河川水から分離された *Klebsiella* sp. が産生する 菌体外多糖類の抗酸化性に関する研究

河 口 克 己, 里 見 弘 治, 横 山 理 雄, 石 田 祐 三 郎

(1995 年 4 月 21 日 受付)

Antioxidative Properties of an Extracellular Polysaccharide Produced by a Bacterium *Klebsiella* sp. Isolated from River Water

Katsumi Kawaguchi,*¹ Koji Satomi,*¹ Michio Yokoyama,*² and Yuzaburo Ishida*³

A polysaccharide (BS-1) produced by a bacterium *Klebsiella* sp. isolated from river water had promising properties as an emulsifier and stabilizer. The autooxidation of soybean oil in emulsion systems was studied in the presence of BS-1.

Peroxidation of the oil in the emulsion systems was inhibited by BS-1. The antioxidative effect of 0.5% BS-1 was greater than of an equal concentration of soybean lecithin and comparable to that of 0.2% ascorbic acid. BS-1 had no hydrogen-donating activity, but Fe^{2+} -binding activity was concentration-dependent; 1.2 mM Fe^{2+} was chelated to 0.25% BS-1. These results suggest that BS-1 suppresses soybean oil peroxidation by encapsulation to isolate the oil from the surrounding matter and by inactivation of metal ions such as Fe^{2+} .

キーワード: 多糖類, *Klebsiella*, 抗酸化性, エマルション, 細菌

食品に含まれる油脂の酸化は、異味や異臭の原因になるだけではなく、必須脂肪酸の変質による栄養価の低下や、細胞の老化促進、変異原および発癌物質の生成など、健康上有害な作用を及ぼす。¹⁾

これまで、油脂酸化への対応策としては、酸化に関与する酸素（活性酸素）、光、酸化酵素、金属イオンなど種々の要因に対するスカベンジャー、クエンチャー、抗酸化酵素、酵素阻害剤、キレート剤などを利用し、また、自動酸化を停止させるため、抗酸化剤、相乗剤、過酸化分解剤などを用いて連鎖反応を開始した油脂のラジカル反応を断ち、非ラジカル物質に分解したりする方法²⁾がとられている。しかし、近年消費者は合成品よりも天然物の利用を望む傾向が強いため、自然界で酸化防止性を示す物質の検索が行われ、その結果、トコフェロールなどいくつか見出されてきたが、実際に食品に応用できるものは限定されることが多い。³⁾

また、油脂を多糖類やタンパク質などの高分子で包接すると、酸化が抑制されることが知られており、⁴⁾ 油脂

をカプセル化して外部と遮断することも酸化防止の有効な手段と考えられる。

すでに報告したように、*Klebsiella* sp. がつくる多糖類 BS-1 は乳化剤および安定剤として優れた性質を示し、BS-1 のみの添加で安定な水中油系 (O/W) エマルションを得ることができた。⁵⁾ すなわち、BS-1 が油脂を包接する性質に富む可能性が考えられ、エマルション中の油脂に対してカプセル化と同様の機構による抗酸化性を示すことが期待された。

方 法

試料の調製 供試した BS-1 は前報⁶⁾に記載した方法により調製した。すなわち、3% のラクトースを基質とする培養液を用いて分離菌を培養した後、遠心分離により得られた上清に 2 倍量のエタノールを加えて多糖類を沈殿させ、これをエタノールで 2 回洗浄し、アセトンにより脱水した後、デシケーター中で乾燥させたものを試料とした。

*¹ 呉羽化学工業株式会社食品研究所 (Food Science Laboratories, Kureha Chemical Industry Co., Ltd., Hyakunin, Shinjuku, Tokyo 169, Japan).

*² 石川県農業短期大学 (Department of Food Science, Ishikawa Agricultural College, Suematsu, Nonoichi, Ishikawa, Ishikawa 921, Japan).

*³ 京都大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606, Japan).

水素供与性 水素供与性の測定は, 0.2% の BS-1, キサンタンガム (東京化成), トラガカントガム (関東化学), または 40 mM の L-アスコルビン酸ナトリウム (キシダ化学) を被検液とし, 桐ヶ谷ら⁷⁾の方法により行なった。すなわち, これらの被検液 5 ml に 0.008% の 2,2'-ジフェニル-1-ピクリルヒドラシル (DPPH) (関東化学) 50% エタノール溶液を 5 ml 添加し, 自記分光光度計 (島津, model UV-240) により 528 nm における吸光度の経時変化を調べた。

2 価鉄の吸着性 テトラメチルムレキシド (TMM) は 530 nm に極大吸収を持つ物質であるが, 2 価鉄を吸着すると, 吸収波長が 485 nm にシフトし, 485 nm における吸光度と 530 nm における吸光度の比 (A485/A530) が吸着された 2 価鉄の濃度に比例することが報告されている。^{8,9)}

この性質を利用して BS-1 の 2 価鉄に対する吸着性を Asakura *et al.*¹⁰⁾の方法を用いて評価した。すなわち, 10 mM の KCl を含む 10 mM のヘキサミン-塩酸緩衝液 (pH 10) に FeSO₄ を 1.5 mM の濃度になるように添加し, これに BS-1 を 0.05% から 0.25% まで, 濃度を変えて溶解させ, 全量を 4 ml とした。次に, 0.2 ml の 1 mM TMM (Sigma) 溶液を加え, 485 nm および 530 nm における吸光度を測定した。

また, BS-1 の 2 価鉄に対する吸着性を他の多糖類と比較するため, キサンタンガム, アラビアガム (キシダ化学), 可溶性デンプン (関東化学), グアーガム (Merck), ローカストビーンガム (Merck), カラゲニン (東京化成) およびアラビアガム由来のガラクトン (Aldrich) を上記と同様の FeSO₄ 含有緩衝液にそれぞれ 0.25% の濃度で溶解させたものについても測定を行なった。なお, 使用したカラゲニンは主に κ -タイプからなるが, κ -タイプも若干含まれている。

乳化大豆油に対する抗酸化性 各種乳化剤および安定剤を溶解させた 24 g の蒸留水に 6 g の大豆油 (関東化学) を添加して, ポリトロンホモジナイザー (Kinematica Model PT 10-35) により目盛 7 (27,000 rpm) で 1 分間攪拌し, 得られたエマルジョンを基本実験系とした。

1. 既存安定剤との比較: 基本実験系において, 1.5% の β -シクロデキストリン (CD) (和光純薬) を乳化剤とし, 0.5% の BS-1, キサンタンガムおよび可溶性デンプンを安定剤とした実験系をそれぞれ作成した。また, 安定剤の代わりに 1 mM の EDTA-Na₂ を添加した系も作成した。対照としては, 安定剤を使用せず, 乳化剤のみを添加した系を用いた。

2. 既存乳化剤との比較: 基本実験系において, 乳化剤として食品添加物であるグリセリン脂肪酸エステル

(SY グリスター・ML750; HLB=15, 坂本薬品), ショ糖脂肪酸エステル (DK エステル・F-160; HLB=15, 第一工業), ソルビタン脂肪酸エステル (ソルビタンモノオレート・Span 80, 関東化学) および BS-1 をそれぞれ 0.5% 添加し, 安定剤は加えない実験系を作成した。

3. 既存抗酸化剤との比較: 基本実験系において, 1.5% の β -CD を乳化剤とし, 0.5% の BS-1 または 0.3% のポリリン酸ナトリウム (和光純薬), 0.02% の EDTA-Na₂, 0.02% のブチルヒドロキシトルエン (BHT, 関東化学), 0.2% の L-アスコルビン酸ナトリウム, 0.02% の DL- α -トコフェロール (関東化学) などの抗酸化剤を添加した実験系をそれぞれ作成した。なお, ここで用いた抗酸化剤の添加濃度は, 食品添加物として使用されている平均的な濃度とした。¹¹⁾

4. 抗酸化性の評価: 上記の各実験系のエマルジョンを 37°C に保存し, 大豆油の経時的な酸化の進行を過酸化物質価 (POV) とチオバルビツール酸 (TBA) 法により調べた。測定にあたっては, 均一な試料を得るため, 各エマルジョンを手でよく振盪した。POV は Yamauchi *et al.*¹²⁾の方法により, クメンヒドロパーオキシド (Aldrich) を標準として求め, 油 1 kg 中のヒドロパーオキシドの等量値で示した。¹³⁾ また, TBA 値は Asakawa *et al.*¹⁴⁾の方法により, 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (TEP, Sigma) を標準として求め, 油 1 kg 中に含まれるマロンジアルデヒドの濃度として示した。

試料採取後のエマルジョンは, 次の測定日までさらに 37°C で保持した。

結果および考察

水素供与性 BS-1 の水素供与性を調べた結果, Fig. 1 に示したように, L-アスコルビン酸ナトリウムを加えた場合に見られるような DPPH の退色が BS-1 には認められず, 水素供与性はないことが分かった。また, キサンタンガムやトラガカントガムにも水素供与性はほとんど認められなかった。

Shimada *et al.*¹⁵⁾もキサンタンガムに水素供与性がないことを報告しており, ここで得られた結果を支持するものと考えられる。

2 価鉄の吸着性 2 価鉄の吸着性に対する BS-1 の濃度の影響を調べた結果, Fig. 2 に示したように, BS-1 に吸着された 2 価鉄の濃度は BS-1 の添加濃度に比例し, 0.25% では, 1.5 mM の 2 価鉄のうち 1.2 mM を吸着することが明らかになった。

また, BS-1 の 2 価鉄の吸着性を他の多糖類と比較した結果, Fig. 3 から分かるように, BS-1 がもっとも強

Fig. 1. Hydrogen-donating activities of BS-1 (●), xanthan gum (○), tragacanth gum (△), and sodium L-ascorbate (□). Final concentrations were 0.1% for polysaccharides and 20 mM for sodium L-ascorbate.

Fig. 2. Fe²⁺-binding activity of BS-1.

い吸着を示すことが明らかになった。他の多糖類の中でもカラゲニンやキサンタンガムでは比較的高い値が得られたが、BS-1には及ばなかった。また、アラビアガム（グルクロン酸含有ガラクトン）や可溶性デンプン、グアーガム（ガラクトマンナン）およびローカストビーンガム（ガラクトマンナン）では低い値しか認められなかった。さらに、アラビアガム由来のグルクロン酸を除去したガラクトンにおいては、吸着はまったく認められなかった。

グルクロン酸を含有しないアラビアガム由来のガラク

Fig. 3. Comparison of Fe²⁺-binding activity of polysaccharides.

1, BS-1; 2, xanthan gum; 3, gum arabic; 4, soluble starch; 5, guar gum; 6, locust-bean gum; 7, carrageenan; 8, galactan (derived from gum arabic). Each sample was dissolved at a concentration of 0.25% (w/v) in distilled water containing 1.5 mM FeSO₄.

タンで2価鉄の吸着性が低く、グルクロン酸を含有するガラクトンであるBS-1では¹⁶⁾吸着性が高かったことから、BS-1に含まれるグルクロン酸が吸着に関与している可能性が考えられる。カラゲニンもガラクトンであるが、硫酸基を含んでおり、そのために比較的高い吸着性が現われたものと推定される。また、キサンタンガムはグルクロン酸やピルビン酸およびアセチル基を含み、¹⁷⁾これらのカルボキシル基やピルビル基およびアセチル基が吸着に寄与したものと思われる。Shimada *et al.*¹⁵⁾も脱アセチル処理したキサンタンガムの抗酸化性を調べ、アセチル化度が高い場合に抗酸化性が大きかったことを報告している。一方、アラビアガムもグルクロン酸を含むガラクトンである¹⁸⁾が、この多糖類では2価鉄の吸着性がわずかに認められる程度であった。

したがって、2価鉄の吸着性を左右するのはこれら官能基の存在だけではなく、官能基の含有量や多糖類の立体構造も関与しているものと思われる。

乳化大豆油に対する抗酸化性 1. 既存安定剤との比較：基本実験系において、β-CDを乳化剤とし、BS-1、キサンタンガム、または可溶性デンプンを安定剤として作成したエマルジョン（大豆油：水=2：8）を37°Cに保存し、50日間にわたってPOVとTBA値の経時変化を調べ、油の酸化の進行程度を比較した。その結果、Fig. 4に示したように、β-CDのみを加えた系においては、保存期間の経過に伴ってPOVおよびTBA値がと

Fig. 4. Effects of emulsifiers and polysaccharides or EDTA disodium salt on the autooxidation of soybean oil in the aqueous emulsion system.

×, CD; ●, CD+BS-1; Δ, CD+soluble starch; ○, CD+xanthan gum, □, CD+EDTA disodium salt.

もに増加し、50日目にはそれぞれ51.3 meq/kg-oilおよび1.0 mmol/kg-oilという値を示した。それに対して、 β -CDとBS-1を加えた系では、POVおよびTBA値ともに増加が顕著に抑制され、50日目の値はそれぞれ5.4 meq/kg-oilおよび0.01 mmol/kg-oilにとどまった。キサンタンガムを添加した系においてもある程度の抑制が認められたが、BS-1には及ばず、可溶性デンプンにおいてはほとんど効果が認められなかった。

また、食品中のもっとも強力なプロオキシダントとされる2価鉄をキレートさせるため、 β -CDとEDTA- Na_2 を加えた系でも実験を行なったが、保存15日目までPOVおよびTBA値はともにBS-1を添加した系とほぼ同じ値を示した後、急激に増加することが示された。

また、エマルションの状態を比較した結果、対照、または可溶性デンプン、またはEDTA- Na_2 を添加した系においては、保存1日目に乳化破壊が生じ、水層の分離が確認されたが、キサンタンガム、またはBS-1を添加した系においては、保存7日目にわずかなクリーミングが認められた程度で、水層の分離はなく、比較的安定な乳化性を示すことが分かった。

2. 既存乳化剤との比較：基本実験系において、食品添加物としてよく使用されている既存の各種乳化剤およびBS-1を用いて作成したエマルション（大豆油：水=2：8）を37°Cで保存し、30日間にわたってPOVとTBA値の経時変化を調べ、油の酸化の進行程度を比較した。その結果、Fig. 5に示したように、BS-1を用い

た系ではショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステルおよびソルビタン脂肪酸エステルを用いた系に比べて、POVおよびTBA値はともに低い値に保たれた。すなわち、BS-1には大豆レシチンを凌ぐ酸化抑制効果があることが明らかになった。

保存7日目に各エマルションの状態を比較した結果、BS-1を添加した系ではクリーミングがわずかに生じていたが、水層の分離は認められなかったのに対し、それ以外の系では、水層の分離が確認された。すなわち、BS-1を添加した系においては、実験に用いた既存の乳化剤よりも、乳化安定性が良好であったことが示唆された。

3. 既存抗酸化剤との比較：基本実験系において、 β -CDを乳化剤とし、これに食品添加物としてよく使用されている既存の各種抗酸化剤およびBS-1を添加して作成したエマルション（大豆油：水=2：8）を37°Cに14日間保存し、POVおよびTBA値を測定した。その結果、Fig. 6に示したように、0.5%のBS-1を添加することにより、0.2%のL-アスコルビン酸ナトリウムに匹敵する酸化抑制作用が得られることが分かった。また、他の既存抗酸化剤の酸化抑制作用は、ここで用いた添加濃度では、BS-1よりも小さいことが示された。

さらに、 α -トコフェロールにはもっと強い効果があると思われたが、TBA値の増加がわずかに抑制された程度で、POVに対しては無効であった。この理由として、大豆油にはもともと700~800 ppmの α -トコフェロールが含まれており、それ以上添加しても、効果的

Fig. 5. Effects of emulsifiers on autooxidation of soybean oil in the aqueous emulsion system.

×, sucrose esters of fatty acids; ●, BS-1; △, glyceryl monolaurate; ○, soybean lecithin; □, sorbitan monooleate.

Fig. 6. Effects of antioxidants on autooxidation of soybean oil in the aqueous emulsion system.

β -CD was used as an emulsifier at 1.5% for all samples and added antioxidants were as follows; 1, 0.3% sodium polyphosphate; 2, 0.02% EDTA disodium salt; 3, 0.02% butyl hydroxy-toluene; 4, 0.2% sodium L-ascorbate; 5, 0.02% α -tocopherol; 6, 0.5% BS-1; 7, without antioxidant. These samples were stored at 37°C for 14 days.

には飽和している可能性が考えられる。

α -トコフェロールのような油溶性抗酸化剤よりも、BS-1 およびその他の水溶性抗酸化剤が有効であったことから、O/W エマルション中の大豆油の酸化防止には、油相自体の酸化を防止するよりも、水相から油相への酸化促進物質の侵入を防止した方が効果的であるのか

もしれない。

以上の結果から、安定なエマルションを形成することによって、油が空気に直接接触することを妨げ、さらにはプロオキシダントである2価鉄を吸着したことが、BS-1の抗酸化性の機構であろうと考えられる。

文 献

- 1) T. Tsuda, T. Osawa, T. Nakayama, S. Kawakishi, and K. Oshima: Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 909-913 (1993).
- 2) 石川行弘: 新しい酸化防止剤の開発 (微生物起源を中心として). *油化学*, **41**, 762-767 (1992).
- 3) 青山 稔, 兼松 弘, 塚本正人, 東海林 茂, 新谷 韻: 魚油の酸化安定性に対するゴマ種子抽出物の効果. *油化学*, **43**, 154-157 (1994).
- 4) R. Matsumoto and S. Adachi: Lipid encapsulation technology-techniques and applications to food. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 256-261 (1993).
- 5) 河口克己, 天野妙子, 里見弘治, 横山理雄, 門田 元: 河川水から分離された *Klebsiella* sp. が産生する菌体外多糖類に関する研究. *日水誌*, **54**, 1817-1821 (1988).
- 6) 河口克己, 里見弘治, 横山理雄, 門田 元: 河川水から分離された *Klebsiella* sp. が産生する菌体外多糖類の産生条件に関する研究. *日水誌*, **58**, 1955-1960 (1992).
- 7) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正生: 非酵素的褐変反応生成物の抗酸化性に関する研究 (第3報). アンモニアとグルコースによる褐変反応液の分画および得られた各画分の抗酸化性について. *農化*, **45**, 292-298 (1971).
- 8) R. Kohn and I. Furda: Calcium ion activity in solutions of calcium pectinate. *Collect. Czech. Chem Commun.*, **32**, 1925-1937 (1967).
- 9) R. Kohn and I. Furda: Interaction of calcium and potassium ions with carboxyl groups of pectin. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 4470-4484 (1967).
- 10) T. Asakura, Y. Nakamura, N. Inoue, M. Murata, and S. Homma: Characterization of zinc chelating compounds in instant coffee. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 855-862 (1990).
- 11) 谷村顕雄: 食品添加物公定書解説書, 第6版, 廣川書店, 東京, 1992, pp. D-25-D-1056.
- 12) R. Yamauchi, Y. Goto, K. Kato, and Y. Ueno: Prooxidant effect of dihydroxyacetone and reducing sugars on the autooxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 843-848 (1984).
- 13) J. A. Buege and S. D. Aust: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302-310 (1978).
- 14) T. Asakawa, Y. Nomura, and S. Matsushita: A modified TBA test for the determination of lipid oxidation. *Yukagaku*, **24**, 481-482 (1975).
- 15) K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura: Antioxidative properties of xanthan on the autooxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 945-948.
- 16) K. Kawaguchi, K. Satomi, M. Yokoyama, and H. Kadota: Chemical characterization of an extracellular polysaccharide produced by a bacterium *Klebsiella* sp. isolated from river water. *Fisheries Sci.*, **61**, 257-260 (1995).
- 17) J. H. Sloneker and A. Jeanes: Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. (1) constitution. *Can. J. Chem.*, **40**, 2066-2071 (1962).
- 18) 鈴木周一: ゴム質多糖類, 「総合多糖類科学 (下)」(原田篤也, 三崎旭編), 講談社サイエンティフィク, 東京, 1974, pp. 246-260.