Absidia corymbifera を利用したゴマ脱脂
粕中に含まれるセサミノール配糖体の
セサミノールへの変換

宮原由行*・勝崎裕隆**・今井邦雄**・小宮孝志**

Conversion of Sesaminol Trigluconide in
Defatted Sesame Seed into Sesaminol
Using the Fungal Metabolism by
Absidia corymbifera

Yoshiyuki MIYAHARA*, Hirotaka KATSUZAKI**,
Kunio IMAI** and Takashi KOMIYA**

*Kuki sangyo Co., Ltd., 11, Onoue-cho, Yokkaichi-shi,
Mie 510-0059

**Faculty of Bioresources, Mie University, 1515,
Kamihama-cho, Tsu-shi, Mie 514-8507

A fungus was grown in the wetted defatted sesame seed at room temperature. In the visual observation, the colony of the fungus was white and wooly, and in the microscopic observation, its sporangiophore was colorless and branched. Based on these observations, we identified the fungus as *Absidia corymbifera*. The amount of sesaminol trigluconide included in the defatted sesame seed decreased largely by the incubation of this fungus for 84h and then, sesaminol that has antioxidative activity was produced largely. Amounts of sesamin and sesamolin included in the defatted sesame seed did not change by the incubation for 24 h. As the results, we could clarify sesaminol trigluconide was converted into sesaminol using the fungal metabolism by *Absidia corymbifera*.

(Received Oct. 30, 2000 ; Accepted Feb. 5, 2001)

ゴマ脱脂粕はゴマ油の製造時に産出される廃棄物であるが、リグナン類やリグナン配糖体類など有用な成分が含まれており、その利用法開発が期待されている。

本研究は、微生物代謝を利用してゴマ脱脂粕から有用物質を調製する手法の開発を目的として菌類の採集と同定から開始した。採取・同定したカビ *Absidia cor-*

ymbifera をゴマ脱脂粕に接種培養し、リグナン関連化合物の含量変化を HPLC 分析したところ、培養前の主成分の一つセサミノールトリグルコシドが培養後にほぼ消失し、代わりに抗酸化性¹⁾の期待できるセサミノールが生産されていることが明らかとなった。本報では、ゴマ脱脂粕に生育した微生物の同定と、微生物培養時に生ずるゴマ脱脂粕に含まれるリグナン関連化合物の消長およびセサミノールの調製について報告する。

1. 実験方法

(1) 試料および試葉

ゴマ脱脂粕はゴマを焙煎した後、圧搾処理したものを使用した。試葉は全て特級品を用いた。

(2) 微生物の同定

加湿したゴマ脱脂粕を実験室内に放置して、微生物を生育させた。ゴマ脱脂粕上にほぼ単一の菌が生育したため、その菌体を寒天培地上に移し、単離した。菌体の同定は、コロニーの外見および顕微鏡観察による形態の特徴から文献²⁾³⁾を参考にして同定した。

(3) 菌体の液体培養とゴマ脱脂粕の代謝分解

(2)で単離、同定した *A. corymbifera* は酵母エキス-麦芽エキス培地 (0.3% 酵母エキス, 0.3% 麦芽エキス, 0.5% ポリペプトン, 0.5% グルコース) 200 ml の入った三角フラスコに接種し、30℃で24時間振盪培養した。24時間培養後に遠心分離 (3000 rpm, 20 分) して菌体を全て集めた。

培地 200 ml 中で培養して集めた菌体全てとゴマ脱脂粕 10 g を蒸留水 200 ml の入った三角フラスコ内に加え、30℃で振盪培養した。84時間後、遠心分離 (3000 rpm, 20 分) して沈殿物を集め、100 ml のメタノールで抽出した。このメタノール抽出物と微生物培養前のゴマ脱脂粕メタノール抽出物を、以下の条件で HPLC 分析し、リグナン関連化合物の含量を比較した。

液体クロマトグラフ：日本分光 PU-980, カラム：Develosil ODS-5 (4.6×150 mm 野村化学), 移動相：A 液：水, B 液：メタノールを用い、30 分で B 液が 0% から 100% に上昇するような直線濃度勾配溶出, 流速：1 ml/min, 検出波長：280 nm.

(4) 各成分の単離・同定

上記メタノール抽出物を濃縮・乾固して得た残渣を酢酸エチルに溶解して、等量の水と分配した。酢酸エチル層を乾固後 (961 mg), メタノールに再溶解し、以下の条件の逆相 HPLC で、Fig. 1 に示す A~D の各成分を単

* 九鬼産業(株) (〒510-0059 三重県四日市市尾上町 11)

** 三重大学生物資源学部 (〒514-8507 三重県津市上浜町 1515)

離した。

液体クロマトグラフ：日本分光 PU-980，カラム：Develosil ODS-7 (8×250 mm 野村化学)，移動相：水：メタノール (35：65 v/v)，流速：3 ml/min，検出波長：280 nm。

^1H ， ^{13}C -NMR は，日本電子 JNM-A500 (500 MHz) で A は重水，その他は重クロロホルムに溶かして測定した。MS は，日立 M-80B (EI) で測定した。

2. 実験結果および考察

(1) 微生物の同定

加湿した脱脂粕から採取した本菌は，酵母エキス-麦芽エキス培地上でよく生育し，最適温度は 35 - 37℃ であった。この微生物のコロニーは白色，羊毛状であり，その胞子嚢柄は無色で分岐していた。菌糸は無隔壁性で，仮根，ほふく菌糸を形成していた。また，胞子嚢は洋梨型で，多数の胞子を内蔵しており，はじめ無色で成熟時には灰色となった。以上のような顕微鏡観察と文献²⁾³⁾とを比較した結果，本菌は接合菌類に属する *Absidia corymbifera* であると同定した。*A. corymbifera* は，空气中や土壌，穀物中に広く生育することが知られている³⁾。

(2) 単離したリグナン関連化合物の構造

本菌による代謝分解前後のゴマ脱脂粕メタノール抽出物の HPLC 分析結果を Fig. 1 に示した。クロマトグラム上の主要なピーク 4 本を A (RT: 20.0 min)，B (RT: 25.8 min)，C (RT: 27.0 min)，D (RT: 27.9 min) として，84 時間培養後のゴマ脱脂粕メタノール抽出物から単離した。各物質の ^1H ， ^{13}C -NMR および MS を測定し，文献値と比較した結果，物質 A をセサミノールトリグルコシド¹⁾，物質 C をセサミン⁶⁾，また物質 D をセサモリン⁷⁾とそれぞれ同定した。大量に生成した物質 B の ^1H -NMR スペクトルは，物質 A のアグリコン部分のセサミノールとほぼ一致しており，文献値⁵⁾⁶⁾とも一致していた (芳香族部分； δ 6.43, 6.50, 6.75, 6.75, 6.81. メチレンジオキシ部分； δ 5.86, 5.93. フロフラン環部分； δ 3.13, 3.13, 3.83, 3.86, 4.11, 4.31, 4.74, 4.74)。さらに， ^{13}C -NMR スペクトル (芳香族部分； δ 99.40, 106.10, 106.49, 108.21, 119.32, 125.03, 133.53, 134.51, 140.89, 147.16, 148.01, 150.62. メチレンジオキシ部分； δ 101.10, 101.13. フロフラン環部分； δ 52.37, 53.84, 70.58, 72.34, 85.31, 86.34) や，質量分析の結果 m/z (%) 370 (M^+ : 50), 322 (10), 204 (29), 186 (34), 149 (100) もこの構造を支持するものであった^{4)~6)}。

これら A, B, C, D の 4 種はいずれもゴマに含まれる代

Fig. 1 HPLC chromatogram of methanol extract before and after incubation.

A: Sesaminol triglucoside, B: Sesaminol, C: Sesamin, D: Sesamol

表的なリグナン類として知られている。Fig. 1 に示したように，代謝分解前のクロマトグラムを見ると，ゴマ脱脂粕の主なリグナンは，抗酸化性の知られていない⁹⁾セサミノールトリグルコシド (A)，セサミン (C) とセサモリン (D) であることが分かる。これを代謝分解後のクロマトグラムと比較すると，セサミンとセサモリンには変化が認められないが，セサミノールトリグルコシドが本菌との接触によりほぼ消失し，セサミノール (B) 含量が著しく増加していることが分かる。この結果は本菌がほぼ定量的にセサミノールトリグルコシドの糖鎖を切断し，効率よくセサミノールを与えることをうかがわせるものであった。セサミノールはゴマサラダ油中に多く含まれており，ゴマ油の酸化抵抗性の一要因とされている⁸⁾。従って，本菌によるゴマ脱脂粕の代謝分解が廃棄物から強い抗酸化機能を持つ有用物質を調製する有効な手段となる可能性を示唆できた。

(3) セサミノールトリグルコシドの微生物分解とセサミノール生産の経時変化

A. corymbifera による代謝分解が，有用なセサミノール調製の一手法となる可能性を示唆できたことから，最

Fig. 2 Amount changes of sesaminol and sesaminol triglucoside by the fungus

■ : Sesaminol triglucoside (A), ● : Sesaminol (B)

適分解時間を調べた。Fig. 2 に示した結果を見るとセサミノールトリグルコシドは代謝分解開始後 84 時間で培養前の 1/12 程度まで大きく減少し、逆にセサミノールは培養前の 4.3 倍程度に大きく増加することが判明した。培養時間をさらに延長すると原料の配糖体および生成したアグリコン共に減少していくことが分かった。従って、今回明らかにした代謝分解を用いて効率よくセサミノールを調製するには 84 時間の接触が最良の結果をもたらすことが判明した。

過去の研究においてセサミノールトリグルコシドの β -グルコシダーゼによる加水分解では、セサミノールジグルコシド、モノグルコシドへと段階的に進行するが、この酵素のみでは、初段階であるトリグルコシドからジグルコシドへの反応は遅いとしている⁴⁾。しかし、セルラーゼが共存すると、トリグルコシドがより迅速に分解されジグルコシドとなると共に、完全加水分解が進行するとしている¹⁰⁾。A. corymbifera 菌を用いた今回の実験では、アグリコンであるセサミノールが得られたことから、両酵素の共存する系が作用した可能性があると推測した。本菌体を用いる実験では、セサミノールの収量が 213 mg/100 g ゴマ脱脂粕であった。これに対し栗山らの場合には、40~60 mg/ゴマ 100 g (80~120 mg/100 g ゴマ脱脂粕) とされている。したがって菌体を用いた本方法は、極めて高効率にセサミノールを生成できた

といえる。

また、HPLC による定量分析では、ゴマ脱脂粕 100 g 中には 790 mg のセサミノールトリグルコシドが含まれていた。この結果は文献値⁹⁾と良く一致していた。Fig. 1 に示したように、セサミノールトリグルコシドのほとんどが加水分解されたが、そのうちの約 63% がセサミノールとして回収された。セサミノールの回収率が約 63% にとどまったのは、部分水解物が完全にはセサミノールへ変換されないのか、あるいは生成物が分解することによるのかも知れない。今後、この種の変換に関与する酵素群とその機能を解析すると共に、それを利用した有用物質生産へ応用していきたい。

3. 要 約

(1) ゴマ脱脂粕に生育した微生物を *Absidia corymbifera* であると同定した。

(2) ゴマ脱脂粕を本菌と接触させると原料に含まれていたセサミノールトリグルコシドが著しく減少し、抗酸化能を持つセサミノールが大量に生成する事を発見した。

(3) 生成物の経時変化解析から、セサミノールの生成は菌との接触開始 84 時間後に最大となる。

(4) セサミノール生成はセサミノールトリグルコシドの酵素触媒による脱グルコシル化によるものと推測した。

(5) 今回開発した手法によれば、100 g のゴマ脱脂粕は抗酸化性を持つ約 200 mg のセサミノールを与える。

(6) 84 時間の培養では、セサミンとセサモリンの含量は変化しなかった。

文 献

- 1) YAMASHITA, K., KAWAGOE, Y., NOHARA, Y., NAMIKI, M., OSAWA, T. and KAWAKISHI, S.: *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **43**, 445 (1990).
- 2) HESSELTINE, C.W. and ELLIS, J.J.: *Mycologia* **56**, 761 (1966).
- 3) 宇田川俊一・松田良夫: 食品菌類ハンドブック, (医歯薬出版, 東京), p. 6-7 (1984).
- 4) KATSUZAKI, H., KAWAKISHI, S. and OSAWA, T.: *Phytochemistry*, **35**, 773 (1994).
- 5) MASAYASU, N., TOSHIKO, O., MITSUO, N., YASUKO, F. and TATSUHIKO, O.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1285 (1987).
- 6) YASUKO, F., MASAYASU, N., TOSHIHIKO, O. and MITSUO, N.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 1027 (1986).
- 7) GERDA, L., OTMAR, H., GÜNTHER, B. and CHRISTOPH,

-
- K. : *Heterocycles*, **45**, 287 (1997). ラネッツ, 東京), p. 24-26 (1998).
- 8) 並木満夫・小林貞作編：ゴマの科学, (朝倉書店, 10) 栗山健一・無類井健夫：農化, **67**, 1701 (1993).
東京), p. 188-189 (1989). (平成 12 年 10 月 30 日受付, 平成 13 年 2 月 5 日受理)
- 9) 並木満夫編：ゴマ その科学と機能性, (丸善ブ
-