがわかった。

精製キシログルカナーゼとイソプリメベロース生成酵素を分与下さいました工業技術院生命工学工業技術研究所の三石安氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 橋本 仁・藤田孝輝：*Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, No. 178, 29 (1998).
- 2) 藤川茂昭・岡崎昌子・松元信也・古賀邦正：澱粉科学, **37**, 69 (1990).
- 3) 市田淳治・山口信哉・櫛引正剛・小野浩之・花松憲光・松江 一・奥野智旦・宮入一夫・風晴浩一：食品工業, **39**, 60 (1996).
- 4) 山本 忠・高橋 亨・大谷民子：岩手県工業技術センター研究報告, 第1号, 67 (1995).
- 5) 加藤陽治・小西照子：食科工, **46**, 758 (1999).
- 6) KATO, Y., ITO, S., IKI, K. and MATSUDA, K. : *Plant Cell Physiol.*, **23**, 351 (1982).
- 7) BITTER, T. and MUIR, H.M. : *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 8) KATO, Y. and MATSUDA, K. : *Plant Cell Physiol.*, **18**, 1089 (1977).
- 9) KONISHI, T., MITSUISHI, Y. and KATO, Y. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2421 (1998).
- 10) FRY, S.C., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLACHLAN, G.A., MCNEIL, M., MORT, A. J., REID, J. S. G., SEITZ, H. U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A.G.J. and WHITE, A.R. : *Physiol. Plant.*, **89**, 1 (1993).
- 11) DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 12) KATO, Y. and KOBAYASHI, M. : *J. Appl. Glycosci.*, **47**, 45 (2000).

(平成12年1月17日受付, 平成12年3月15日受理)