

第一章 総論 1

第二章 大豆ペクチン 博士論文 8

1. 実験材料と分析方法 9

1-1. 実験材料 9

ウロン酸含有多糖に関する食品 生化学的研究

1-2. マルクトン酸/アセチル基比の測定 10

1-3. 糖基の測定 10

1-4. 分子量の測定 10

2. 実験結果 13

2-1. レモンペクチンの高分子化とその生理活性 13

2-2. ペクチンの高分子化 13

2-3. 高分子ペクチンの調製 15

2-4. ペクチンの分子量と生理活性の相関 16

3. 結論 19

4. 要約 21

第三章 大豆ペクチン含多糖類の抽出に関する研究 23

1. 実験材料および方法 平成八年十二月 24

1-1. 実験材料 24

1-2. 抽出の実験法 24

1-3. 大豆ペクチン 山口文秀 24

1-4. DEAE-セルロースクロマトグラフィーによる 25

1-5. 大豆ペクチン含多糖類の抽出 25

1-6. タンパク質含量の測定法 26

1-7. 大豆ペクチン含多糖類の分子量の測定法 26

目 次

第一章 緒論	1
第二章 レモンペクチンに関する研究	8
1. 実験材料及び方法	9
1-1 実験材料	9
1-2 酵母の培養法および粗酵素液の調製	9
1-3 低分子ペクチンの調製	9
1-4 分子量の測定	10
1-5 ガラクツロン酸／中性糖比の測定	10
1-6 粘度の測定	10
1-7 生理活性の検定	10
2. 実験結果	13
2-1 レモンペクチンの低分子化とその生理活性	13
(1) ペクチンの低分子化	13
(2) 低分子ペクチンの調製	15
(3) ペクチンの分子量と生理活性の相関	16
3. 考察	19
4. 要約	21
第三章 大豆ペクチン性多糖の構造に関する研究	23
1. 実験材料および方法	24
1-1 実験材料	24
1-2 酵素の調製法	24
1-3 大豆ペクチン性多糖の抽出法	24
1-4 DEAE-セルロースクロマトグラフィーによる 大豆ペクチン性多糖の精製	25
1-5 タンパク質含量の測定法	26
1-6 大豆ペクチン性多糖の分子量の測定法	26

1-7	ウロン酸、中性糖含量の測定法	26
1-8	中性糖組成の分析	27
1-9	多糖加水分解酵素活性の測定法	27
1-10	セルラーゼAの各酵素活性の分画法	27
1-11	3酵素画分の部分精製	28
1-12	酵素の分子量の測定	28
1-13	多糖の分解限度の HPLC による測定	29
2.	実験結果	30
2-1	大豆ペクチン性多糖の抽出、精製	30
(1)	抽出条件の検討	30
(2)	大豆ペクチン性多糖の精製	31
2-2	<i>A. niger</i> が産生するペクチン側鎖分解酵素の精製	36
(1)	<i>A. niger</i> が産生するペクチン側鎖分解酵素の分離	36
(2)	Endo- β -1,4-D-galactanase の精製、およびその特性	39
(3)	エキソ型グルコシダーゼの精製、およびその特性	43
2-3	酵素化学的手法による大豆ペクチン性多糖の構造解析	46
(1)	主鎖中におけるガラクトツロナン領域の分布	46
(2)	側鎖部分の構造解析	49
3.	考察	50
4.	要約	52
第四章 大豆ペクチン性多糖の応用に関する研究		53
1.	実験材料および方法	54
1-1	実験材料	54
1-2	大豆ペクチン性多糖の抽出方法	54
1-3	ゲルろ過による分子量分布の測定	54
1-4	タンパク質含量の測定	55
1-5	ガラクトツロン酸含量の測定	55
1-6	エステル化度の測定	55
1-7	中性糖組成の測定	55

1-8	分子内ガラクトン分布の分析	55
1-9	粘度の測定	55
1-10	動物試験	55
2.	実験結果	57
2-1	大豆ペクチン性多糖抽出におけるヘキサメタリン酸の効果 抽出条件の影響	57
(1)	抽出条件の影響	57
(2)	大豆ペクチン性多糖の分子量分布	59
(3)	大豆ペクチン性多糖のタンパク質含量、糖組成	60
(4)	多糖内におけるガラクトン領域の分布	62
(5)	3種多糖間の物性の比較	62
2-2	ラットコレステロール代謝における大豆ペクチン性多糖 の影響	64
(1)	ラット組織コレステロール濃度における 大豆ペクチン性多糖の影響	64
(2)	盲腸内の短鎖脂肪酸濃度の変化	66
3.	考察	68
4.	要約	71
第五章 コーンヘミセルロースに関する研究		73
1.	実験材料および方法	74
1-1	実験材料	74
1-2	エクストルーダー	74
1-3	コーンヘミセルロースの抽出	75
1-4	水溶性高分子成分の定量	75
1-5	構成糖の分析	76
2.	実験結果	77
2-1	HPLC によるコーンヘミセルロース中のウロン酸 と中性糖の測定	77
(1)	ウロン酸と中性糖の HPLC による分離条件の確認	77

(2) コーンヘミセルロースの分析	77
2-2 二軸エクストルーダー処理によるコーンヘミセルロースの アルカリ抽出	79
3. 考察	82
4. 要約	85
第六章 総括	86
文献	90
謝辞	97

第一章 緒論

食品は、栄養や嗜好性などの他に生体機能を保持する機能（三次機能といわれている）を持っている。この三次機能を強化した食品、いわゆる機能性食品の基礎研究は、昭和59年度から61年度に行われた文部省の特定研究『食品機能の系統解析と展開』で始まり、その際に機能性食品という言葉が初めて登場する。機能性食品とは医薬品と食品の中間に位置するもので、医薬品が既に疾病に罹っている人の治療を目的としているのに対し、機能性食品は何らかの病気に罹る可能性がある前疾病的な人が病気を予防し健康を維持することを目的としている。中国の古い言葉に『医食同源』という言葉があるが、機能性食品はまさにこれを現代の知見による科学的アプローチにより実現しようとしたものである。その後、機能性食品については三次にわたる文部省の特定研究を中心にさまざまな研究が進められ、多くの研究成果が報告されている^{1,2)}。

ついで、これらの基礎研究の成果を元に機能性食品の商品化を検討する企業が現れ、ファイバー、ミネラル、オリゴ糖、ロイヤルゼリーなどを強化した食品が市場に多く見られるようになった³⁾。このような状況の中、平成3年9月から厚生省により特定保健用食品の制度が施行され、食品に健康とのかかわりあいに関する情報（ヘルスクレーム）の表示が可能となり、機能性食品は今後さらに増加するものと思われる⁴⁾。

食物繊維は、『人の消化酵素では消化されない食物中の難消化性成分』と定義されているが、この食物繊維の摂取量の減少と成人病の増加の因果関係は多くの疫学的なデータにより立証されている⁵⁾。他の機能性素材が、薬効的な生理機能を唱っており、基礎的な動物試験の結果などがその機能性の根拠になっているのに対し、食物繊維は

基礎的なデータ以外に長期間の広範囲に及ぶ臨床的あるいは疫学的なデータも揃っており、五大栄養素に続く第六の栄養素として、人体の恒常性の維持に必要なものであることが既に広く認められている点が大きく異なっている。日本は戦後の食生活の変化に伴い、30年間で食物繊維摂取量が5g減少しているが、その間に成人病数も増

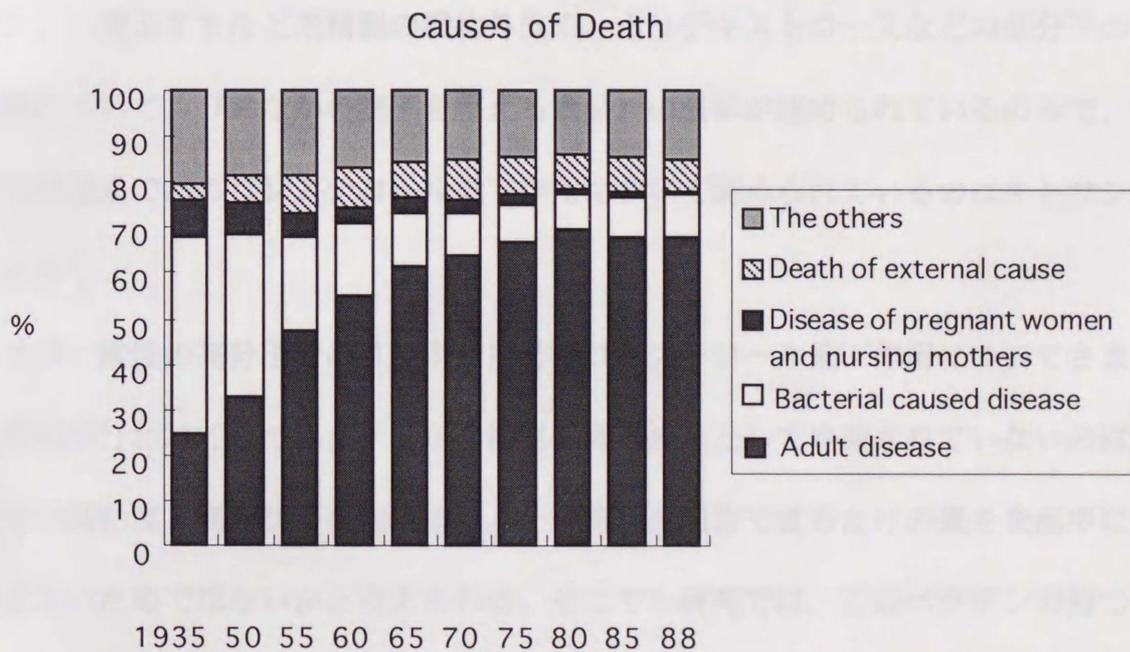
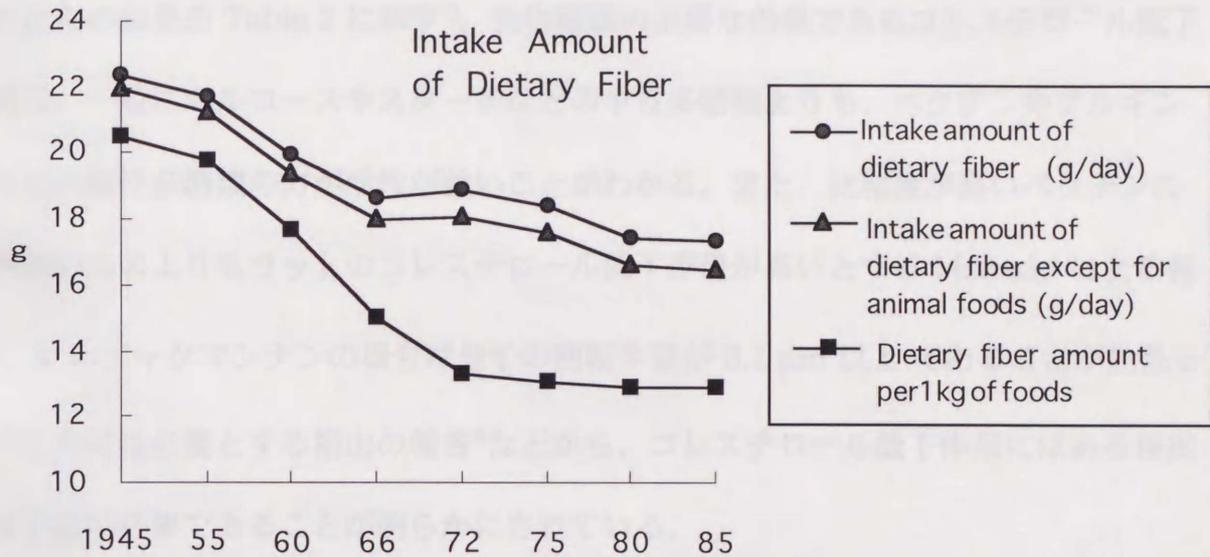


Fig. 1. Relationship of Intake Amount of Dietary Fiber and Number of Adult Disease in Japan.

加している (Fig. 1) ⁶⁾。このことは、日本の成人病数を減らすためには戦前の食物繊維量に戻す必要があることを強く示唆している。

食物繊維の化学構造に基づく分類を Table 1 に示す⁵⁾。ここに示した天然多糖類について、高コレステロール食で飼育したラットにおけるコレステロール低下作用を比較した辻らの結果を Table 2 に示す⁷⁾。食物繊維の主要な効果であるコレステロール低下作用は、一般にセルロースやスターチなどの中性多糖類よりも、ペクチンやアルギン酸などの酸性多糖類の方が活性が強いことがわかる。また、比粘度が高いペクチンの方が低いものよりもラットのコレステロール低下作用が高いとする Mokady による報告⁸⁾、コンニャクマンナンの場合は分子の回転半径が 0.1 μm 以上であることが効果を示すためには必要とする桐山の報告⁹⁾などから、コレステロール低下作用にはある程度の分子量が必要であることが明らかにされている。

しかしながら、現在特定保健用食品に認められている内容を見てみると、オールブラン、小麦ふすまなど未精製の穀物外皮や、ポリデキストロースなどの低分子の食物繊維について、『おなかの調子を整える食品』の表示が認められているのみで、その重要な効果であるコレステロール低下作用について認められているのはキトサンのみである⁴⁾。

本来、酸性の高分子であり、すでにそのコレステロール低下作用についてさまざまな研究が行われてきたペクチンが、特定保健用食品として申請されていないのは、主にその高粘度と高いゲル化能により、その機能を期待できるだけの量を食品中に添加できないためではないかと考えられる。そこで本研究では、このペクチンの持つ優れた生理活性を保ちつつ、その物性を改良する方法について検討することとした。

ペクチンは一般に分子量 5~50 万で、ガラクトuron酸およびそのメチルエステルが α -1,4 結合によって直鎖状に結合した高分子を主体とする多糖とされている。ペクチ

Table 1. Classification of dietary fiber based on chemical structure⁵⁾

Basic Structure	Dietary Fiber
1. Homoglucan (<u>Straight chain type</u>)	
Glucan	Cellulose, Chitin, Laminaran
Galactan	Agar, Carrageenan
Mannan	Mannan
Xylan	Xylan
2. Homoglucan (<u>Branched type</u>)	
Galactan	Galactan
Mannan	Mannan
Arabinan	Arabinan
Fructan	Levan
3. Heteroglucan (Neutral)	
Glucomannan	Konnyac mannan
Galactomannan	Guar gum, Locast bean gum
Arabinogalactan	Soybean arabinogalactan, Larch arabinogalactan
Galactoxyloglucan	Tamarind gum
4. Heteroglucan (Acidic)	
Glucuronoxylloglucan	Hemicellulose B
Glucuronogalactoglucan	Gum arabic
5. Glucuronan (Uronate polysaccharide)	
Galacturonan	Pectin
Glucuronomannuronoglucan	Algin
Galacturonorhamnan	Karaya gum
Glucuronomannan	Cherry gum
6. Aromatic compound	
	Lignin

Table 2. Comparison of dietary fiber's hypocholesterolemic activity⁷⁾

Diet group	Cholesterol levels (%)	
	Serum	Liver
Standard diet	34*	9*
Cholesterol diet	100	100
Bacterial gum BP	36*	21*
Konnyac mannan	53*	37*
Guar gum	66*	49*
Carrageenan (Seakem)	70*	58*
Carrageenan (Gelcarin)	117	92
Pectin	72*	70*
Alginate	74	89
Na-alginate	80	44*
Loucust bean gum	84	78*
Inulin	97	113
Thamalind seed gum	98	96
Bacterial gum AF	107	80*
Xylan	114	114
Cellulose	130	122
Corn starch (α)	119	108
Potato starch (β)	134	115

BP= *Bacillus polymyxa* 271, AF= *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*.

* Significant differences for the cholesterol diet group.

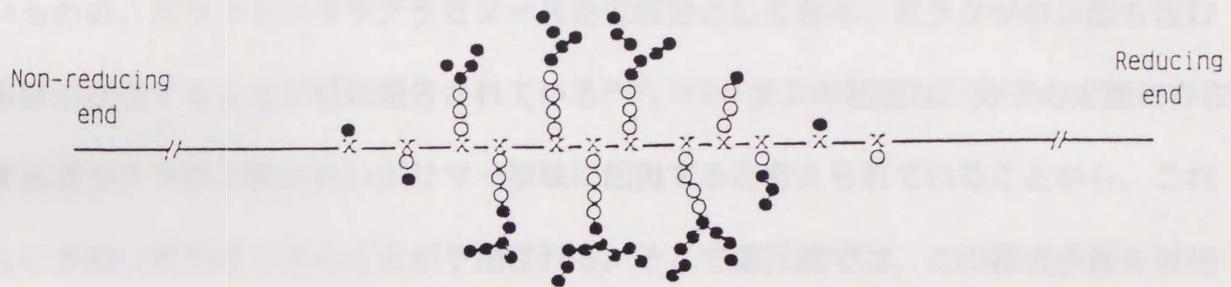


Fig. 2. A Model for the Structure of Pectate of *Citrus unshiu*¹²⁾.

Mark identity: -, galacturonate; x, rhamnose; ○, ●, neutral sugars.

の分子中にはアラビノース、ガラクトース、ラムノース、フコース、キシロース、グルコースなどの中性糖も含まれているが、これらの中性糖は分子の中央部に集まって存在することが明らかになっている (図2)^{10,11)}。

ペクチンの持つ高粘度およびゲル化能はその高分子量に起因するが、上述したようにその分子量は生理活性にも影響している。そこで本研究では、最初に分子量と生理活性、粘度の相関関係を検討し、生理活性を保持したまま低分子化させる方法の可能性について吟味した (第二章)。

一般にペクチンはその大部分がガラクトツロン酸のポリマーで構成されている。しかし、小豆、いんげん豆の子葉には、ガラクトース、アラビノース、キシロースなどの中性糖を主要な構成糖として含むにも関わらず、ペクチンと同様に分子の末端にポリガラクトツロン酸を持つ多糖が存在することが明らかになっている¹³⁾。一方、大豆中にも構成糖や結合様式などの有機化学的な研究のみで、分子全体の構造は明らかではないものの、ガラクトースやアラビノースを主成分として含み、ガラクトツロン酸も含む多糖が存在することが既に報告されている^{14,15)}。ペクチンの粘度は、分子の末端に存在するガラクトツロン酸の長いポリマー領域に起因すると考えられていることから、これらの多糖は低粘度であることが予測される。そこで第三章では、この種の多糖を現在廃棄物として処理されている大豆おからから抽出、精製し、ペクチンと同様の構成単位から構成されていることをまず立証した。次いで、第四章ではこの多糖を大量調製し、その粘度と生理活性について検証した。

さらに、既に生理活性が認められているコーンヘミセルロースについて、現在でも問題点として残されていたウロン酸部分の分析法を示し、より効率的な抽出方法の検討を行った（第5章）。

なお、ペクチンは一般にガラクトツロン酸のポリマーとされており、アメリカの局方（USP）ではペクチンの純度としてガラクトツロン酸 74%以上という規定を設定している¹⁰⁾。そこで本論文ではガラクトツロン酸を主成分とするものをペクチン、ペクチンと同様に分子の末端にガラクトツロン酸の鎖が存在するものの、構成糖としてはガラクトツロン酸よりも中性糖の方が多いいものについては、ペクチン性多糖と呼ぶこととする。

第二章 レモンペクチンに関する研究

食物繊維は人の消化酵素では消化されない食物中の難消化性成分と定義付けられており、セルロース、リグニン、ペクチンなどの植物細胞壁成分のみならず、広くキチンやコラーゲンなどの不消化有機物を含むものである¹⁶⁾。近年、これらは、便通改善効果を初め、血中コレステロール上昇抑制作用などの種々の作用を有し、成人病の予防などにも重要な役割を果たしていることが明らかになってきた¹⁷⁾。

これらの食物繊維の中でも、ペクチンは特に生理活性が強く、便通改善効果、血中コレステロールレベルの上昇抑制効果、胆石形成の抑制効果、高血圧抑制効果など種々の効果が報告されているが^{18,19)}、一方ではその高粘性や難溶解性などのためにゲル化剤や乳酸菌飲料の安定剤などに利用範囲が限定されてきた。

この問題を解決するためには、ペクチンを低分子化し、低粘度でしかも溶解性の高いペクチンを生成させればよいと考えられる。しかし Mokady は、比粘度の高いペクチンの方が低いものより生理的効果が強いと報告しており、ある程度の分子量は生理活性の発現に必要なだとされている⁸⁾。

そこで我々はペクチンを飲食品に容易に添加できるほど低粘度にし、なおかつ生理的作用が残存する限界分子量を明らかにすることを目的として、酵母の一種である *Kluyveromyces fragilis*²⁰⁾ の培養上清を粗酵素液として、市販のレモンペクチンの低分子化を検討した²¹⁾。さらに、粘度が急激に低下した直後の反応時間 2 時間液と、反応が分解限度まで進んだ反応 24 時間液の 2 つの分子量の異なる低分子ペクチンについて、ラットのコレステロール上昇抑制活性を検定し、その生理活性と分子量との相関を明らかにした²²⁾。

1. 実験材料および方法

1-1 実験材料

本実験の基質としてレモンペクチン（和光純薬）を使用した。このレモンペクチンは塩田らの方法によりエステル化度を測定したところ²³⁾、75.0%であった。また、レモンペクチン酸はこのレモンペクチンを畑中の方法で鹼化したものを使用した²⁴⁾。すなわちレモンペクチン溶液を 0.05N NaOH 存在下で 4℃、90 分鹼化させた後、酢酸で速やかに pH を 4.5 に調整し、ペクチン酸溶液として酵素反応に供した。

その他の試薬も和光純薬の特級を使用した。

1-2 酵母の培養法²⁰⁾および粗酵素液の調製

Kluyveromyces fragilis JTF-1 をショ糖 2% を含むじゃがいも煎汁寒天斜面培地 (pH 5.0) を用い、27℃で24時間培養した。得られた菌体の1白金耳をぶどう糖 5%、リン酸アンモニウム 0.2%、リン酸カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.1% および酵母エキス 0.4% を含む培地 50 ml に接種し、27℃で3日間静置培養した。この培養物を 9,000×g で10分間遠心分離し、菌体を除去した培養上清を得た。この培養上清はタンパク質含量が 0.45 mg/ml であり、0.167 units/ml のエンド型ポリガラクトナーゼ (EC. 3. 2. 1. 15.) を含んでいた²⁰⁾。

1-3 低分子ペクチンの調製

レモンペクチン 100 g を 0.025M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 4ℓ に懸濁し、これに粗酵素液 1ℓ を加え、40℃で2時間あるいは24時間反応させた。100℃で15分間加熱する事により酵素を失活させた後、得られた反応液をロータリーエバポレーターを用い

60℃で濃縮後、濃縮溶液の100倍量の脱イオン水に対し一晚透析し、さらに凍結乾燥することにより低分子化ペクチンを調製した。

1-4 分子量の測定

レモンペクチンおよびペクチンの酵素分解物の分子量は、TSK-gel G4000PW (7.6×500 mm) によるゲルろ過により測定した。検出器は示差屈折計、溶媒は0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)、流速は1.0 ml/min、カラム温度は50℃であった。

1-5 ガラクツロン酸／中性糖比の測定

ガラクトロン酸／中性糖比の測定は、レモンペクチンについて松橋らの酵素-HPLC法²⁵⁾で行った。すなわち、ドリセラゼ (協和発酵) でペクチンを完全分解後、Shodex SUGAR SH-1821 による HPLC 分析によりガラクトロン酸と中性糖含量をそれぞれ測定した。

1-6 粘度の測定

粘度はE型粘度計 (東京計器) を用いて5%溶液について22℃の恒温室中で測定した。

1-7 生理活性の検定

1) 動物実験 低分子ペクチンの生理活性の検定は、Sprague-Dawley (SD) 系ラット (チャールズリバー) を用いて、コレステロール代謝への影響を検定する辻らの方法²⁶⁾ を改変して行った。3週齢のSD系雄性ラットを市販の固形飼料 (オリエンタル酵母、固形飼料MF) で四日間飼育した後、平均体重が等しくなるように5群に分け

Table 3. Composition of the diets (%)

Constituents	Basal diet	Cholesterol diet	Pectin diet	MP diet	LP diet
Casein	22	22	22	22	22
Lard	9	9	9	9	9
Corn oil	1	1	1	1	1
Salt mixture ^{a)}	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ^{a)}	1	1	1	1	1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	—	1	1	1	1
Na-cholate	—	0.25	0.25	0.25	0.25
Pectin	—	—	5	—	—
MP	—	—	—	5	—
LP	—	—	—	—	5
Sucrose	63.30	62.05	57.05	57.05	57.05

a) Mineral and vitamin mixtures was the same compositions as those recommended by the American Institute of Nutrition (AIN-76)²⁷⁾. Abbreviations: MP, middle molecular weight pectin; LP, low molecular weight pectin.

た。その後、それぞれの群に Table 3 に示した配合の飼料のひとつを与え 27 日間飼育した。採血は試験期間中は一夜絶食後午前 9 時に尾静脈から、又、最終日には 6 時間の絶食後、腹大静脈から全採血を行い、常法により血清を調製した。また、屠殺後に肝臓および盲腸を摘出した。肝臓は生理的リン酸緩衝液で還流後、ろ紙で余分な水分を吸いとり、重量を測定した。盲腸は全重量と内容物と組織器官（盲腸壁）のそれぞれの重量を測定した。

2) 盲腸内容物の pH の測定 盲腸内容物を蒸留水で懸濁後、電極を直接懸濁液に挿入

することにより測定した。

3) コレステロール含量の測定 血清はそのまま酵素法で総コレステロール濃度を、肝臓は Folch らの方法で脂質成分を抽出後²⁸⁾、酵素法で総コレステロール濃度を測定した。総コレステロール濃度は「デタミナーTC5」(協和メデックス)で測定した。体重、肝臓と盲腸の重量はそれぞれ1匹ずつ、飼料の摂取量は各群ごとに測定した。

4) 統計処理 データは分散分析を行った後に、Tukey-Kramer 法を用いて各群間で平均値の差の検定を行った。

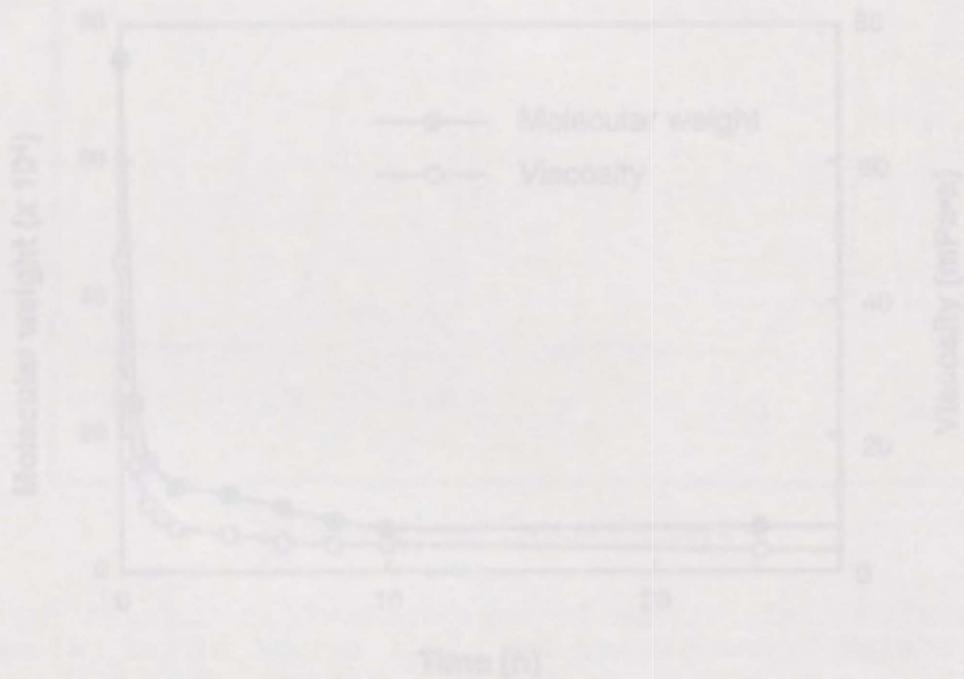


Fig. 7. Enzymatic Degradation of Citric Perlin.

A reaction mixture containing 4 g of citric perlin in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) and 1 l of crude endo- β -galacturonase activity from *Fluoroglucosium fragilis* JFY-1 was incubated at 40°C.

2. 実験結果

2-1 レモンペクチンの低分子化とその生理活性

(1) ペクチンの低分子化

酵母 *Kluveromyces fragilis* は、エンドポリガラクトナーゼを生産することが知られている。そこでこの酵母の培養上清を粗酵素液として用い、レモンペクチンの低分子化を行った。加水分解反応は 10 時間後にほぼ平衡に達し、分子量が 66,000、粘度が 5 mPa·s 程度で分解が停止した (Fig. 3)。24 時間反応させたものの HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示す。対照としてはペクチンをアルカリ鹼化することによ

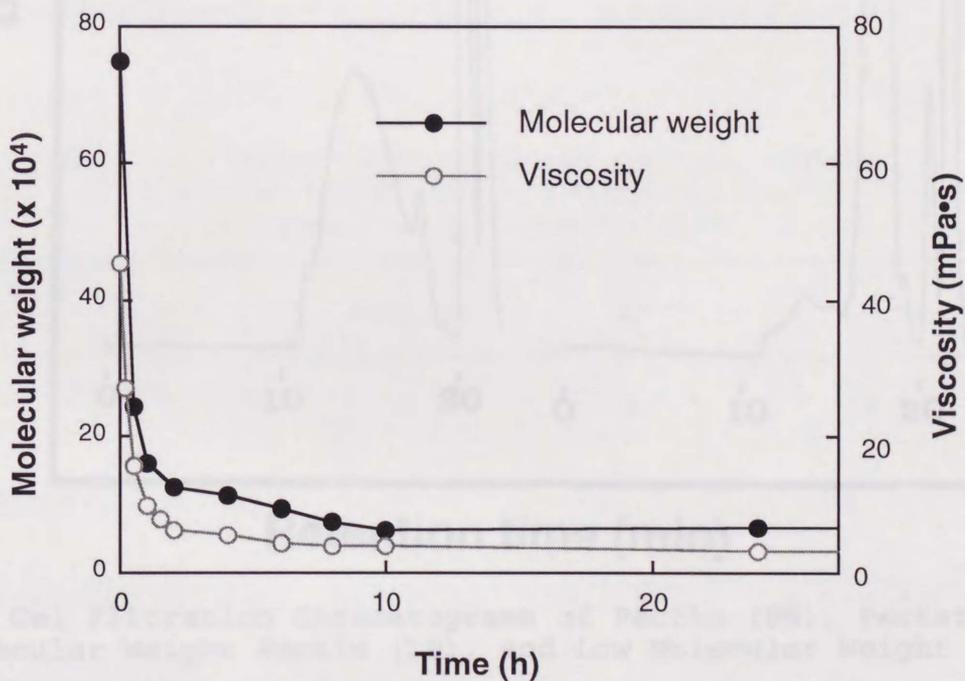


Fig. 3. Enzymatic Degradation of Citrus Pectin.

A reaction mixture containing 4 l of 2% citrus pectin in 0.025 M acetate buffer (pH 4.8) and 1 l of crude endopolygalacturonase solution from *Kluveromyces fragilis* JTF-1 was incubated at 40°C.

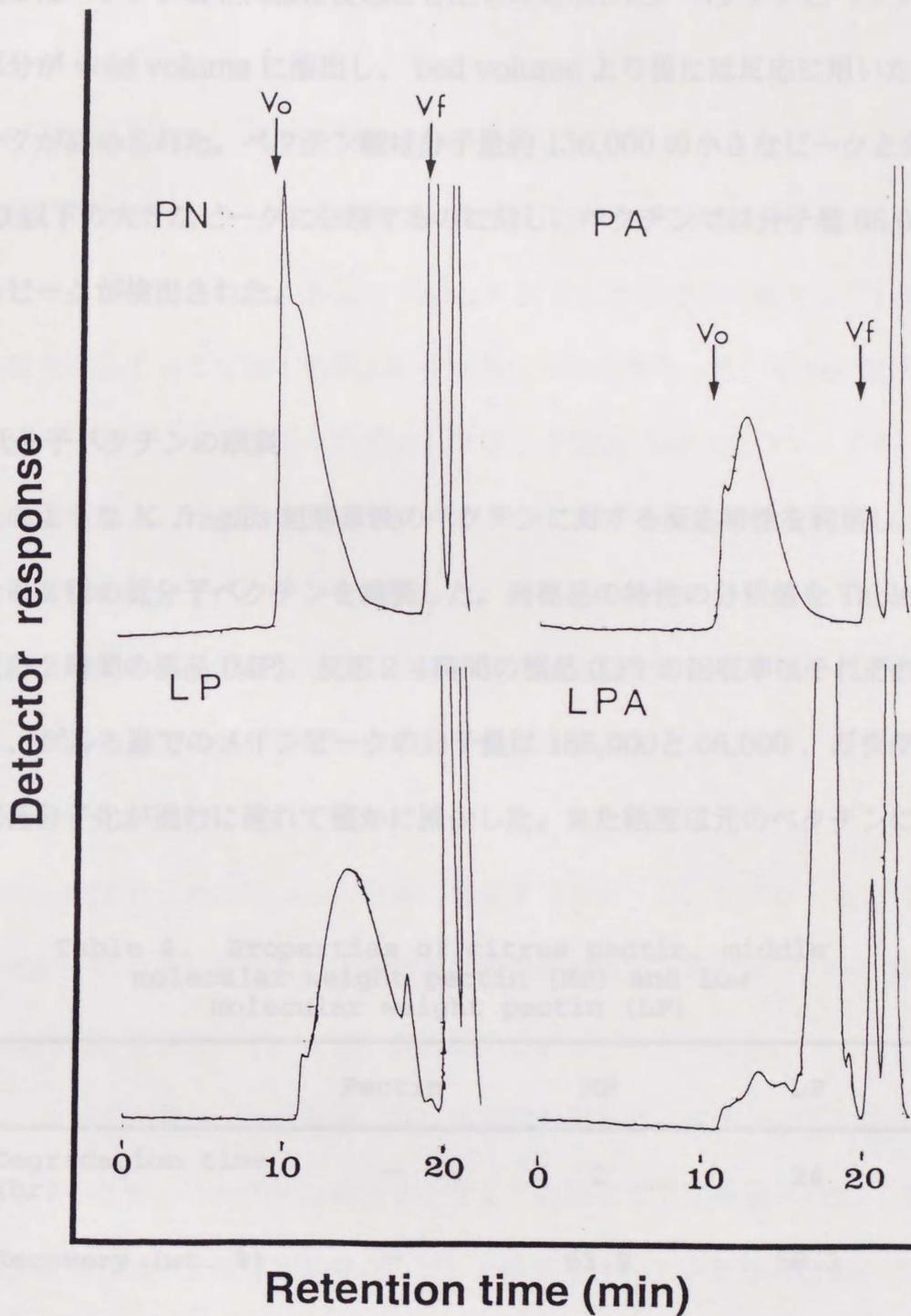


Fig. 4. Gel Filtration Chromatograms of Pectin (PN), Pectate (PA), Low Molecular Weight Pectin (LP), and Low Molecular Weight Pectate (LPA).

Operating conditions: column, TSK-gel G4000PW, 7.6 x 600 mm; pre-column, TSK-gel guard column, 7.6 x 50 mm; mobile phase, 0.05 M acetate buffer, pH 4.0; column temperature, 50°C; flow rate, 1.0 ml/min; detector, RI; injection, 50 μ l of the reaction mixture. V_o and V_f indicate void volume and total fluid volume, respectively.

り調製したペクチン酸を同様に反応させたものを示した。ペクチンとペクチン酸はその大部分が void volume に溶出し、bed volume より後には反応に用いた酢酸などのピークが認められた。ペクチン酸は分子量約 136,000 の小さなピークと分子量 10,000 以下の大きなピークに分解するのに対し、ペクチンでは分子量 66,000 を中心とするピークが検出された。

(2) 低分子ペクチンの調製

以上のような *K. fragilis* 粗酵素液のペクチンに対する反応特性を利用し、反応時間が異なる 2 種の低分子ペクチンを調製した。両標品の特性の分析値を Table 4 に示す。反応 2 時間の標品 (MP)、反応 24 時間の標品 (LP) の回収率はそれぞれ 63.9% と 58.3%、ゲルろ過でのメインピークの分子量は 185,000 と 66,000、ガラクトツロン酸含量は低分子化が進むに連れて僅かに減少した。また粘度は元のペクチンに比べかな

Table 4. Properties of citrus pectin, middle molecular weight pectin (MP) and low molecular weight pectin (LP)

	Pectin	MP	LP
Degradation time (hr)	—	2	24
Recovery (wt. %)	—	63.9	58.3
Molecular weight	75.0×10^4	18.5×10^4	6.6×10^4
Galacturonate content (% on total sugar)	87.6	85.6	80.3
Viscosity (mPa·s, 5% solution)	319.2	47.5	16.0

り低粘度になっていた。

(3) ペクチンの分子量と生理活性の相関

3週齢のSD系雄性ラットを1週間市販の固形飼料で予備飼育後、平均体重がほぼ同じになるように群分けし、各群をTable 3に示した組成の飼料で27日間飼育し、その影響を見るという方法で各標品の生理活性の検定を行った。飼料の組成は、基準食にコレステロール1%、コール酸ナトリウム0.25%を加えたコレステロール付加食をコントロールとし、その組成にペクチン、MP、LPをそれぞれ5%ずつ添加したものを試験食とした。

始めに各群の体重、飼料摂取量、肝臓重量、盲腸重量などをTable 5に示す。体重増加量、飼料摂取量、飼料効率はいずれもほぼ同じ値を示しており、各群間で大きな差は認められなかった。

次ぎに、試験終了後に摘出した肝臓の重量を見ると、コレステロールの付加による重量の増加がペクチンを加えることにより抑制されているのに対し、MPおよびLPでは僅かな抑制しか見られず、有意な差を認めるには至らなかった。

盲腸についてみると、盲腸重量、特に内容物の重量はペクチンの添加によりわずかに増加しているが、この増加は低分子化することにより更に促進された。ペクチンの添加による盲腸壁の重量増加効果は、MPでは保持されているもののLPでは失われていた。また、盲腸の内容物のpHについては、2種の低分子ペクチン群ではペクチンと同じレベルまで低下していた。

更に血清中および肝臓中のコレステロールレベルの変化を調べた。血清中のコレステロール濃度の変化をFig. 5に示す。分子量185,000のMPでは元のペクチンと同様に試験開始直後からコレステロールの上昇抑制効果が認められた。一方、分子量

Table 5. Effects of pectin, MP, LP, and other diets on body weight, food intake, liver weight, liver cholesterol level, and cecum weight of rats

	Basal diet	Cholesterol diet	Pectin diet	MP diet	LP diet
No. of rats	6	6	6	6	9
Initial body wt. (g)	89 ± 2	88 ± 2	89 ± 2	88 ± 2	89 ± 2
Body wt. gain (g)	191 ± 7	185 ± 6	186 ± 8	177 ± 5	188 ± 6
Food intake (g)	404 ± 14	387 ± 13	406 ± 10	380 ± 13	412 ± 11
Body wt. gain/ food intake	0.47 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.01
<u>Liver</u>					
Liver wt./ 100 g of body wt.	6.0 ± 0.2 ^a	7.7 ± 0.2 ^b	6.6 ± 0.2 ^a	7.5 ± 0.1 ^b	7.2 ± 0.2 ^b
Liver cholesterol (mg/liver)	71 ± 9 ^a	1341 ± 52 ^c	710 ± 68 ^b	1140 ± 100 ^c	1256 ± 59 ^c
<u>Cecum</u>					
Total wt. (g)	1.88 ± 0.13 ^a	1.93 ± 0.12 ^a	3.78 ± 0.71 ^{ab}	5.03 ± 1.13 ^b	4.97 ± 0.58 ^b
Content wt. (g)	1.33 ± 0.17 ^a	1.47 ± 0.10 ^{ab}	2.87 ± 0.75 ^{abc}	4.00 ± 1.06 ^{bc}	4.01 ± 0.52 ^c
Wall wt. (g)	0.58 ± 0.03 ^a	0.48 ± 0.03 ^a	0.84 ± 0.03 ^b	0.91 ± 0.08 ^b	0.50 ± 0.06 ^a
Content pH	7.37 ± 0.09 ^c	7.00 ± 0.05 ^b	6.51 ± 0.06 ^a	6.46 ± 0.06 ^a	6.51 ± 0.08 ^a

Each value is mean ± SEM. Values in the same line without common superscript letters denote significant difference (p < 0.05).

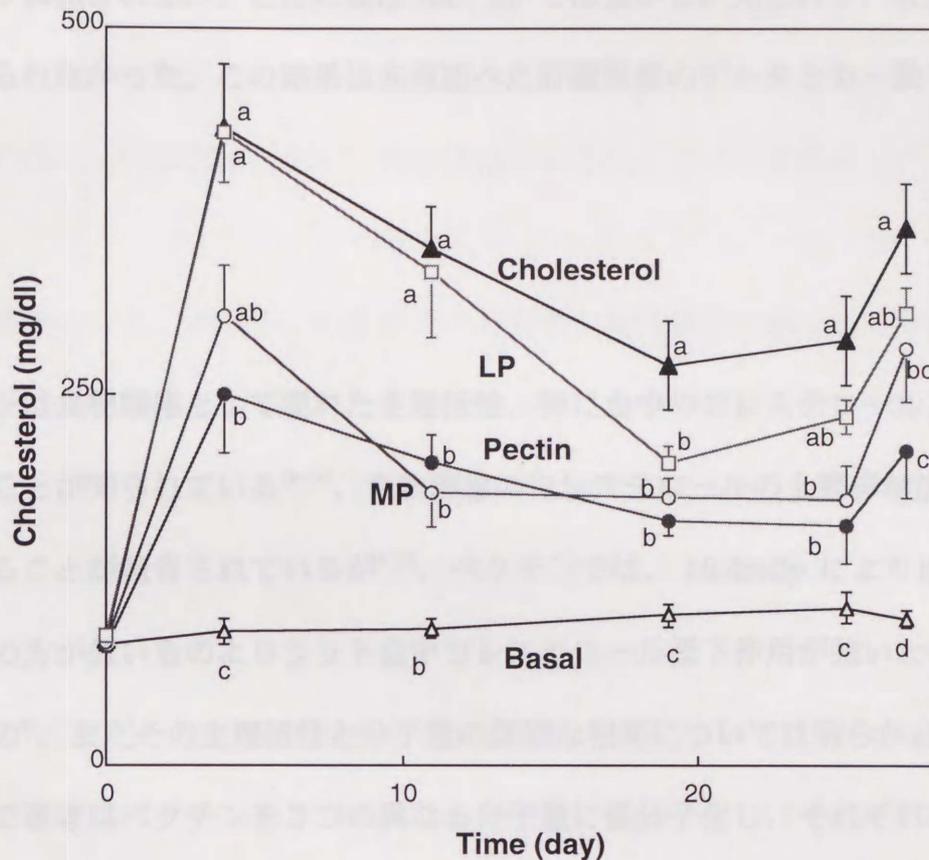


Fig. 5. Influence of Pectin, MP, LP and Other Diets on Serum Cholesterol Level in Rats.

Each point is the mean of 6 to 9 rats and vertical bars represent SEM. Δ , Basal diet; \blacktriangle , cholesterol diets; \bullet , pectin diets; \circ , MP diet; \square , LP diets. Values in the same period without common superscript letters denote significant difference ($p < 0.05$).

66,000 の LP では試験開始直後は効果が認められなかったものの、試験が進むに連れて上昇が抑制され 19 日目には有意な差が認められた。なお、最終日の採血ではいずれの群でも 25 日目の採血よりも高い値が得られているが、これは尾採血と全採血という採血法の違いに起因するのではないかと推測している。

次に飼育終了後に摘出した肝臓内へのコレステロールの蓄積量を検討すると (Table 5)、コレステロールの添加による肝臓へのコレステロールの蓄積はペクチンを加える

ことにより抑制されるが、この抑制は MP, LP では僅かしか見られず、有意な差としては認められなかった。この結果は先程述べた肝臓重量のデータとも一致した。

3. 考察

ペクチンは食物繊維として優れた生理活性、特に血中のコレステロール上昇抑制活性を持つことが知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。食物繊維のコレステロールの上昇抑制活性は分子量と相関することが報告されているが^{9,29)}、ペクチンでは、Mokady により比粘度が高いペクチンの方が低いものよりラット血中コレステロール低下作用が強いという報告はあるものの⁸⁾、まだその生理活性と分子量の詳細な相関については明らかにされていない。そこで著者はペクチンを2つの異なる分子量に低分子化し、それぞれの生理活性、特に体内のコレステロール上昇抑制活性について検討した。

ペクチンの低分子化の方法としては、*K. fragilis* の培養液上清を粗酵素液として用い、部分分解させる方法を採用することとした。この酵素液をレモンペクチンに作用させると分子量約 66,000 で加水分解が停止するのに対し、レモンペクチンを脱エステル化したペクチン酸に対しては、その大部分は分子量 10,000 以下のフラグメントにまで分解が進んだ。*K. fragilis* のエンドポリガラクトナーゼは、ペクチン酸に作用しトリガラクトロン酸を主に遊離すると報告されているが³⁰⁾、ペクチン中ではこの酵素が作用できる部位が分子量約 66,000 ごとにのみ存在していることが示唆される。

Darvill らはペクチン中のエステル基がブロック化して存在していることを示唆しているが³¹⁾、今回のデータはそれを支持するものである。De Vries らは、リンゴペクチンを構成するガラクトロン酸のエステル基の有無はリンゴ中のペクチンエステラーゼによるカルボニル基の脱エステル化により起こり、また、リンゴペクチンのエステル基

のブロック化は、その酵素の特異性によると報告している³²⁾。柑橘類の酵素の場合にも松浦により同様の特異性を持つという報告がある³³⁾。それゆえにレモンペクチンの場合にも同様のメカニズムによりブロック化されて脱エステル化されていると推測している。

酵母の酵素をレモンペクチンに作用させた場合、粘度は分子量 15 万まで急激に低下し、その後はゆるやかに低下して、分子量約 6 万で分解が停止した (Fig. 1)。そこで著者は分解が平衡に達した分子量 66,000 の低分子量ペクチン (LP) と、粘度が急激に低下した直後の分子量 185,000 の中間分子量ペクチン (MP) について標品を調製し、その物性、および生理活性を検討することとした。

それぞれの低分子ペクチンの粘度は 5 % 溶液で、22 °C において元のペクチンの 1/6 (MP)、および 1/20 (LP) に低下した。また、もとのペクチンは数%までしか溶解しないのに対し、低分子化したペクチンは 10 % 以上の高濃度でも溶解させることが可能である。

血中のコレステロール値の変化 (Fig. 3) は、MP では試験開始直後から元のペクチンとほぼ同じ挙動を示したのに対し、LP では試験開始直後はその効果が表れず、試験期間が進むにつれて徐々に効果が表れた。この結果は、ペクチンの持つ即効的な血中コレステロール上昇抑制効果には少なくとも LP の 66,000 よりも大きい分子量が必要であること、しかし飼料摂取が長期間に及ぶ場合には LP 程度の分子量でも十分な効果があることを示唆している。一方、肝臓へのコレステロールの蓄積では、MP、LP ともに抑制効果を失っており、低分子ペクチンは、血液中と肝臓内でそれぞれ別の影響を示すことが明らかになった。

食物繊維のコレステロール上昇抑制活性の発現機構としては、コレステロールの吸収抑制^{34,35)}あるいは腸内細菌により生産される短鎖脂肪酸によるコレステロール合成抑

制^{36,37)}が報告されている。そこで本章ではその解析の一助として盲腸の重量とその内容物の pH を測定した。盲腸およびその内容物の重量はペクチンを加えることにより増加したが、ペクチンを低分子化することによりさらに、特に内容物の重量が増加した。一方、ペクチンで見られる盲腸壁の重量増加は、MP では保持されているものの LP では観察されなかった。大豆のヘミセルロースの場合には、腸管細胞の増殖に関わる酵素が活性化すると報告されているが³⁸⁾、これらの酵素の活性化においてもやはり分子量による相違があることが推測される。内容物の pH については、MP、LP ともにペクチンと同様に低下しており、腸内細菌による短鎖脂肪酸の生産が、ペクチンと同様に活性化されていることが示唆される。

以上のように我々は *K. fragilis* の酵素を用いて調製した 2 種の分子量の異なる低分子ペクチン (MP, LP) を用いて生理作用の検定試験を行い、食物繊維としての生理作用、特にコレステロール上昇抑制効果を保持したペクチンの分子量の下限を明らかにした。

4. 要約

エンド型のポリガラクトツロナーゼを生産する酵母 *Kluyveromyces fragilis* の培養上清を粗酵素液として用い、市販のレモンペクチンを pH 4.8 で 40℃、2 時間および 24 時間加水分解することにより、分子量 185,000 (MP) および 66,000 (LP) の二種の低分子ペクチンを調製した。これらの低分子ペクチンの生理活性は、高コレステロール食に各低分子ペクチン 5% を含有させた飼料を SD 系ラットに 27 日間与え、血中コレステロール含量、肝臓内コレステロール含量、盲腸重量および盲腸内容物の pH などを測定することにより検定した。その結果、

1. 低分子ペクチンの粘度は元のペクチンの 1/6 (MP) 、および 1/20 (LP) に低下した (5 % 溶液、22 °C において) 。
2. いずれの低分子ペクチンとも盲腸重量の増加、盲腸内容物の pH の低下を認めた。
3. LP では血中コレステロール濃度の上昇抑制効果が失われていたが、MP では保持していた。また、レモンペクチンの添加による肝臓重量のコレステロール添加による増加の抑制、肝臓へのコレステロールの蓄積を抑制する効果は MP、LP とも認められなかった。

第三章 大豆ペクチン性多糖の構造に関する研究

おからは、大豆から蛋白質、油脂等を採取した後に得られる、豆乳を除いた残さであり、ペクチン様の多糖類を主成分とする食物繊維に富んでいるため、その利用の研究が進められている³⁹⁻⁴¹⁾。この大豆の酸性多糖については構成糖、結合様式などの有機化学的な研究が既に報告されており、この多糖が果実ペクチンなどとは異なり中性糖を多く含むユニークな構造を持つことが明らかにされている^{14,15,42,43)}。

一方、ペクチン性多糖は一般に直鎖のガラクトツロナン (GN) 領域と分岐したラムノガラクトツロナン (RG) 領域からなっている⁴⁴⁻⁴⁹⁾。そのGN領域の分子内分布と量、RG領域から分岐する側鎖中のアラビノガラクトサンの構造については、酵素の分解限度をHPLCで分析する方法で調べられている⁴⁸⁻⁵¹⁾。しかし、大豆多糖のより詳細な分子構造は、RG領域から分岐する側鎖中のガラクトースが単一のポリマーから構成されていることを示唆した報告を除くと^{50,51)}、まだあまり検討されていない。

著者は、大豆おからの有効利用を目的とした一連のペクチン性多糖の研究に着手したが、本章では大豆おからからのペクチン性多糖の抽出、精製条件を検討し、さらにこの精製した大豆ペクチン性多糖に基質特異性の異なるヘミセルラーゼおよびペクチナーゼを作用させ、分子レベルでの構造について検討した^{52,53)}。

1. 実験材料及び方法

1-1 実験材料

ペクチン性多糖を得るために用いた乾燥大豆おからは、みずず豆腐（株）から贈与されたものを使用した。酵素の基質として用いたポリガラクトuron酸としては、酸不溶性ペクチン（AIP、レモン）を²⁴⁾、ヘミセルロースとしては、アラビノ-3,6-ガラクトン（カラマツ）、ビートアラビナン⁵⁴⁾およびコーンヘミセルロース⁵⁵⁾を使用した。

架橋細胞壁（CLCW）は畑中らの方法⁵⁶⁾で調製したものを使用した。すなわちアルカリ鹼化したハッサク果皮中のアルコール不溶成分に、エピクロロヒドリン、DMSOを加え細胞壁中の高分子同志を架橋させた後に、洗浄により微粒子を取り除いたものを用いた。

1-2 酵素の調製法

Exopolygalacturonase（exo-PG, EC 3.2.1.67）は西洋人参から⁵⁷⁾、endo-polygalacturonase（endo-PG, EC 3.2.1.15）は *K. fragilis* の培養上清から²¹⁾、井上らの方法でそれぞれ精製した。

Exopolygalacturonate lyase（exo-PGL, EC 4.2.2.9）は、家護谷らの方法⁵⁸⁾を改変し、架橋ペクチン酸を CLCW に置き換えた方法で精製した。ドリセラゼは協和発酵より贈与されたものを、松橋らの方法で低分子成分を除去したものを用いた²⁵⁾。市販の酵素剤としては、セルラーゼ A アマノ 3（天野製薬、*Aspergillus niger* 由来）を使用した。

1-3 大豆ペクチン性多糖の抽出法

2% ヘキサメタリン酸溶液の液量を 250 ml に固定し、乾燥おからの量を 5 g、10 g と変化させた。80℃、3.5 時間加熱した後に、さらしでろ過することにより抽出画分

と残さに分けた。残さはさらに新しいヘキサメタリン酸ナトリウムで抽出を2回繰り返し、計3回抽出を行った。各抽出液は流水中で1晩透析し、抽出液中の低分子化合物を除去した後に、エバポレーターで濃縮、さらに脱イオン水に対して透析した。この試料に70%になるようにエタノールを加え、室温で1時間放置することにより沈澱を得た。この沈澱を80%エタノール、99%エタノール、アセトンで順次洗浄した後に風乾させて大豆ペクチン性多糖の標品とした。

1-4 DEAE-セルロースクロマトグラフィーによる大豆ペクチン性多糖の精製

多糖の精製は、従来から中性糖を多く含むペクチン性多糖の精製に用いられている酸性条件下でのDEAE-セルロースクロマトグラフィーと^{59,60)}、アルカリ条件下でのDEAE-セルロースクロマトグラフィーによって行った。

1) 酸性下の方法、展開剤：リン酸緩衝液、pH 6.0⁵⁹⁾

0.02Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したDEAE-セルロース(0.9meq./g, Brown Co.)のカラム(3×18 cm)に、200mgの大豆ペクチン性多糖を含んだ0.02Mリン酸緩衝液(pH 6.0)400mlを添加した。同緩衝液で十分にカラムを洗浄した後、同緩衝液450mlから0.6M NaClを含んだ0.02Mリン酸緩衝液450 mlへの勾配溶出により、吸着成分を溶出した。続けて、0.1N NaOHによる溶出を行った。流速2.0ml/min、フラクションの液量10 ml/tubeとした。

各フラクションはフェノール硫酸法⁶¹⁾により全糖量を、硫酸カルバゾール法⁶²⁾によりウロン酸含量を測定し、必要画分を集めて流水中および脱イオン水で透析した後、70%になるようにエタノールを加え、多糖の沈澱を得た。沈澱を遠心分離により回収した後、沈澱を70%エタノール、エタノール、アセトンで順次洗浄し風乾させ大豆ペクチン性多糖試料とした。

2) アルカリ性下の方法、展開剤：炭酸緩衝液、pH 9.0→11.0⁶³⁾

0.02M NaHCO₃で平衡化したDEAE-セルロース(3×18cm)に、200mgの大豆

ペクチン性多糖を含む 0.02M NaHCO₃ 400ml を添加し洗浄後、0.1 M NaHCO₃ 450ml から 0.1M Na₂CO₃ 450ml への pH 勾配により溶出した。最後に 0.1N NaOH により溶出した。流速は 2.0ml/min、フラクションは 10 ml/tube とした。

3 画分にプール後、Amberlite AG IR-120 (H⁺) を加え pH を 4 にまで下げ、ロータリーエバポレーターで濃縮、70% エタノールで沈澱化、沈澱を 70% エタノール、エタノール、アセトンで順に洗浄し大豆ペクチン性多糖の試料とした。

1-5 タンパク質含量の測定法

タンパク質含量はローリーらの方法⁶⁴⁾で測定した。

1-6 大豆ペクチン性多糖の分子量の測定法

大豆ペクチン性多糖の分子量は HPLC によるゲルろ過で測定した。その測定条件を下に記す。

Column, Asahipak GS-710 (7.6×500mm); pre-column, Asahipak GS-20G (7.6×50mm); solvent, 0.02M acetate buffer (pH6.0); column temperature, room temperature; flow rate, 1.0ml / min; detector, RI; injection, 50μl

1-7 ウロン酸、中性糖含量の測定法

酵素-HPLC 法によるウロン酸、中性糖含量の測定は松橋らの方法²⁵⁾に従った。すなわち、限外ろ過により低分子化合物を除去したドリセラゼを、多糖試料に 38℃で 48 時間反応させた後、反応液を Molcut IIGC (Millipore) で限外ろ過し、そのろ液を Shodex SH1821 を用いた HPLC 法で分析した。Column, Shodex SUGAR SH 1821 (8×300 mm); pre-column, Shodex SUGAR SH1011P (6×50 mm); column temperature, 40℃; flow rate, 1.0ml/min; mobile phase, 0.001N H₂SO₄

1-8 中性糖組成の分析

1N トリフルオロ酢酸 (TFA) 中で 100℃、2 時間加温することにより多糖試料を加水分解後⁶⁵⁾、アルジトールアセテート化し GLC を用いる日下部らの方法で中性糖組成を分析した。内部標準として α -メチル- β -D-グルコシドを用いた⁶⁶⁾。GLC の条件は以下の通り。Column, 3% ECNSS-Mon Gas CHROMQ, 60-80 mesh (3 x 2000 mm); detector, FID; column temp., 170→200℃ (1℃/min) ; injection temp., 25℃ ; carrier, N₂ (flow rate 30 ml/h)

1-9 多糖加水分解酵素活性の測定法

酵素活性の測定法は、改変ソモギー法による放出還元糖の定量 (以下改変ソモギー法)⁶⁷⁾を用いた。酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の還元糖を放出する量を 1 unit として表した。

1-10 セルラーゼ A の各酵素活性への分画法

セルラーゼ A アマノ 3 の熱処理を行った後、DEAE-Toyopearl 650M によるクロマトグラフィーにより 3 酵素画分得られた。すなわち、セルラーゼ A を水に懸濁、遠心分離により不溶物を除去した後、PM-10 を用いた限外ろ過により 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に置換しながら濃縮し、60℃で 20 分間加熱処理を行った。この処理液の pH を 7.0 に調整した後、0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Toyopearl 650M のカラムに添加し、同緩衝液でカラム洗浄後、塩化ナトリウムの直線的濃度勾配 (0→0.5M) により酵素を溶出した。大豆ペクチン性多糖を基質として用いた酵素反応後、生成物を HPLC 分析しその結果から判断して、F1, F2, F3 と名づけた酵素の 3 画分を得、さらに以下の方法で各画分を精製した。

1-11 3 酵素画分の部分精製

1) F1 画分の精製 : F1 画分中の *exo* 型ガラクタナーゼは以下の方法で精製した。

DEAE-Toyopearl 650M クロマトグラフィーにより得られた F1 画分を、限外ろ過により 0.02M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に交換後、4M になるように NaCl を加えた

(520ml) 。これを 4M NaCl を含んだ 0.02M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に平衡化した Butyl-Toyopearl 650C カラム (2×20 cm) に添加した。次いで NaCl の直線的濃度勾配 (4.0→0M) により溶出した。ガラクタナーゼ活性は溶出画分に認められたので、回収後限外ろ過により 0.02M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に交換、濃縮した。これを同緩衝液に平衡化した架橋細胞壁 (CLCW) カラム^{56,68)} (3×17cm) に添加、洗浄後、0.5M NaCl を含む 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で溶出させた。活性を含む画分を集め限外ろ過により濃縮後、0.25M NaCl を含む 0.01M 酢酸緩衝液を展開剤とした Sephacryl S-200 (1×92cm) カラムによるゲルろ過を行い、*exo* 型ガラクタナーゼ標品を得た。

2) F2、3 画分の精製 : *exo* 型のアラビナーゼを含んだ画分である F2 画分、*endo* 型のガラクタナーゼを含んだ画分である F3 画分の精製は、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーにより得られた各画分を、それぞれ CLCW によるアフィニティクロマトグラフィーとゲルろ過によって行った。以上の過程は CLCW カラムのサイズを 3×12 cm とした他は、F1 画分と同様であった。

1-12 酵素の分子量の測定

1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による分子量の測定 :

SDS-PAGEは、Laemili の系で SDS 濃度 12 % の分離ゲルで行った⁶⁹⁾。分子量マーカーとしては SDS-PAGE 用分子量マーカー (ファルマシア) を使用した。

2) ゲルろ過による分子量の測定⁷⁰⁾ : Sephacryl S-200 (1 x 92 cm) によるゲルろ過の溶出位置から算出した。マーカーとしてはホスホリラーゼ (94,000)、牛血清アルブ

ミン (68,000)、卵白アルブミン (45,000)、キモトリプシノーゲン (27,500) を用いた。

1-13 多糖分解限度の HPLC による測定

1) ヘミセルラーゼ分解限度の測定：ペクチン側鎖分解酵素を含む F1 画分と F2 画分を使用し、前述の HPLC 法による中性糖の含量測定（本章 1-7）の条件を用い分解産物であるガラクトース、アラビノースを定量することにより行った。酵素液 100 μ l を、最終濃度が 0.5% 大豆ペクチン性多糖、0.1%グリセロールを含む 0.05M 酢酸緩衝液（pH 4.0）になるように調製した反応液 900 μ l に加え、35°C で 48 時間反応させた後、Molcut II GC（分画分子量 1×10^4 、Millipore）により限外ろ過し、ろ液 50 μ l を HPLC で分析し、中性糖とガラクトツロン酸を定量することにより分解限度を測定した。

2) ペクチナーゼ分解限度の測定：ペクチナーゼによる分解限度の測定は松橋の方法⁴⁹⁾に従った。

Exo-PG の場合は、基質 0.1%、exo-PG 0.1units / ml、グリセロール（内部標準）0.1%および酢酸緩衝液（pH 5.0）0.05M になるように反応液を調製し、35°C で 48時間インキュベートした。反応液は Molcut II GC でろ過後、上記の系の HPLC でガラクトツロン酸として定量した。

Exo-PGL の場合は、ペクチン性多糖 0.1%、exo-PGL 0.1 units / ml、グリセロール 0.1%およびトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）0.05M を含む反応液を、35°C で 48時間インキュベートし、Molcut II GC でろ過し、ろ液を HPLC 分析に供し、4,5-不飽和ジガラクトツロン酸として定量した。

Exo-PG と endo-PG の共同反応は、exo-PG の反応液組成に endo-PG 0.1 units / ml を加えた反応液で、exo-PG と同様の方法で実験した。

2. 実験結果

2-1 大豆ペクチン性多糖の抽出、精製

(1) 抽出条件の検討

加える 2% ヘキサメタリン酸溶液の液量を 250 ml に固定し、乾燥おからの量を 5 g, 10g と変化させた際の各抽出画分のウロン酸含量と蛋白質含量を定量し、その結果を Fig. 6 に示す。5 g のおからからスタートした場合にはウロン酸含量が 1 回目で最大になるのに対し、蛋白質含量の目安である 280 nm における吸光度は、抽出回数を増すに連れて増加し 3 回目の抽出画分が最も高かった。一方、10 g おからからスタートした場合には、1 回目の抽出画分ではウロン酸含量、蛋白質含量とも低く、2 回目の抽出で最大となった。この結果は今回使用した乾燥おからでは、膨化のために初めにある程度の量の溶媒をおからに吸収させる必要があることを示唆している。

以上の結果から、2% ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液を乾燥おから重量の 50 倍容量加え、80℃で 3.5時間加熱することによって、ペクチン性多糖を効率的に抽出できることが明らかになった。また、三回の繰り返しでほぼ完全に抽出できた。

次ぎに、このデータを基にして 6 倍のスケールアップを行い、2-2 以降の実験の標品を調製した。抽出液は、流水で透析、濃縮、脱イオン水に透析後、70% エタノールでペクチン性多糖を沈澱させ、さらに沈澱を 80% エタノール、99% エタノール、アセトンで洗浄しペクチン性多糖標品とした。1 回目の抽出液から 4.89 g、2 回目の抽出液から 1.02 g、3 回目の抽出液から 0.83 g が得られ、総計は 6.74 g (収率 22.47%) であった。

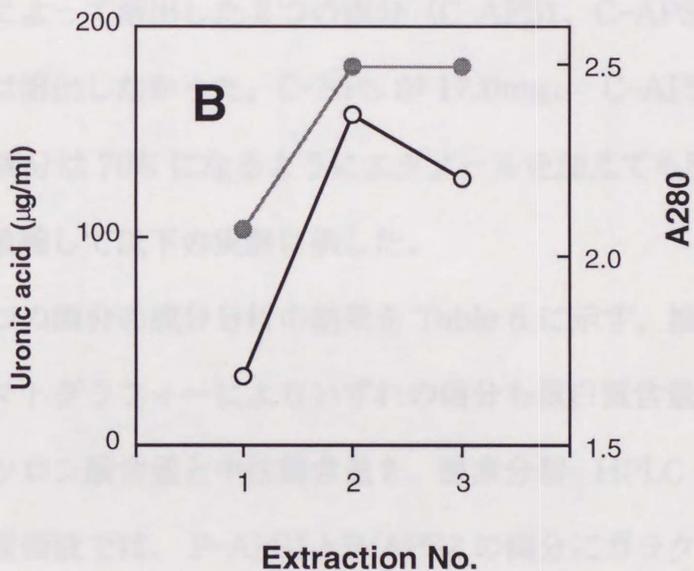
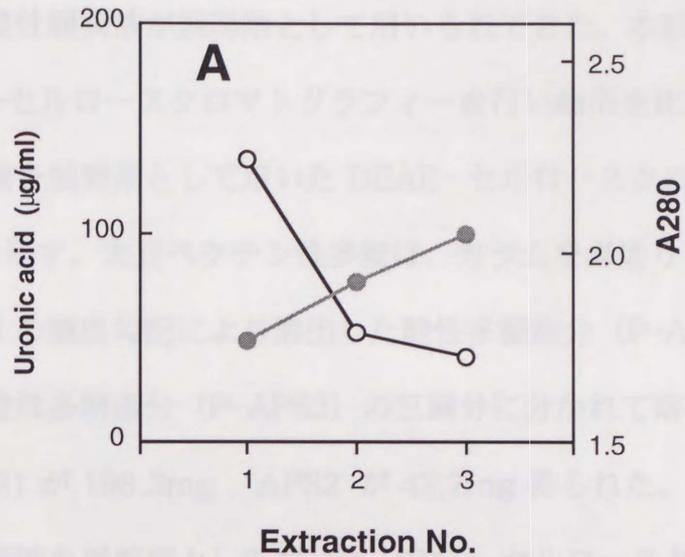


Fig. 6. Extraction of Pectic Polysaccharides from 5g (A) and 10g (B) Soybean okara with 2% Sodium Hexametaphosphate Solution (250 ml, pH 4.0).

○, uronic acid content (carbazole method); ●, protein content (absorbance at 280 nm).

(2) 大豆ペクチン性多糖の精製

炭酸緩衝液などのアルカリ条件下での DEAE-セルロースクロマトグラフィーは、よい分離能を持つことが報告されている⁶³⁾が、ペクチンの脱エステル化反応やβ-脱離

反能が起こるためにペクチンの構造分析に用いることは出来ず、この目的ではリン酸や酢酸などの酸性緩衝液が展開剤として用いられてきた。本節では pH の異なる展開剤での DEAE-セルロースクロマトグラフィーを行い結果を比較した。

リン酸緩衝液を展開剤として用いた DEAE-セルロースクロマトグラフィーの結果を Fig. 7. A に示す。大豆ペクチン性多糖は、カラムを素通りした中性多糖画分 (P-NPS) と NaCl の濃度勾配により溶出した酸性多糖画分 (P-APS1) と NaOH 溶液により溶出した酸性多糖画分 (P-APS2) の三画分に分かれて溶出した。NPS が 20.2mg、APS1 が 198.3mg、APS2 が 42.7mg 得られた。

次に炭酸緩衝液を展開剤として用いた DEAE-セルロースクロマトグラフィーの結果を Fig. 7. B に示す。大豆ペクチン性多糖は、中性多糖画分 (C-NPS) と、炭酸緩衝液の pH 勾配によって溶出した 2 つの画分 (C-APS1、C-APS2) に分画でき、NaOH 溶液では溶出しなかった。C-NPS が 17.0mg、C-APS2 が 92.0mg 得られたが、C-APS1 画分は 70% になるようにエタノールを加えても沈澱しなかったため、9.1ml にまで濃縮して以下の実験に供した。

得られた 6 つの画分の成分分析の結果を Table 6 に示す。抽出物に比べ DEAE-セルロースクロマトグラフィーによりいずれの画分も蛋白質含量を減少させることができた。ガラクトuron酸含量と中性糖含量を、酵素分解-HPLC 法で分析した結果をみると、リン酸緩衝液では、P-APS1 と P-APS2 の画分にガラクトuron酸が分かれて溶出したのに対し、炭酸緩衝液ではガラクトuron酸の大部分は C-APS2 に溶出した。リン酸緩衝液で精製した場合に得られる主要画分 P-APS1 が、炭酸緩衝液を展開剤として用いた場合には、ガラクトuron酸を多く含む画分と少ない画分に分かれて溶出していると考えられる。このようによい分離を示した炭酸緩衝液を展開剤とする各画分の特性についてさらに分析した。

Table 7 に C-NPS、C-APS1、C-APS2 各画分の中性糖組成を示す。DEAE-セルロースクロマトグラフィー前の分析結果では、Gal、Ara が主要な構成糖であっ

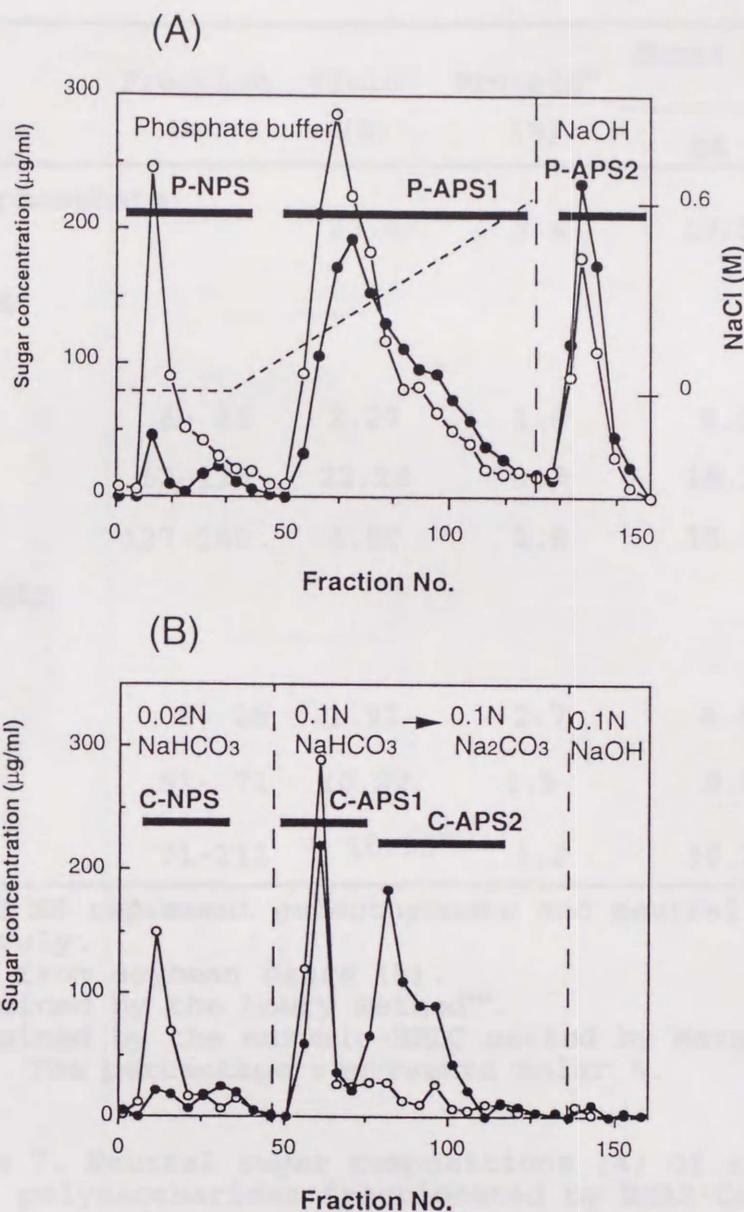


Fig. 7. DEAE-Cellulose Chromatography of Soybean Pectic Polysaccharide.

(A) The extract (0.05% solution in 0.02M phosphate buffer, pH 6.0 ; 400 ml) was added to a DEAE-cellulose column (3.0 x 18 cm) equilibrated with the same buffer. The column was eluted successively with 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0), a linear gradient of NaCl (0→0.6 M) in the same buffer, and 0.1 M NaOH. Fractions of 10 ml each were collected.

(B) The extract (0.05% solution in 0.02 M NaHCO₃ ; 400 ml) was added to a DEAE-cellulose column (3.0 x 18 cm) equilibrated with the same solution. The column was eluted successively with 0.02M NaHCO₃, a pH gradient of bicarbonate buffer (0.1 M NaHCO₃→0.1 M Na₂CO₃), and 0.1 M NaOH. Fractions of 10 ml each were collected.

O, total carbohydrate content ; ●, uronate content.

Table 6. Fractionation of soybean pectic polysaccharides by DEAE-Cellulose chromatography

	Fraction No.	Yield ^{a)} (%)	Protein ^{b)} (%)	Sugar Composition ^{c)} (%)	
				GA	NS
Hexametaphosphate extract		22.47	9.4	18.5	81.5
<u>Phosphate buffer</u>					
P-NPS	6- 46	2.27	1.8	8.3	91.8
P-APS1	52-126	22.28	1.8	18.3	81.7
P-APS2	127-160	4.80	1.8	15.6	84.4
<u>Bicarbonate buffer</u>					
C-NPS	6- 26	1.91	2.7	4.4	95.6
C-APS1	51- 71	10.22	1.5	9.5	90.5
C-APS2	71-111	10.33*	1.2	36.2	63.8

GA and NS represent galacturonate and neutral sugar, respectively.

a) Yield from soybean *okara* (%).

b) Determined by the Lowry method⁶⁴⁾.

c) Determined by the enzymic-HPLC method by Matsushashi *et al*²⁵⁾. The percentage represents molar %.

Table 7. Neutral sugar compositions (%) of soybean pectic polysaccharides fractionated by DEAE-Cellulose chromatography with carbonate buffer

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Hexametaphosphate extract	2.3	5.3	15.1	6.9	2.1	60.3	8.0
C-NPS	2.4	2.2	11.4	3.6	3.4	61.6	15.4
C-APS1	3.6	4.1	20.5	6.7	2.1	57.3	5.7
C-APS2	5.0	5.5	19.5	12.8	1.2	53.0	3.0

Sugar constituents were analyzed according to the gas-chromatography method by Kusakabe *et al*⁶⁶⁾. Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Ara, arabinose; Xyl, xylose; Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose.

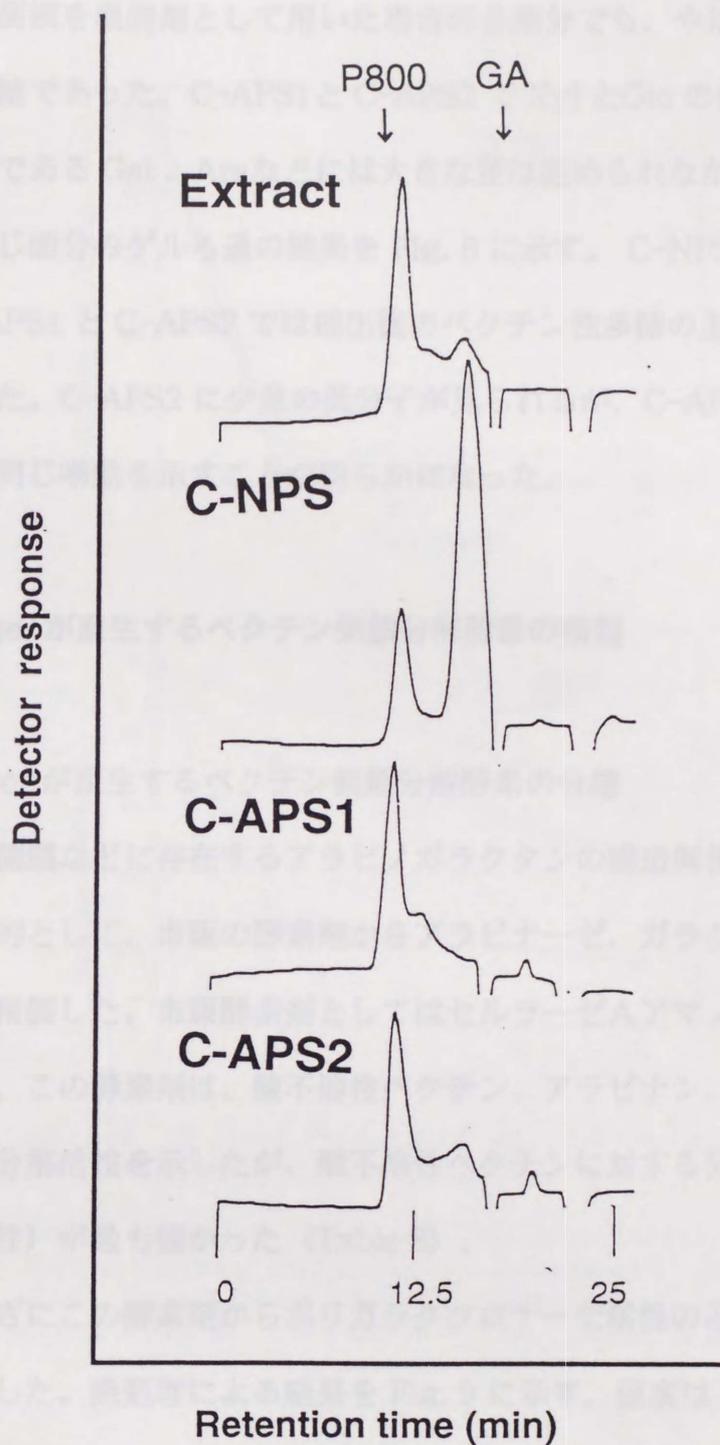


Fig. 8. Gel Filtration Patterns of Soybean Pectic Polysaccharides Fractionated by DEAE-Cellulose Chromatography with Bicarbonate Buffer.

Operating conditions: column, Asahipak GS-710, 7.6 x 500 cm; pre-column, Asahipak GS-20G, 7.6 x 50 mm; mobile phase, 0.02 M acetate buffer, pH 6.0; column temperature, room temperature; flow rate, 1.0 ml/min; detector, RI; injection, 50 μ l of 1% solution of each fraction. P-800 and GA indicate the retention times of P-800 (MW. 75.8×10^4) and galacturonate, respectively.

た。炭酸緩衝液を展開剤として用いた場合の各画分でも、やはり同様に Gal、Ara が主要な構成糖であった。C-APS1と C-APS2 で Xyl とGlc の量に差があるものの、主要な構成糖である Gal、Araなどには大きな差は認められなかった。

次に、同じ画分のゲルろ過の結果を Fig. 8 に示す。C-NPS で低分子成分が多く溶出し、C-APS1 と C-APS2 では抽出後のペクチン性多糖の主要成分である高分子成分が溶出した。C-APS2 に少量の低分子が見られるが、C-APS1と C-APS2はゲルろ過ではほぼ同じ挙動を示すことが明らかになった。

2-2 *A. niger* が産生するペクチン側鎖分解酵素の精製

(1) *A. niger* が産生するペクチン側鎖分解酵素の分離

ペクチン側鎖などに存在するアラビノガラクトランの構造解析に用いる酵素の調製法の確立を目的として、市販の酵素剤からアラビナーゼ、ガラクタナーゼなどのヘミセルラーゼを精製した。市販酵素剤としてはセルラーゼAアマノ（以下セルラーゼA）を使用した。この酵素剤は、酸不溶性ペクチン、アラビナン、アラビノガラクトランなどに対して分解活性を示したが、酸不溶性ペクチンに対する分解活性（ポリガラクトツロナーゼ活性）が最も強かった（Table 8）。

そこでつぎにこの酵素剤からポリガラクトツロナーゼ活性のみを選択的に失活させる方法を検討した。熱処理による結果を Fig. 9 に示す。温度は 60℃に固定し、pH 4 から 7、加熱時間を 10 から 40 分間に変え、各酵素の残存活性を調べた。ポリガラクトツロナーゼ活性は、10 分間の熱処理でいずれの pH においても 90%以上が失活した。特に、pH 5-7 においては 20 分間の処理でほぼ完全に失活させることが出来た。一方、ガラクタナーゼ活性は 20 分間の処理でも酸性条件下では 65%以上が残存し、40 分間の処理でもまだかなりの活性が残存していた。また、pH が低いほど酵素活性の残存性は高い傾向にある。以上のようにガラクタナーゼはポリガラクトツロナーゼよりも

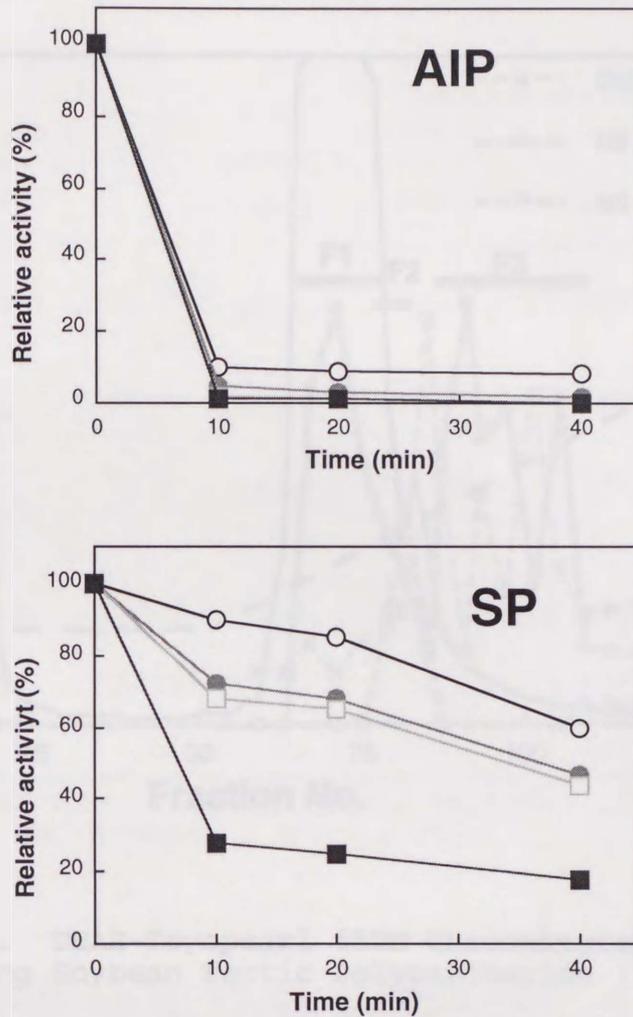


Fig. 9. Effect of Heat Treatment on the Polygalacturonase and Galactanase Activities of Cellulase A Amano 3.

Cellulase A Amano 3 solution was incubated at 60°C for 10-40 min. Enzyme Assay conditions: substrate, acid-insoluble pectate (AIP) or soybean pectic polysaccharide (SP); buffer, 0.1 M acetate buffer; ○, pH 4.0; ●, pH 5.0; □, pH 6.0; ■, pH 7.0.

熱に安定であることから、ヘミセルラーゼ精製の第1段階として熱処理を行うこととした。まず、セルラーゼAを水に溶解、遠心分離により不溶物を除去した後に、60°C、20分間、熱処理を行った。Table 8に熱処理前後の酵素活性の収支を示す。酸不溶性ペクチン（AIP）分解活性は熱処理により約1/1600に減少したのに対し、他の基質の分解活性は1/2程度の減少に留まった。

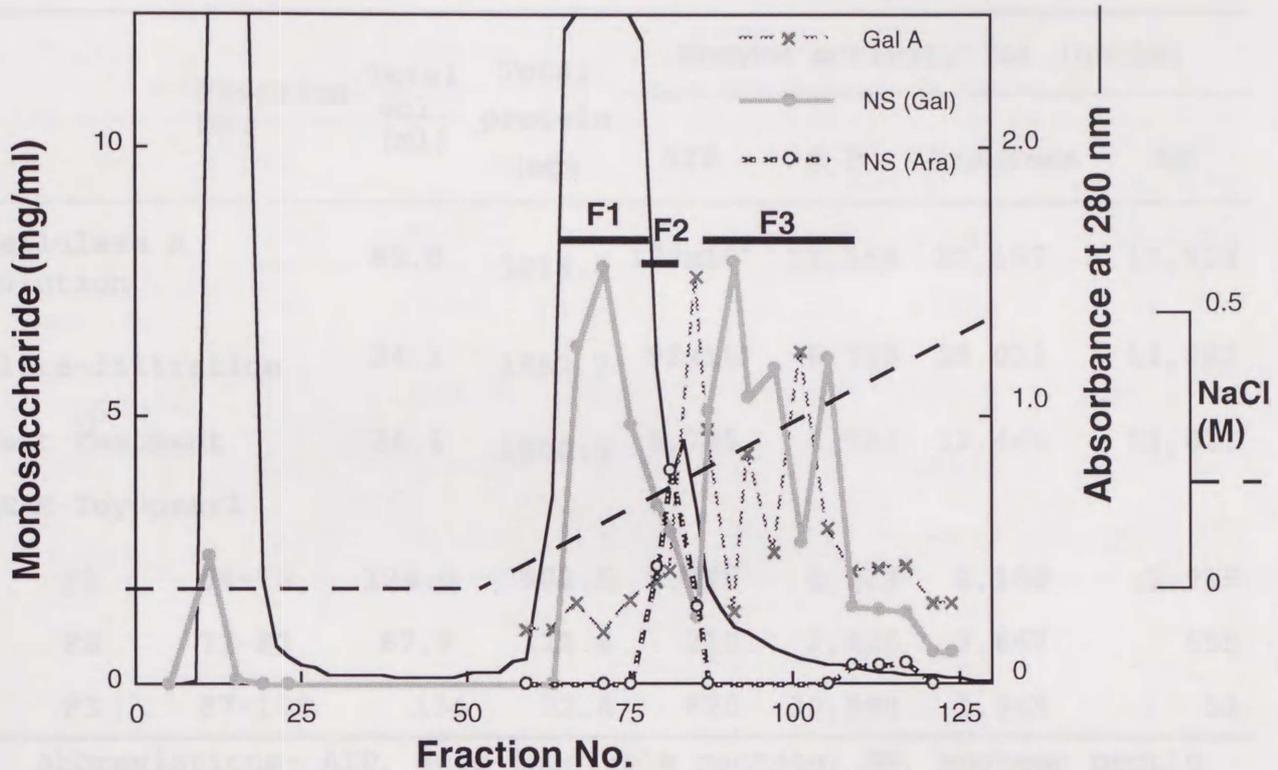


Fig. 10. DEAE-Toyopearl 650M Chromatography of the Enzyme Degrading Soybean Pectic Polysaccharide (SP).

Fractions were assayed for protein by spectrophotometry at 280 nm and for SP degradation activity by the HPLC method.

NS, neutral sugar; Gal A, galacturonate.

次にこの熱処理した酵素溶液を DEAE-Toyopearl 650M により精製した (Fig. 10)。Fraction No.64-76 にガラクタナーゼ活性、77-84 に exo 型のアラビナーゼ活性、87-100 にガラクタナーゼ活性が検出され、それぞれ F1、F2、F3 画分とした。その各画分のそれぞれの基質に対する分解活性を Table 8 に示す。アラビナン分解活性は F2 画分、アラビノ-3,6-ガラクトン分解活性は F1 画分が強かったのに対し、大豆ペクチン性多糖分解活性はその大部分が F3 画分に分布していた。また、HPLC 分析の結果では F1、F2 画分ではそれぞれ単糖が得られているのに対し、F3 画分を大豆ペクチン性多糖に作用させるとそのオリゴ糖が得られたこと (データ未記

Table 8. Partial purification of the enzymes degrading pectin side-chains

Fraction No.	Total vol. (ml)	Total protein (mg)	Enzyme activity for (units)				
			AIP	S P	Arabinan	AG	
Cellulase A solution	85.0	3216.4	178x10 ⁵	12,169	27,157	17,722	
Ultra-filtration	34.1	1662.7	92x10 ⁵	6,789	19,033	14,242	
Heat treatment	34.1	1800.5	5,785	3,563	12,446	11,821	
DEAE-Toyopearl							
F1	64-76	124.0	901.5	2,775	5,113	2,108	1,915
F2	77-83	67.9	112.4	210	3,426	3,667	655
F3	87-100	134	32.4	620	30,998	1,943	53

Abbreviations: AIP, acid-insoluble pectate; SP, soybean pectic polysaccharide; AG, arabino-3,6-galactan.

載) より F1、F2 は exo 型、F3 は endo 型酵素と判断した。また、F1 がアラビノ-3,6-ガラクトンに作用できるのに対し、F3 は作用できなかった。これは作用様式のみではなく、基質特異性についてもそれぞれが異なることを示唆している。

(2) Endo-β-D-1,4-galactanase の精製、およびその特性

初めに大豆ペクチン性多糖分解活性が最も強かった F3 画分を精製した。まず、限外ろ過により濃縮、溶媒交換した後に、CLCW および Sephacryl S-200 によるゲルろ過によって精製した (実験の詳細は本章 1-11 参照)。以上の精製における活性の収支を Table 9 に示すが、大豆ペクチン性多糖分解活性についてはセルラーゼ A から 1735 倍精製されていた。この酵素は SDS-PAGE において分子量 35 k Da の単一バンドを示し、均一な蛋白質にまで精製できたことが示された (Fig. 11)。

Table 10. Hydrolysis rate of various polysaccharides with the F3 enzyme

Table 9. The purification of a enzyme (F3) degrading pectic polysaccharide side-chain from Cellulase A Amano 3

POLYSACCHARIDE	vol. (ml)	Protein		Enzyme activity for SP		Specific activity units/mg
		mg/ml	total	units/ml	total	
Cellulase A solution	85	37.84	3216.4	143.20	12169.0	3.78
DEAE-Toyopearl	134	0.274	32.23	694.00	30998.7	955.87
CLCW	133	0.055	7.315	141.55	18826.2	2537.64
Gel filtration	40	0.062	2.489	405.83	16233.0	6545.57

Abbreviations: AraF, arabinofuranose; Galp, galactopyranose; Xylp, xylopyranose; Galpa, galactopyranic acid.

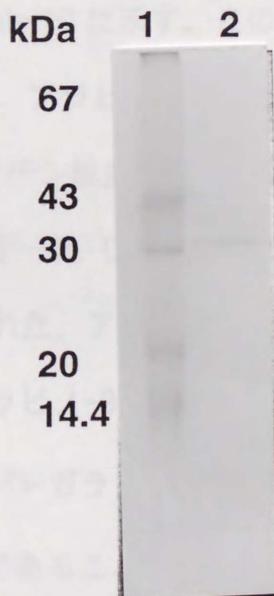


Fig. 11. SDS-Polyacrylamide Gel (12.5%) Electrophoresis of the F3 Enzyme.

Lane 1, bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,000), and lysozyme (14,400) as molecular mass standards; lane 2, purified F3 enzyme.

Table 10. Hydrolysis rate of various polysaccharides with the F3 enzyme

Polysaccharide	Major linkage	Relative rate (%)
Soybean pectic polysaccharide	α -1,4-GalpA, β -1,4-Galp, α -1,5-Araf, α -1,3-Araf	100
Polygalacturonan (AIP)	α -1,4-GalpA	2.91
Beet arabinan	α -1,5-Araf, α -1,3-Araf	1.68
Arabino-3,6-galactan	β -1,3-Araf, α -1,6-Araf β -1,3-Galp	0
Corn arabinoxylan	β -1,4-Xylp, α -1,3-Araf	4.27

Abbreviations: Araf, arabinofuranose; Galp, galactopyranose; Xylp, xylopyranose; GalpA, galactopyranoic acid.

F3 酵素の基質特異性を Table 10 に示す。この酵素は大豆ペクチン性多糖分解活性以外にも微弱な AIP 分解活性、アラビナン分解活性が検出された。

また、Fig. 12 に大豆のペクチン性多糖に反応させ、その分解産物を HPLC 分析した結果を示す。ガラクトトリオース (1.53%)、ガラクトビオース (13.94%)、ガラクトース (8.58%) が検出された。アラビノースを遊離することなしに大豆ペクチン性多糖に作用し、なおかつアラビノ-3,6-ガラクトンには作用しない (Table 10) という結果は、この酵素が β -1,4-D-ガラクトシド結合のみを切断する endo- β -1,4-D-galactanase (EC 3.2.1.89) であることを示唆している。

この酵素の反応至適条件は pH 3.5、および 55°C であった。この酵素は pH 4.5 と 7 の間 (4°C、24 時間) および 70°C 以下 (pH 4.0) で安定であった。

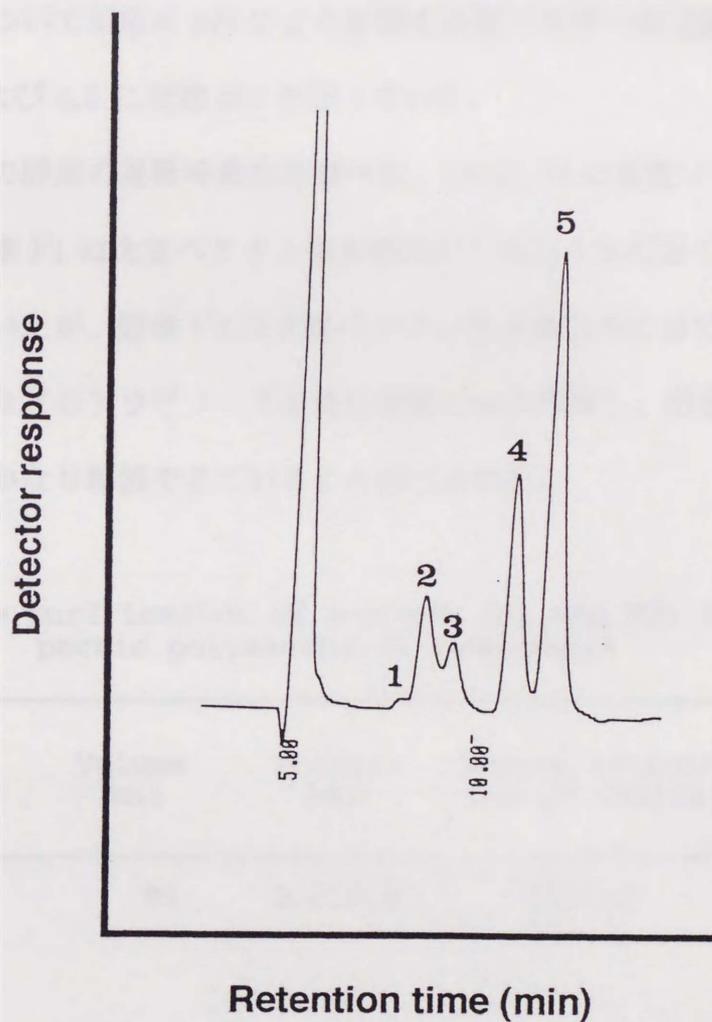


Fig. 12. HPLC Chromatogram of Degradation Products with the F3 Enzyme.

Operating conditions for HPLC: column, Shodex SUGAR SH1821 (8 x 300 mm); pre-column, Shodex SUGAR SH1011P (6 x 50 mm); mobile phase, 0.001 N sulfuric acid; column temperature, 40°C; flow rate, 1.0 ml/min; chromatograph, Jasco TRI ROTAR-IV; detector, Jasco RID-300.

Peak identity: 1, galactotriose; 2, galactobiose; 3, galactose; 4, glycerol (internal standard); 5, acetic acid.

(3) エキソ型グルコシダーゼの精製、およびその特性

F1 画分、F2 画分のエキソ型のグルコシダーゼ活性をさらにカラムクロマトグラフィーで精製を行った結果、それぞれ 19.5 倍、364 倍に精製された (Table 11)。酵素 F1 と F2 の分子量はゲルろ過法によりそれぞれ 75,000 および 55,000 と見積もられた。両酵素について反応の pH による影響を改変ソモギー法で調べたところ、それぞれ pH 4.0 および 4.5 に至適 pH を持っていた。

次に、これらの酵素の基質特異性を調べた。Table 12 に改変ソモギー法で定量した結果を示す。酵素 F1 は大豆ペクチン性多糖だけではなくまだ多くの基質に対して酵素活性を持っていたが、酵素 F2 は大豆ペクチン性多糖以外にはビートアラバン、アラビノキシランなどのアラビノースを含む多糖にのみ作用し、酵素活性的に見てアラビナーゼとしてかなり精製できていることが示された。

Table 11. The purification of enzymes (F1 and F2) degrading pectic polysaccharide side-chain

	Volume (ml)	Protein (mg)	Enzyme activity for SP (units)	Specific activity (units/mg)
Cellulase A	85	3,216.4	12,169	3.8
<u>F1 enzyme</u>				
DEAE-Toyopearl (F1)	124	901.5	5,116	5.6
Butyl-Toyopearl	740	116.1	4,921	42.4
CLCW	205	115.6	3,055	26.4
Sephacryl S-200	108	31.4	2,322	73.9
<u>F2 enzyme</u>				
DEAE-Toyopearl	134	112.4	3,426	30.5
CLCW	133	31.5	2,600	82.5
Sephacryl S-200	40	1.9	2,556	1,377.3

Table 12. Relative hydrolysis rate(%) of various polysaccharides by the F1 and F2 enzymes

	Major linkage	Relative activity (%)	
		F1	F2
Soybean pectic polysaccharide	α -1,4-GalpA, β -1,4-Galp, α -1,5-Araf, α -1,3-Araf	100	100
Polygalacturonan (AIP)	α -1,4-GalpA	57.9	0
Beet arabinan	α -1,5-Araf, α -1,3-Araf	46.3	101.0
Arabino-3,6-galactan	β -1,3-Araf, α -1,6-Araf β -1,3-Galp	88.6	0
Corn arabinoxylan	β -1,4-Xylp, α -1,3-Araf	259.8	14.1

Abbreviations: Araf, arabinofuranose; Galp, galactopyranose; Xylp, xylopyranose; GalpA, galactopyranoic acid.

Fig. 13 にこれらの酵素による分解産物の HPLC パターンを示す。酵素 F1 では大豆ペクチン性多糖からモノマーのガラクトツロン酸とガラクトースが検出された。このことから酵素 F1 には *exo* 型のポリガラクトツロナーゼとガラクタナーゼが含まれていることが示唆された。また、酵素 F2 ではモノマーのアラビノースが検出された。F2 のクロマトグラムで保持時間約 8 分のピークが見られたが、糖特有のフェノール硫酸法による発色が見られず糖以外の成分であると判断した。また、これらの酵素は、3 時間、48 時間とも単糖のみしか産出していないことから、単糖のみを産する *exo* 型の作用機作を持つことが示唆された。さらに F1 と F2 を協同で作用させると、ガラクトースとアラビノースが同時に遊離することがピークの肩となって表れた。

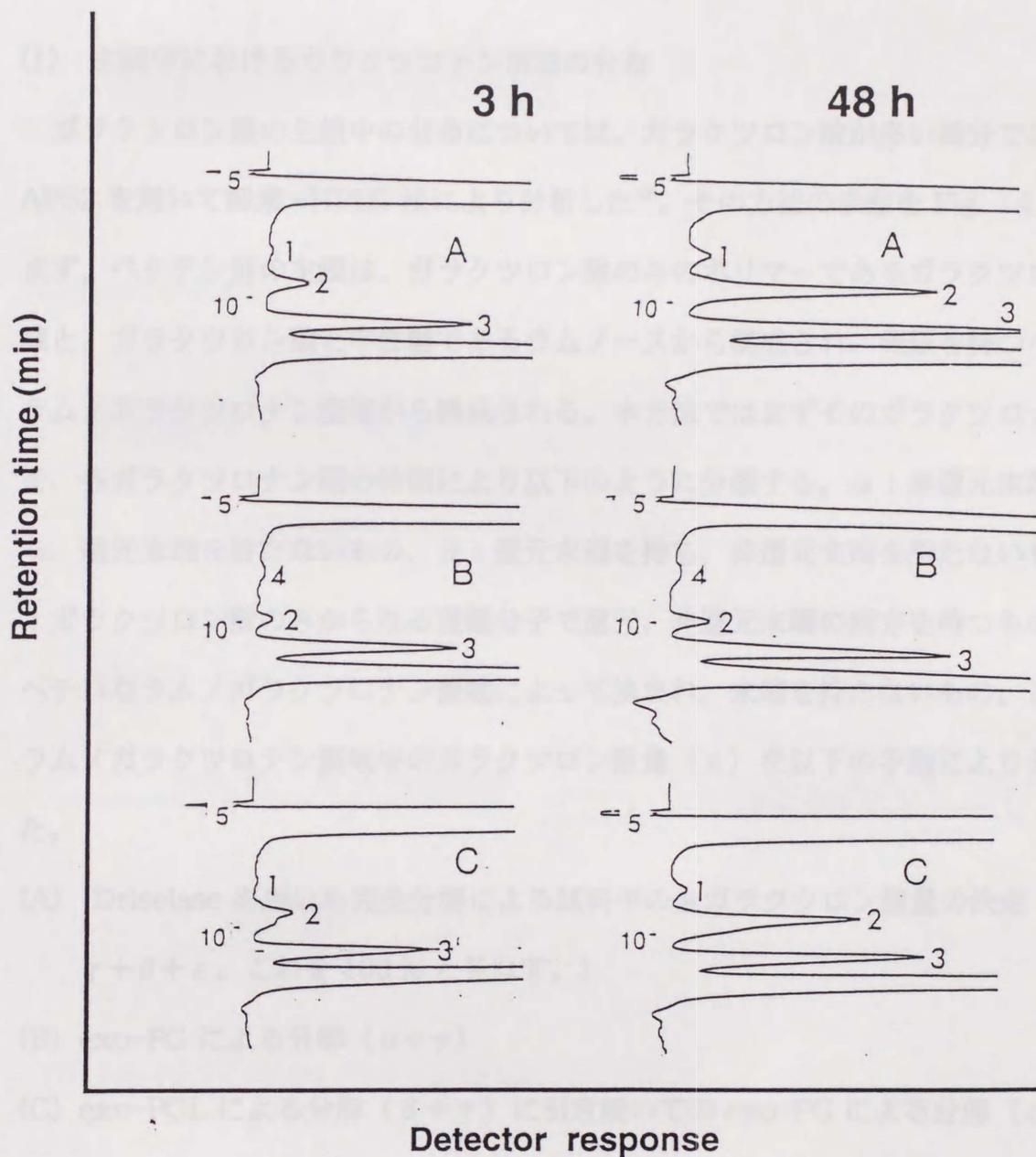


Fig. 13. HPLC Chromatograms of Degradation Products from SP with the F1 and F2 Enzymes.

Solution of soybean pectic polysaccharide (0.05%) in 50 mM acetate buffer (pH 4.0), containing 0.1% glycerol (internal standard for HPLC) and the enzyme (A, F1; B, F2; C, F1 and F2 in combination) were incubated at 35°C for 3 h or 48 h. Then the reaction mixture was filtered with a Millipore Molcuts II GC (50 μ l) was used for HPLC analysis. Operating conditions for HPLC were the same as shown in Fig. 12. Neutral sugars (galactose and arabinose) were eluted as single peak.

Peak identity: 1, galacturonate; 2, neutral sugar (galactose or arabinose); 3, glycerol (internal standard); 4, unknown peak.

2-3 酵素化学的手法による大豆ペクチン性多糖の構造解析

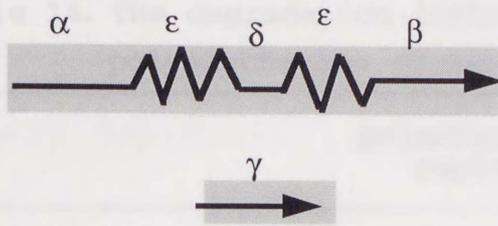
(1) 主鎖中におけるガラクトツロナン領域の分布

ガラクトツロン酸の主鎖中の分布については、ガラクトツロン酸が多い画分である C-APS2 を用いて酵素-HPLC 法により分析した⁴⁹⁾。その方法の手順を Fig. 14 に示す。まず、ペクチン質の主鎖は、ガラクトツロン酸のみのポリマーであるガラクトツロナン領域と、ガラクトツロン酸と中性糖であるラムノースから構成され、側鎖を持つヘテロなラムノガラクトツロナン領域から構成される。本方法ではまずそのガラクトツロナン領域を、各ガラクトツロナン鎖の特徴により以下のように分類する。 α ：非還元末端を持ち、還元末端を持たないもの、 β ：還元末端を持ち、非還元末端を持たないもの、 γ ：ガラクトツロン酸のみからなる遊離分子で還元、非還元末端の両方を持つもの、 δ ：ヘテロなラムノガラクトツロナン領域によって挟まれ、末端を持たないもの。これらとラムノガラクトツロナン領域中のガラクトツロン酸量 (ε) を以下の手順により分析した。

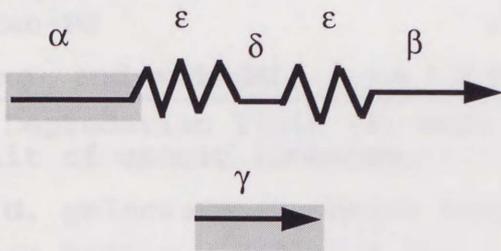
- (A) Driselase を用いた完全分解による試料中の全ガラクトツロン酸量の決定 ($\alpha + \beta + \gamma + \delta + \varepsilon$ 、これを 100 % と見なす。)
- (B) *exo*-PG による分解 ($\alpha + \gamma$)
- (C) *exo*-PGL による分解 ($\beta + \gamma$) に引き続いての *exo*-PG による分解 (α)
- (D) *exo*-PG と *endo*-PG の協同作用によるすべてのガラクトツロナン ($\alpha \sim \delta$) の分解 ($\alpha + \beta + \gamma + \delta$)

その C-APS2 に対する測定値を Table 14 に示す。その結果から予測される大豆ペクチン性多糖の構造は、*exo* 型の酵素により分解されることより末端にガラクトツロナンの部分を持ち、中央に中性糖を含んだ部分を持つ構造である (Fig. 15)。Exo-PGL と *exo*-PG を単独で順に反応させることにより全ガラクトツロン酸中の 84.4 % を遊離できること、*endo*-PG の反応性が低いことより、ラムノガラクトツロナンの間に

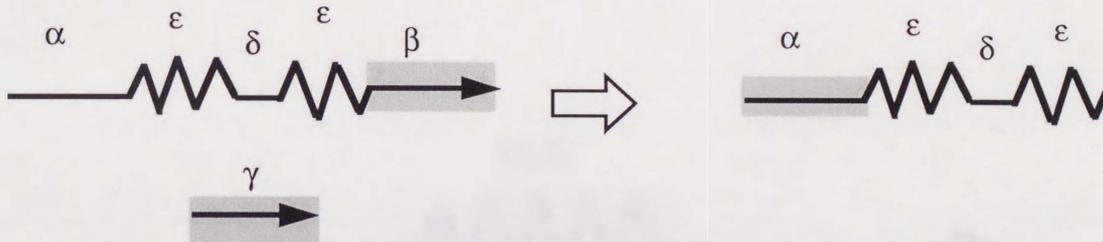
(A) Driselase $\Rightarrow \alpha + \beta + \gamma + \delta + \varepsilon$



(B) Exo-PG $\Rightarrow \alpha + \gamma$



(C) Exo-PGL \rightarrow Exo-PG $\Rightarrow \beta + \gamma \rightarrow \alpha$



(D) Exo-PG + Endo-PG $\Rightarrow \alpha + \beta + \gamma + \delta$

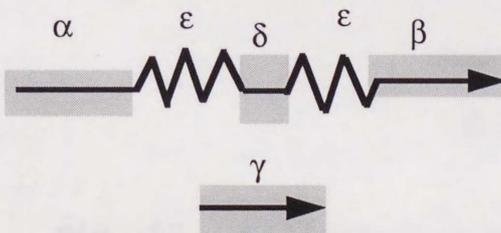


Fig. 14. A Scheme Showing the Estimation of Values of $\alpha \sim \varepsilon$.

Straight lines, notched lines and arrows indicate galacturonan regions, rhamnogalacturonan regions and the reducing ends, respectively.

Table 14. The degradation limit of purified soybean pectic polysaccharide (C-APS2) by pectinases

	galacturonan region ^{a)}	Degradation limit (%)
Exo-PG	$(\alpha + \gamma)$	32.8
Exo-PGL	$(\beta + \gamma)$	58.3
Exo-PG	α	26.1
Exo- and endo-PG	$(\alpha + \beta + \gamma + \delta)$	53.3

Degradation limit (%) were expressed as percentage split of uronic linkages.

a) α , galacturonan chains having a non reducing end; β , those having a reducing end; γ , those having both reducing and nonreducing ends; δ , those interposed between two rhamnogalacturonan regions.

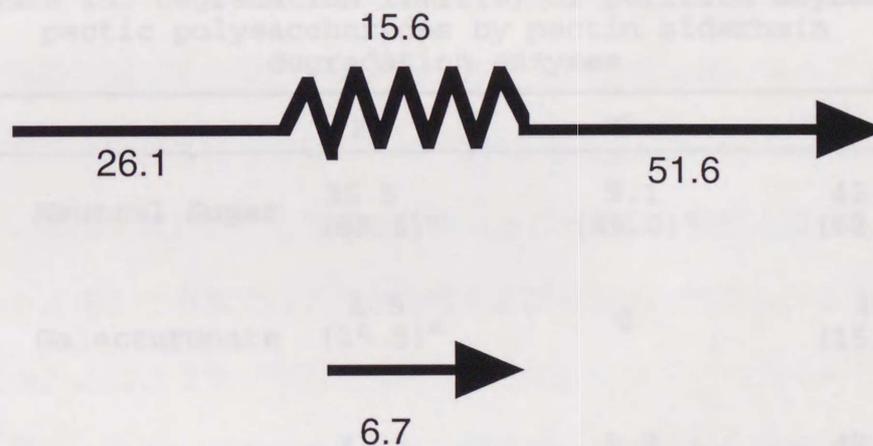


Fig. 15. Distribution of Galacturonan Regions in the Purified Soybean Pectic Polysaccharide (C-APS2).

Straight lines, notched lines and arrows indicate galacturonan regions, rhamnogalacturonan regions and the reducing ends, respectively. Figures express the percentages of galacturonic linkage distribution.

挟まれたガラクトツロナン領域 (δ) は存在しないことが示唆された。また、本来最も高い値であるはずの *exo*-と*endo*-PG の協同反応の値が、*exo*-PGL 単独より低い値になっている理由としては、C-APS2 中の側鎖による構造的な障害で *endo*-PG が作用できないためではないかと推測される。

(2) 側鎖部分の構造解析

このセルラーゼ A アマノ 3 から精製した *exo* 型のポリガラクトツロナーゼ活性とガラクタナーゼ活性を持つ F1 酵素と、*exo* 型のアラビナーゼ活性を持つ F2 酵素を APS1 と APS2 に作用させ、反応産物を HPLC で分析した。反応は、48 時間でほぼ完了していたので 48 時間反応させたものについて定量した。その測定値を Table 15 に示す。遊離した中性糖の値を見ると、APS1 ではその 50 から 70% が、APS2 ではその大部分を F1 あるいは F2 のみによって遊離することが出来た。また、F1 と F2

Table 15. Degradation limit(%) of purified soybean pectic polysaccharides by pectin sidechain degradation enzymes

		F1	F2	F1 + F2
C-APS1	Neutral Sugar	35.5 (68.4) ^{a)}	9.1 (49.0) ^{c)}	43.8 (62.2) ^{d)}
	Galacturonate	1.5 (15.5) ^{b)}	0	1.5 (15.8) ^{b)}
C-APS2	Neutral Sugars	31.5 (93.7) ^{a)}	9.7 (78.9) ^{c)}	42.0 (91.3) ^{d)}
	Galacturonate	11.4 (31.2) ^{b)}	0	10.8 (29.6) ^{b)}

Figures indicate the weight percentage of each liberated monosaccharide based on total sugar.

a) liberated galactose/total galactose; b) liberated galacturonate/total galacturonate; c) liberated arabinose/total arabinose; d) liberated arabinose+galactose/total arabinose+galactose. .

を協同で作用させた場合の値は、それぞれを単独で作用させたときの合計とほぼ等しく、それぞれが作用する側鎖は相互にあまり関連がないといえる。また、F1によるガラクトロン酸の遊離値は精製した *exo*-PG の値とほぼ等しい (Table 14 参照) ことから、*exo* 型のポリガラクトナーゼであることが改めて示唆された。

3. 考察

ペクチンは陸生植物の一次細胞壁の主要な構成成分であり、その分子は2領域、すなわち、ガラクトナン領域とラムノガラクトナン領域からなっている。従来、ペクチンはその大部分がガラクトナン領域から出来ているものとして扱われてきた⁴⁴⁻⁴⁹が、松浦は野菜中やインゲン豆、小豆などの豆類の中に、ラムノガラクトナン領域を多く含むペクチン類似の多糖が存在していることを明らかにした^{13,71,72}。

一方、大豆の場合にはその中に、ガラクトロン酸を少量含む酸性多糖が存在することが報告されているが、その分子全体から見た構造は明らかではなかった^{42,43}。また、ペクチンの構造に関しては最近、酵素と HPLC を用いた方法によってその分子の構造を解析する方法が開発されており^{47,48}、大豆中の酸性多糖がペクチンと類似の構成単位からなっているのであれば、この方法を用いることにより構造を調べることが可能だと考えられた。そこで本章では大豆中の酸性多糖を抽出、精製し、この酵素-HPLC 法を適用させることにより分子構造の解析を試みた。

まず、大豆おからから、ヘキサメタリン酸を用いた穏やかな条件で酸性多糖を抽出し、DEAE-セルロースを用いて精製した。その結果、従来用いられてきた酸性条件下でのイオン交換クロマトグラフィーでは、一つのピークとして溶出した酸性多糖の画分が、アルカリ条件下で行うことによってガラクトロン酸が多い画分と少ない画分の二つの画分に分離することが明らかになった。

このように酸性多糖中のガラクトロン酸の大部分は C-APS2 (Fig. 7) に存在し

た。そこで大豆ペクチン性多糖の主鎖部分の構造解析を目的とし、C-APS2 中のガラクトuron酸の分布について、基質特異性の異なるペクチナーゼに対する分解限度を調べることにより検討した。従来、小豆由来のペクチン性多糖はペクチナーゼにより分解できるものの⁷¹⁾、いんげん豆由来のペクチン性多糖は分解できないことが報告されているが⁷²⁾、今回、大豆由来のペクチン性多糖はペクチナーゼで分解できる部分、すなわち直鎖のガラクトuronの部分をかなり持っていることを明らかにした。

また、大豆多糖中のアラビノガラクトン部分の構造については、森田によって β -1,4-結合のガラクトンにアラビノースあるいはそのオリゴ糖が1,3結合で分岐した構造が示されているが⁷³⁾、その後 *Bacillus subtilis* 由来のエンド- β -D-ガラクタナーゼによる分解産物が、ガラクトースとそのオリゴ糖のみであることから、ガラクトースとアラビノースは直接結合せずに存在することが示唆されており^{50,51)}、本章においても *Aspergillus niger* 由来のエンド- β -D-ガラクタナーゼを作用させた場合に同様の結果が得られた (Fig. 12)。しかし、この方法ではアラビノースの存在様式など細かい部分の側鎖の構造については解明することはできない。そこで、本章では鎖の末端からアラビナンとガラクトンに作用する2種の酵素を *A. niger* から新たに調製し、分解限度を調べることによりその側鎖部分の構造を詳細に調べた。その結果、ガラクトース部分のみではなく、アラビノース部分もエキソ型の酵素でその大部分が分解されることから直鎖のポリマーとして存在することが明らかとなった。

また、エキソ型のガラクタナーゼとアラビナーゼを協同作用させたときの値が、それぞれを単独作用させた場合の合計値とほぼ等しいことから、それぞれのポリマーはそれぞれ別の部位に存在していると考えられた。リンゴのペクチンの場合には、ガラクトンの側鎖中にアラビノースが含まれている、いわゆるアラビノ-4-ガラクトンが側鎖として存在することが報告されているが⁷⁴⁾、大豆ペクチン性多糖の側鎖中のアラビナンがガラクトンと同様にホモポリマーを形成していることを直接立証した研究は著者が初めてである。

以上のように著者は大豆中のペクチン性多糖を抽出、精製し、その分子構造を、5種の基質特異性の異なる酵素を用い、それぞれの分解限度を HPLC を用いて測定することによって検討した。その結果、大豆のペクチン性多糖、特にアルカリ条件下で DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより精製した APS-2 画分は、果実ペクチンなどと同様にラムノガラクトuron領域の両端にガラクトuron領域が有り、またそのラムノガラクトuron領域から分岐した側鎖は単一なガラクトタン、アラビナンから構成されていることを明らかにした。

4. 要約

大豆おからから 2%ヘキサメタリン酸を用いてペクチン性多糖の抽出を行った。抽出物は、炭酸緩衝液の pH 勾配 (pH9.0-11.0) による DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより、ガラクトuron酸含量が多い画分と少ない画分の2つの画分に分画した。前者のペクチン性多糖に対し、基質特異性の異なる3種のペクチナーゼと2種のヘミセルラーゼを作用させることにより、分子構造の解析を行った。その結果、主鎖の両末端に他のペクチンと同様にガラクトuronを持ち、側鎖はアラビナンとガラクトタンという単一成分からなるポリマーから構成されていることを明らかにした。

第四章 大豆ペクチン性多糖の応用に関する研究

豆腐や大豆蛋白質などの製造時に廃物として生成する大豆おからの中にはガラクトース、アラビノース、ガラクトツロン酸などから成る多糖が含まれている。この多糖は果実ペクチンと比べ中性糖量がかなり多いものの、分子の両末端にはペクチンと同様にガラクトツロン酸のポリマーであるガラクトツロナンが存在するペクチン性多糖であることを前章において述べた。この多糖については、酸性下で 130℃以上に加熱する方法（以下、酸抽出法）で抽出されたものが、酸性飲料の安定剤として利用できることが既に報告されているが^{75,76)}、この方法はペクチンの抽出法としてはかなり厳しい条件であることから、その構造に何らかの影響を与えていることが予測される。果実中のペクチンの場合には、ガラクトツロナン部分の会合をキレート剤により遊離させることができることから、ヘキサメタリン酸、EDTA などのキレート剤を用い、より穏やかな条件で抽出を行っている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。

また、大豆中の食物繊維成分にはコレステロール上昇抑制効果や血糖値の低下作用があることが知られているが^{38,80-82)}、ペクチン性多糖が大豆食物繊維の持つこれらの生理活性にどのように関与しているのかについてはまだ明らかにされていない。

そこで、本章ではまず、キレート剤の一つであるヘキサメタリン酸を用いて乾燥大豆おからから、酸抽出法より穏やかに抽出する方法を検討し、得られた多糖と市販の酸抽出で得られた多糖、レモンペクチンについて化学構造と物性の比較を行った⁸³⁾。また、ラットのコレステロール代謝への影響についても併せて検討した⁸⁴⁾。

1. 実験材料及び方法

1-1 実験材料

乾燥大豆おからはみすず豆腐（長野）から贈与された。また、本章で抽出した多糖との比較のために、市販のレモンペクチン（和光純薬）と水溶性大豆食物繊維（SSHC、不二製油）を入手した。その他の試薬は和光純薬から購入した。

1-2 大豆ペクチン性多糖の抽出方法

0.5%、1.0%、2.0% のヘキサメタリン酸溶液 250 ml に乾燥おから 5 g を加えた後、塩酸で pH を 1 から 6.3 の各段階に調整し、50℃ から 120℃ の間の所定の温度および時間で加温後、遠心分離により残さを除去した

また、大豆ペクチン性多糖の大量抽出は、以下に示す方法により行った。乾燥おから 800 g に 2% ヘキサメタリン酸水溶液 40 l を加え 100℃ で 2 時間加温した後、バスケット式遠心分離機（国産遠心機社製、H-130B 型）で残渣を除去した。得られた上清を 0.45 μm 孔径のメンブレンフィルター（東洋濾紙、TCG-045 S1FN）でろ過した後に、限外ろ過（Waters Pellicon Cassttes System、排除分子量 100,000）により低分子化合物を除去した。得られた高分子成分は凍結乾燥して大豆ペクチン性多糖とした。

1-3 ゲルろ過による分子量分布の測定

大豆水溶性多糖の 1% 溶液（0.1 M 酢酸緩衝液、pH 4.8）を調製し、TSK-gel G6000PW によるゲルろ過により分子量分布を測定した。分析条件は以下の通り。
Column, TSK-gel G6000PW (7.5 mm × 60.0 cm); flow rate, 1.0ml/min;
injection, 10 μl; column temperature, 50 °C; detector, RI.

1-4 タンパク質含量の測定

試料中のタンパク質含量の測定は、ローリーらの方法⁶⁴⁾に従って行った。

1-5 ガラクツロン酸含量の測定

ヘキサメタリン酸抽出液中のガラクトン酸含量は硫酸カルバゾール法⁶²⁾で、その他の試料中のガラクトン酸含量の測定は松橋らの酵素-HPLC法²⁵⁾で測定した。酵素-HPLC法の詳細については第三章 1-7 で述べた。

1-6 エステル化度の測定

エステル化度の測定は塩田らの方法²³⁾で測定した。

1-7 中性糖組成の測定

中性糖組成の分析は試料を 2N 硫酸溶液中で 121 °C、2 時間加熱することにより加水分解⁶⁵⁾、中和した後にアルジトールアセテート化し、GLC 分析を行った⁶⁶⁾。

1-8 分子内ガラクトン分布の分析

分子内のガラクトン分布は、酵素-HPLC法により測定した^{48,49)}。詳細は第三章 1-13 のとおりである。

1-9 粘度の測定

粘度は、回転式粘度計 (VISCONIC ED 型、東京計器) を使い、22 °C の恒温槽で測定した。

1-10 動物試験

3 週齢 SD 系雄性ラットを、一週間市販の固形飼料 (オリエンタル酵母固形飼料 M

Table 16. Composition of experimental diets (%)

Constituents	Basal diet	Cholesterol diet	Pectin diet	SP diet
Casein	22	22	22	22
Lard	9	9	9	9
Corn oil	1	1	1	1
Salt mixture ^a	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ^a	1	1	1	1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	—	1	1	1
Sodium cholate	—	0.25	0.25	0.25
Citrus pectin	—	—	5	—
SP	—	—	—	5
Sucrose	63.30	62.05	57.05	57.05

a) Mineral and vitamin mixtures were the same compositions as those recommended by the American Institute of Nutrition²⁷⁾.

b) pectin; from lemon

Abbreviations: SP, soybean pectic polysaccharide extracted with 2% hexametaphosphate from okara.

F) で予備飼育後、平均体重が等しくなるように6匹ずつに群分けし、Table 16 に示した組成の高コレステロールを負荷した精製飼料で25日間飼育した。飼料の調製はオリエント酵母に委託した。飼料は毎日交換し、摂取量を測定した。採血は試験期間中は尾静脈から行い、また、試験最終日には6時間の絶食後、腹大静脈から全採血を行い、ついで、肝臓と盲腸を摘出した。肝臓は生理的リン酸緩衝液で還流後、重量を測定し凍結保存した。盲腸は全重量を測定後、ついで内容物と組織器官（盲腸壁）に分けそれぞれの重量を測定、内容物の一部を試験管に採り、等量の蒸留水を加えた後にpHを測定した。

また、採血した血液は1時間以上放置後、遠心分離により沈澱を除去し血清にした後、総コレステロール量を酵素法により測定した。肝臓は Folch 法で脂質成分を抽出後、脂質中の総コレステロール量を測定した¹⁸⁾。

揮発性脂肪酸の含量は、盲腸内容物に等量のエタノールを加えて、しばらく放置することにより抽出後、ガスクロマトグラフィーにより分析した。カラムは DB-WAX (30 mm × 0.25 mm、FILEM : 25 micron) を用い、カラム温度は 90℃ に設定した⁸⁵⁾。

各飼料群間の差の有意性は Turkey の方法により検定した。

2. 実験結果

2-1 大豆ペクチン性多糖抽出におけるヘキサメタリン酸の効果

(1) 抽出条件の影響

従来から知られている塩酸のみによる酸抽出⁸⁶⁾ と、ヘキサメタリン酸を 2% 添加後、塩酸で pH を調整した場合の抽出効率を比較した (Fig. 16)。塩酸のみによる抽出では、大豆ペクチン性多糖の構成糖であるウロン酸と同時に蛋白質も、酸性の度合いが強いほどよく抽出された。一方、ヘキサメタリン酸を添加した抽出では、蛋白質は塩酸のみの抽出の場合と同様酸性側でよく抽出されたが、ウロン酸の抽出は pH 3-5 の弱酸性下で 100℃ 以上に加温することにより酸性の場合と同様によく抽出された。以上の結果より、大豆おからにヘキサメタリン酸を添加すれば、弱酸性下で 100℃ 以上に加温することにより、水溶性多糖を選択的に抽出できることが示唆された。

そこで pH を 6.3、温度を 100℃ に固定し、抽出時間とヘキサメタリン酸濃度を変えたときの元のおからからの抽出率の変化を調べた (Fig. 17)。ヘキサメタリン酸濃度は高いほどペクチン性多糖の抽出率は上昇した。抽出時間については、ヘキサメタ

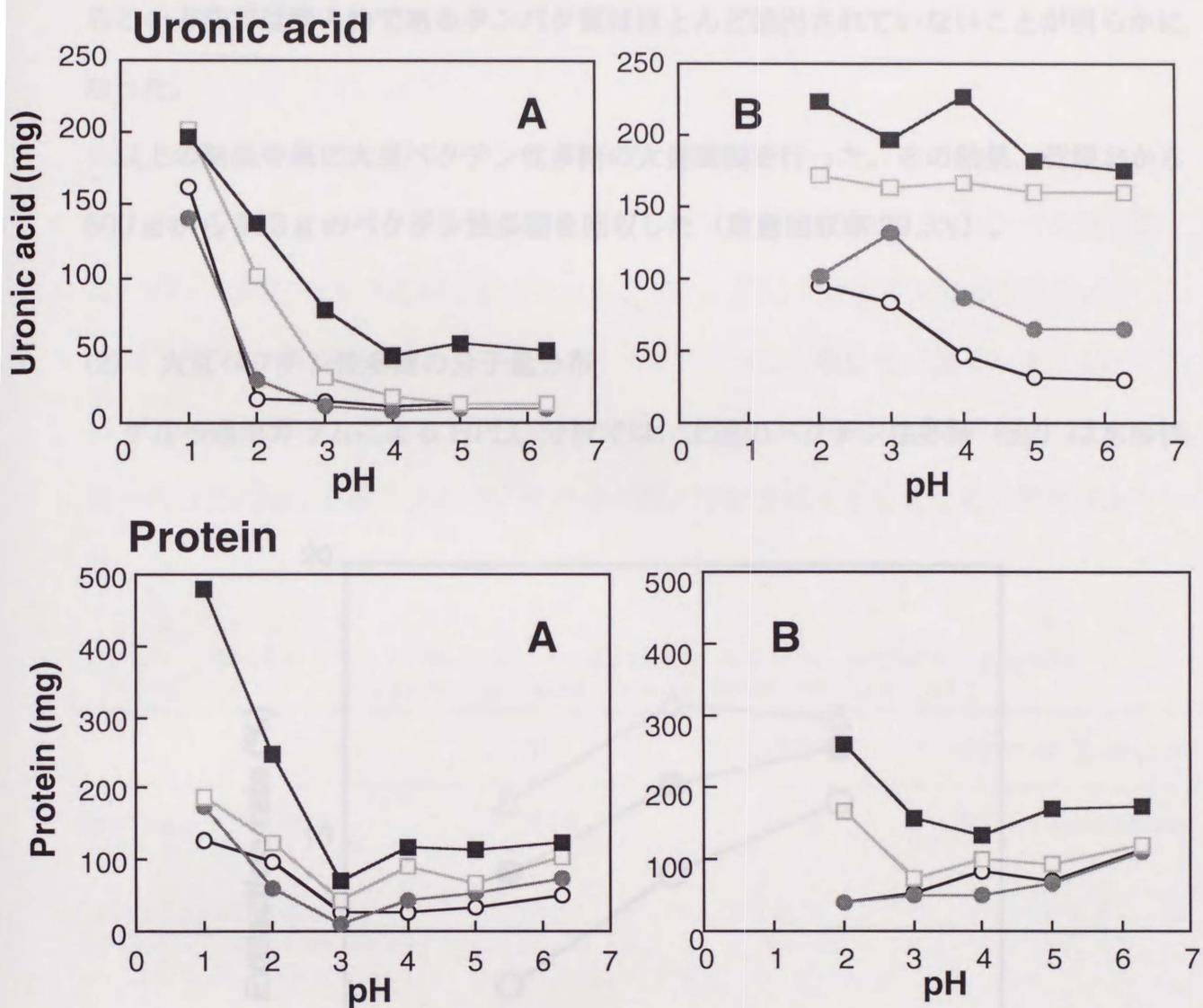


Fig. 16. Effect of Hexametaphosphate on Extraction of Pectic Polysaccharide from Soybean *okara*.

Suspensions soybean *okara* (5 g) in a 250 ml each of water (A) or 2% sodium hexametaphosphate (B), adjusted to various pH values with added HCl, were heated for 1h at 50°C (○), 80°C (●), 100°C (□), and 120°C (■), respectively. After centrifugation, the supernatants were measured for the contents of uronic acid and protein.

リン酸濃度が低いところではその長さに比例し抽出率が向上したが、2%の場合には抽出時間2時間以上ではほぼ同じ抽出効率を示した。また、ローリー法による結果からこの方法では混入物であるタンパク質はほとんど抽出されていないことが明らかになった。

以上の結果を基に大豆ペクチン性多糖の大量調製を行った。その結果、乾燥おから800 g から 235 g のペクチン性多糖を回収した（重量回収率 29.3%）。

(2) 大豆ペクチン性多糖の分子量分布

ゲルろ過用カラムによる HPLC 分析では、上述のペクチン性多糖（SP）は水溶性

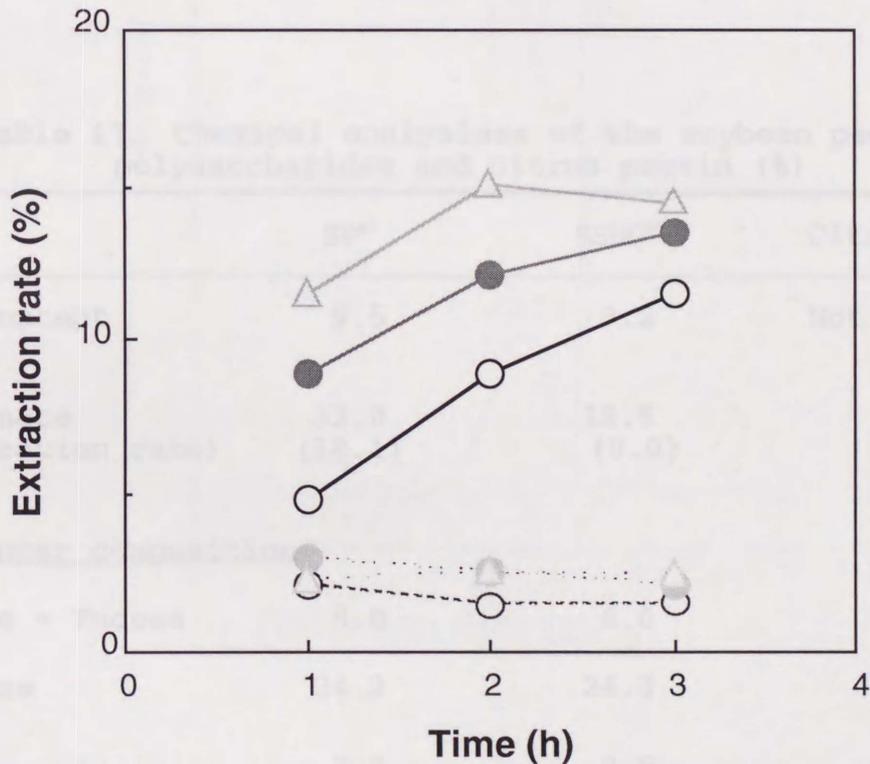


Fig. 17. Effect of Heating Time and Hexametaphosphate Concentration on Pectic Polysaccharide Extraction from Soybean *okara*.

Suspensions of soybean *okara* (5 g) in 250 ml each of 0.5% (○), 1.0% (●), and 2.0% (△) of sodium hexametaphosphate (pH 6.3) were heated at 100°C. After centrifugation, the supernatants were measured for the contents of uronate (-) and protein contents (...), respectively.

大豆食物繊維（SSHHC）、レモンペクチンなどよりも大きい分子量の多糖であることが示唆された（Fig. 18）。メインピークの Retention Time から、主要成分の分子量は約 80 万と見積もられた。

(3) 大豆ペクチン性多糖のタンパク質含量、糖組成

3種の多糖のタンパク質含量と糖組成を分析した（Table 17）。タンパク質含量は、SP、SSHHCともほぼ同じ値であった。また、同じ大豆由来であるSPおよびSSHHCは、いずれもレモンペクチンに比べガラクトツロン酸含量が低く、またSPの方は18.0%のエステル基を含んでいた。SPとSSHHCの中性糖組成を比較すると、グルコース含量に違いがあるものの、その他の糖については大きな差を見いだせなかった。

Table 17. Chemical analyses of the soybean pectic polysaccharides and citrus pectin (%)

	SP ^{a)}	SSHHC ^{b)}	Citrus pectin ^{c)}
Protein content	9.5	9.2	Not determined
Galacturonate (esterification rate)	33.0 (18.1)	18.5 (0.0)	85.8 (73.7)
<u>Neutral sugar composition</u>			
Rhamnose + Fucose	8.0	8.0	25.1
Arabinose	24.2	26.3	15.6
Xylose	2.7	2.5	1.8
Mannose	0.0	0.0	0.0
Galactose	49.8	59.5	49.5
Glucose	15.3	3.7	8.0

a) SP: soybean pectic polysaccharide

b) SSHHC: soluble soybean fiber

c) pectin, from lemon

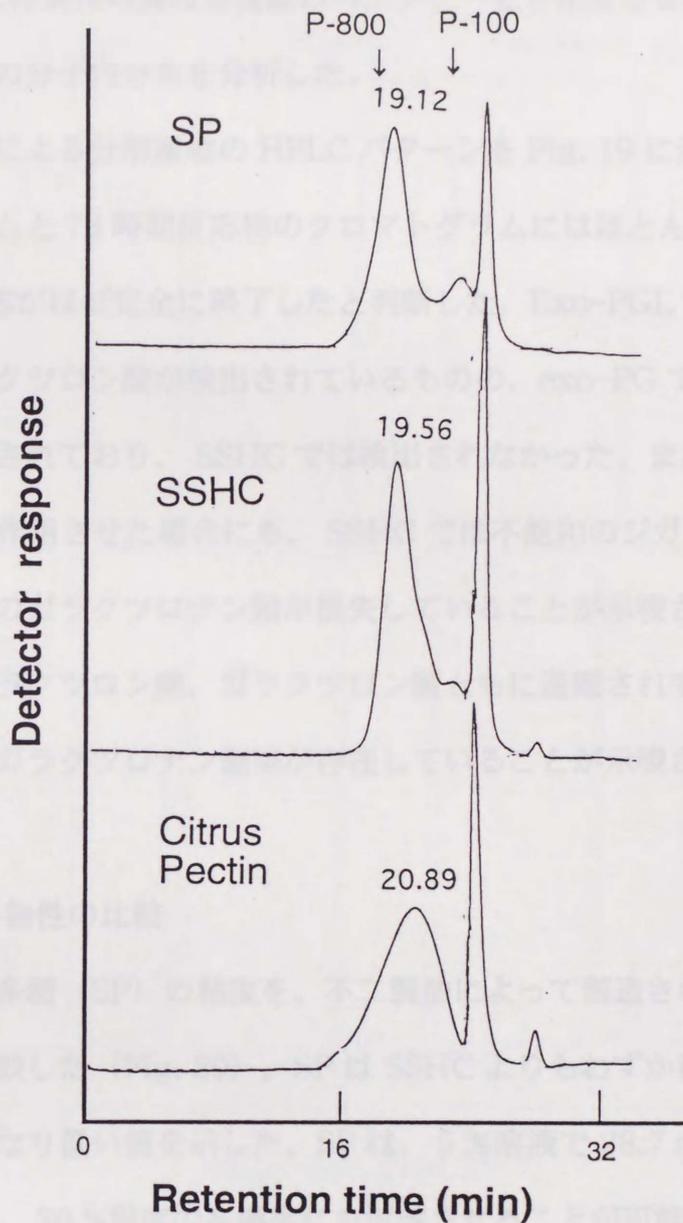


Fig. 18. Gel Filtration Chromatograms of Soybean Pectic Polysaccharide (SP), Commercial Soluble Soybean Polysaccharide (SSHHC), and Citrus Pectin.

Operating conditions: column, TSK-gel G6000PW, 7.6×600 mm; pre-column, TSK-gel guard column, 7.6×50 mm; mobile phase, 0.05 M acetate buffer, pH 4.0; column temperature, 50°C; flow rate, 1.0 ml/min; detector, RI; injection, 10 μ l. P-800 and P-100 indicate the retention times of P-800 (MW. 75.8×10^4) and P-100 (MW. 9.54×10^4), respectively.

(4) 多糖内におけるガラクトン領域の分布

SP と SSHC に特異性の異なる複数のペクチナーゼを作用させ、その分解限度によりガラクトン酸の分子内分布を分析した。

各ペクチナーゼによる分解産物の HPLC パターンを Fig. 19 に示す。48 時間反応物のクロマトグラムと 78 時間反応物のクロマトグラムにはほとんど変化がないことから、48 時間で反応がほぼ完全に終了したと判断した。Exo-PGL では SP、SSHC とともに不飽和のジガラクトン酸が検出されているものの、exo-PG では SP からのみガラクトン酸が検出されており、SSHC では検出されなかった。また、exo-PGL 反応後に、Exo-PG を作用させた場合にも、SSHC では不飽和のジガラクトン酸のみが遊離し、還元末端のガラクトン鎖が損失していることが示唆されたのに対し、SP では不飽和のジガラクトン酸、ガラクトン酸ともに遊離されていることから、SP 分子の両末端にはガラクトン領域が存在していることが示唆される。

(5) 3 種多糖間の物性の比較

大豆ペクチン性多糖 (SP) の粘度を、不二製油によって製造された SSHC およびレモンペクチンと比較した (Fig. 20)。SP は SSHC よりもわずかに高いものの、レモンペクチンよりかなり低い値を示した。SP は、5% 溶液で 28.7 mPa であり、また、溶解性も良く、30% 程度の高濃度にも溶解させることが可能であった。

さらに、SP (6.5% 溶液) と SSHC (6% 溶液) に対する NaCl および CaCl₂ 添加の影響を見ると、SSHC では、いずれの塩を加えても大きな粘度の変化は見られなかったのに対し、SP では NaCl の時 1% を、CaCl₂ の時は 0.01% を越えると、今回採用した方法では測定不能なほどの著しい粘度の上昇が見られた (Fig. 21)。

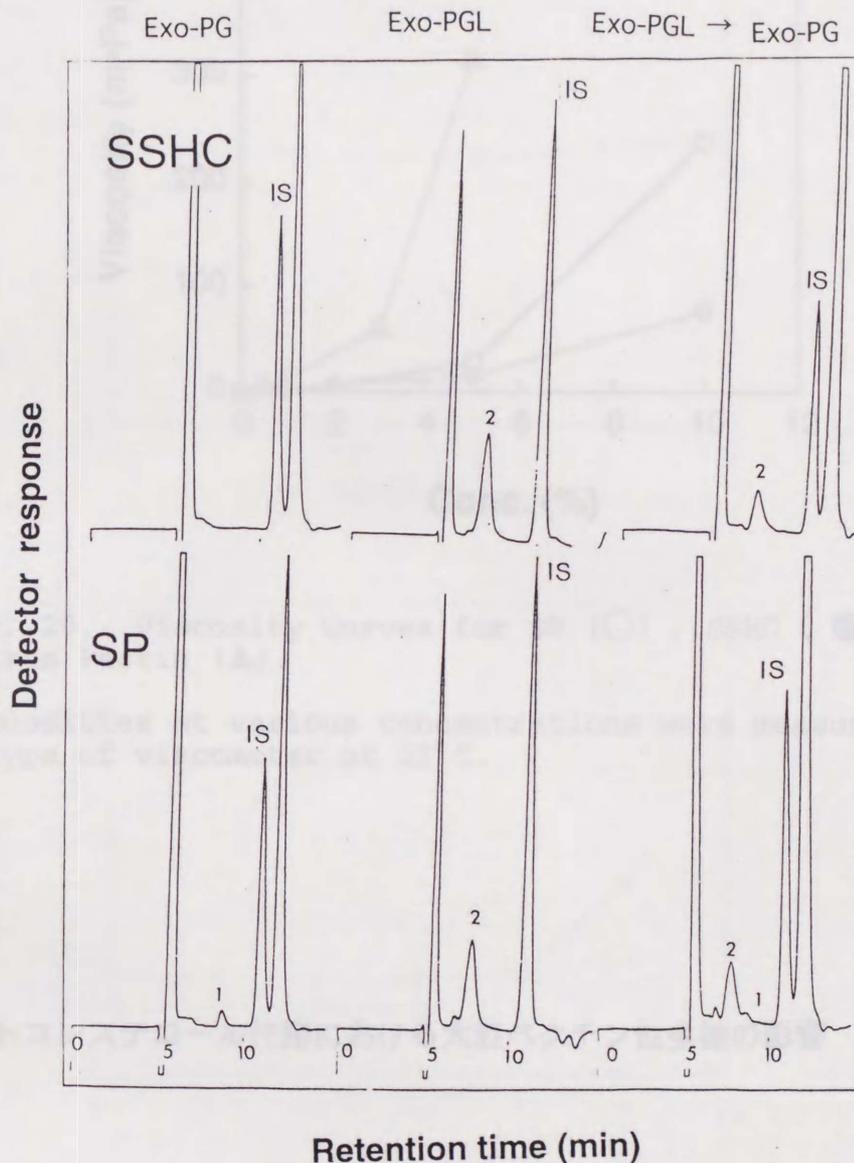


Fig. 19. The Degradation Limits of Soybean Pectic Polysaccharides by Pectinases.

Reaction mixtures (0.05% sample and 50 mU of enzyme) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0 for exo-PG) or 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5 for exo-PGL) containing 0.1% glycerol (internal standard for HPLC) were incubated at 35°C for 48 h.

In the case of the degradation by exo-PGL and exo-PG in sequence, the reaction mixtures containing 0.1% sample, 0.1% glycerol, 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and exo-PGL were incubated at 35°C for 48 h. An aliquot of 0.25 ml was added to a solution (0.25 ml) containing exo-PG (25 mU) in sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0) and reincubated at 35.C for 48 h. The reaction products were analyzed by HPLC using a Shodex SUGAR SH1821 column.

Peak 1, galacturonate; 2, 4,5-unsaturated digalacturonate; IS, internal standard (glycerol).

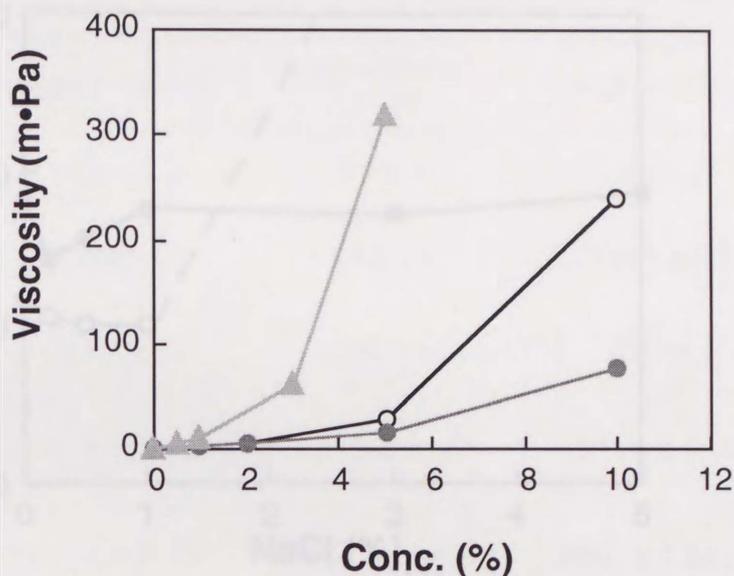


Fig. 20. Viscosity Curves for SP (○) , SSHC (●) , and Citrus Pectin (▲) .

Viscosities at various concentrations were measured by an E type of viscometer at 22°C.

2-2 ラットコレステロール代謝における大豆ペクチン性多糖の影響

(1) ラット組織コレステロール濃度における大豆ペクチン性多糖の影響

はじめに、ラットの飼料に大豆ペクチン性多糖を添加したときのラット体重、飼料摂取量、肝臓重量の変化を Table 18 に示す。体重と飼料摂取量は各群とも同様に推移し、大きな違いはなかった。肝臓重量はコレステロール群と基本飼料群の間に有意な差があり、コレステロール添加による肝臓重量の増加が確認された。このコレステロール群に対し、ペクチン食群、SP 食群のいずれも肝臓重量の減少を確認したが、ペクチン群に対しては有意な差が認められているのに対し、SP 群については有意な差は

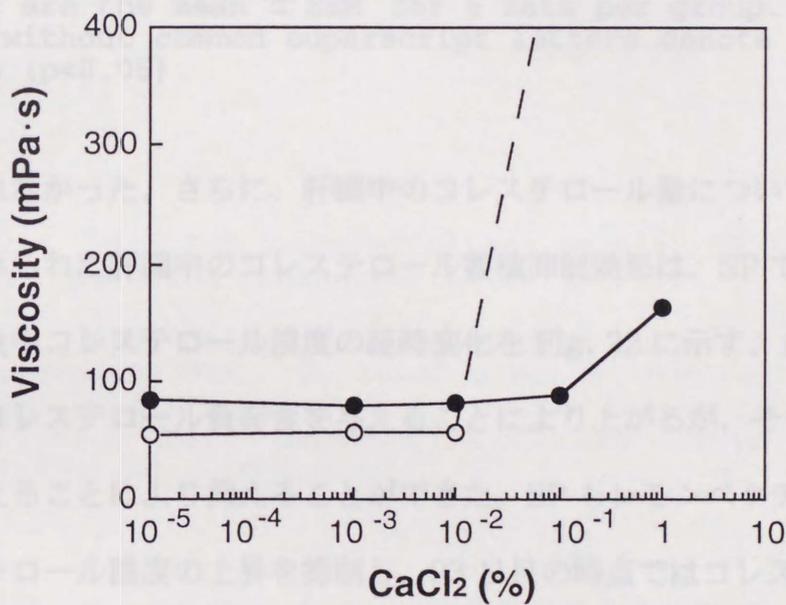
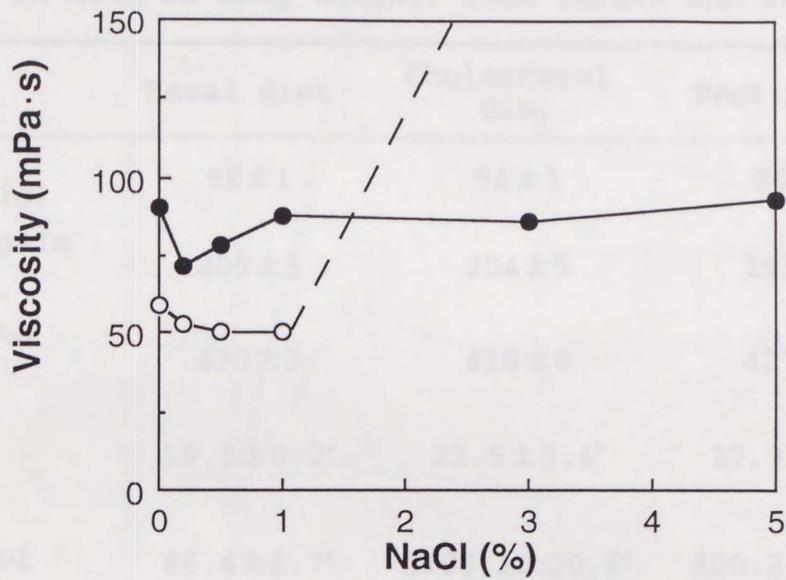


Fig. 21. Influence of NaCl and CaCl₂ on the Soybean Polysaccharide Viscosities.

Viscosities of a 6.0 % solution of SP (○), and a 6.5 % solution of SSHC (●) with various concentrations of NaCl or CaCl₂ were measured by an E type of viscometer at 22°C.

Table 18. Effects of citrus pectin and soybean pectic polysaccharide (SP) in diet on body weight, food intake and liver weight of rats

	Basal diet	Cholesterol diet	Pectin diet	SP diet
Initial body wt. (g)	98±1	96±1	96±1	95±1
Body wt. gain (g)	209±3	204±5	191±5	204±4
Food intake (g/rats)	430±3	415±0	427±2	418±7
Liver wt. (g/rat)	19.5±0.2 ^a	22.5±0.4 ^b	17.9±0.5 ^a	20.8±0.38 ^{ab}
Liver cholesterol (mg/liver)	86.4±6.7 ^a	1394.1±20.6 ^c	800.2±83.6 ^b	1218.3±91.9 ^c

The values are the mean ± SEM for 6 rats per group. The values in the same line without common superscript letters denote significant difference ($p < 0.05$).

認められなかった。さらに、肝臓中のコレステロール量についてみると、レモンペクチンでみられた肝臓中のコレステロール蓄積抑制効果は、SPでは確認できなかった。

次に血中コレステロール濃度の経時変化を Fig. 22 に示す。血清中のコレステロール濃度はコレステロール負荷食を与えることにより上がるが、その上昇はレモンペクチンを加えることにより抑えることができた。SP もレモンペクチンほどではないもののコレステロール濃度の上昇を抑制し、23 日目の時点ではコレステロール食に比べ有意差を確認した。最終日のコレステロール測定値が 23 日目よりもすべて高い値になっているが、これは採血法の違いによるのではないかと考えている。

(2) 盲腸内の短鎖脂肪酸濃度の変化

食物繊維が示すコレステロールの上昇を抑制する機構としては、コレステロールの吸収抑制^{34,35)}、あるいは腸内細菌により生産される短鎖脂肪酸による体内でのコレステロール合成抑制^{36,37)}が報告されている。そこで本研究では、機構解析の一助として、

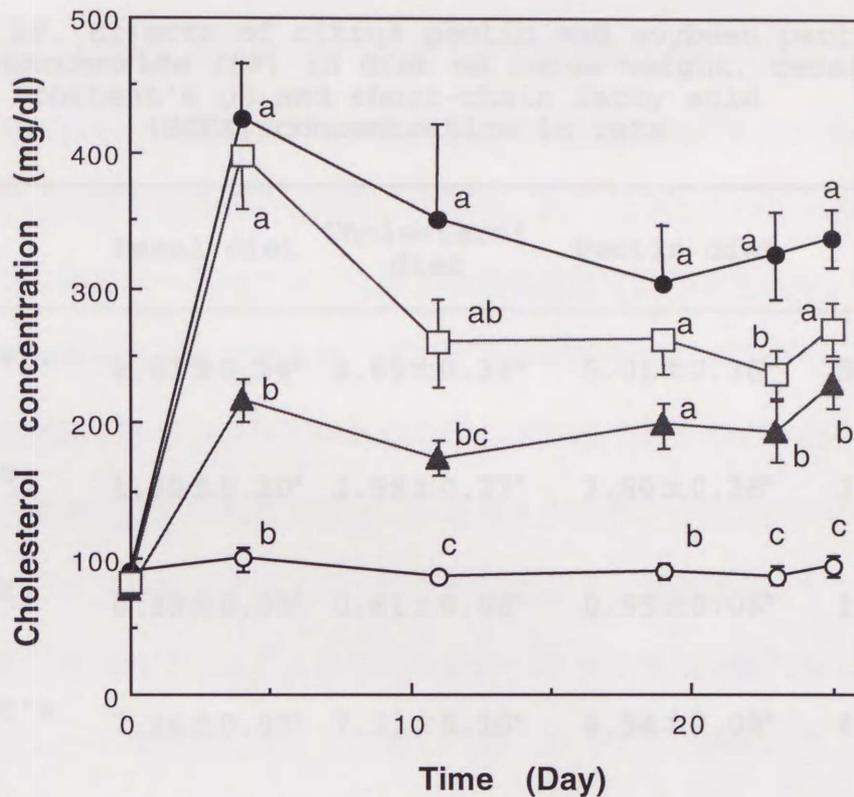


Fig. 22. Influence of Citrus Pectin, SP and Other Diets on the Serum Cholesterol Level in Rats.

Each point is the mean of 6 rats and vertical bars represent SEM. O, basal diet; ●, cholesterol diet; ▲, pectin diet; □, SP diet. Values in the same period without common superscript letters denote significant differences ($p < 0.05$).

盲腸の重量とその内容物の pH および短鎖脂肪酸含量を測定した (Table 19)。盲腸およびその内容物の重量は、レモンペクチンを加えることにより増加したが、SP でもほぼ同様な増加が認められた。また、レモンペクチンで見られる盲腸壁の重量増加も、SP で同様に起こった。前述したようにコレステロール上昇抑制効果は、ペクチンよりも劣っていたにもかかわらず、盲腸内容物の pH については、SP はペクチンよりもさらに低下させた。盲腸内容物中のプロピオン酸、n-酪酸などの含量はペクチン食群よりも少ないが、データのばらつきが大きく有意な差としては認められなかった。

Table 19. Effects of citrus pectin and soybean pectic polysaccharide (SP) in diet on cecum weight, cecal content's pH and short-chain fatty acid (SCFA) concentration in rats

	Basal diet	Cholesterol diet	Pectin diet	SP diet
Cecum total wt. (g)	2.03±0.24 ^a	2.69±0.33 ^a	5.01±0.36 ^b	5.09±0.17 ^b
Cecal content wt. (g)	1.30±0.20 ^a	1.98±0.27 ^a	3.80±0.38 ^b	3.71±0.25 ^b
Cecal wall wt. (g)	0.68±0.03 ^a	0.61±0.06 ^a	0.95±0.06 ^b	1.03±0.07 ^b
Cecal content's pH	7.24±0.08 ^c	7.23±0.10 ^c	6.54±0.08 ^b	6.20±0.08 ^a
Cecal content's SCFA (mg/rats)				
Acetic acid	0.57±0.00	0.39±0.05	0.73±0.02	0.68±0.01
Propionic acid	0.10±0.05	ND	0.23±0.13	0.07±0.05
n-Butyric acid	0.06±0.00	ND	0.12±0.13	ND

Each value is the mean ± SEM. Values in the same line without common superscript letters denote significant difference (p<0.05). ND means not detected.

3. 考察

大豆の中に酸性多糖が存在することは既に研究されており、その構成糖、結合様式などの化学的なデータもかなり多く報告されている。しかし、その応用に関する研究は、醤油の製造に利用したものが有るものの⁴³⁾、その多糖を抽出利用するものは報告さ

れていなかった。

しかし、最近不二製油により大豆から油脂と蛋白質を得た残さ（おから）からこの酸性多糖を抽出し、その食物繊維としての生理活性は確認されていないものの、乳飲料の安定剤などに利用する研究が報告されており、既に実用化されている。不二製油は大豆おから中の蛋白質を加熱することにより加水分解することにより、それらにより固定されていた酸性多糖を遊離させ、抽出する方法を用いている^{75,86)}。しかし、この方法は130℃に加熱するという激しい条件を含んだ方法であるので、得られた多糖もなんらかの熱分解を受けているのではないかと考えられた。一方、ペクチンはガラクトuron酸の間にミネラルを配するイオニックな結合により、細胞壁のマイクロフィブリルに結合していると言われていることから、一般にヘキサメタリン酸やシュウ酸、EDTAなどのキレート剤が抽出剤として用いられている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。本章では、大豆ペクチン性多糖と果実などのペクチンが、ガラクトuron部分の構造について同一であるとする前章のデータに着目し、キレート剤による抽出を大豆ペクチン性多糖へ適用することを検討した。その結果、ヘキサメタリン酸の使用により、不二製油の加熱抽出法よりも穏やかなpH 6.3、100℃という条件で、ほぼ同等の抽出効率を得ることができた。

また、大豆中には多くのタンパク質を含んでおり、ペクチン質の抽出の場合にはその除去が大きな問題となる。今回の方法では抽出pHを6.3と中性側に設定することでペクチン質のみを選択的に抽出することを可能にした。大豆中のタンパク質はpH 4.5で不溶性と報告されており、今回の結果はそれと一致している⁸⁷⁾。以上のように、細胞壁中のマイクロフィブリルにミネラルを介して結合しているペクチン質を、キレート剤を用い、かつタンパク質の分解、抽出が起こらない穏やかな条件で反応させることにより選択的な抽出することが可能となった。

この方法で抽出した酸性多糖（SP）は、不二製油の方法では得られなかった、塩類の添加による増粘という性質を保持していた。不二製油のSSHHCはSPよりわずかに

分子量が小さく、ガラクトン部分が少なくなっていたことから、SSHHC はもとの大豆ペクチン性多糖より末端のガラクトン部分が消出し、そのために物性が変化したものと推測された。Renald と Thibault は、リンゴとシュガービートのペクチンを抽出するときに、pH 6.5、80℃ では、pH 4.5、20℃ と比べ、粘度の低下、分子量、特にウロン酸部分の分子量が低下することを報告している⁷⁷⁾。本論文で述べた条件は pH 6.3、100℃ で 2% のヘキサメタリン酸を添加するという条件であることから、130℃、酸性下で加温するという SSHC の場合より中性、低温の緩やかな条件であり、そのためにより分解が進んでいない多糖が抽出できたと考えられる。

既に触れたが、SP は塩を添加することにより著しい増粘効果を示す。この特性は塩存在下でのみ増粘するというユニークなものであり、今後食品、飲料などへの利用が期待できる。

多くの多糖が血清などのコレステロール濃度を下げることがよく知られているが、ペクチンは特にその生理活性が優れているとされている。そこで本論文ではペクチンを一つの対象物質とし、その構造のどの部分が生理活性に関与しているのかを検討した。第二章では、レモンペクチンを酵素により分子量 66,000 にまで低分子化し、得られた低分子ペクチンが、血中のコレステロール上昇を抑制する機能は失っていたのに対し、分子量 185,000 の低分子ペクチンでは保持していることを示し、この活性にある値以上の分子量が必要であることを推測した。本章では、分子量はペクチンよりも大きいものの、構成糖が異なる SP を抽出し、その生理活性をペクチンと比較した。その結果、SP はペクチンの持つ即効的な血中コレステロールの抑制効果は持たないが、長期間摂取させれば、コレステロール値をしだいに低下させた。また、低分子ペクチンでは保持していた、肝臓へのコレステロールの蓄積抑制機能は、SP では認められなかった。以上の結果から、これらの生理活性の発現には、分子量だけでなく、構成糖、特にペクチンの主な構成糖であるガラクトン酸が重要な役割を持つことが示唆された。また、既に実用化されている SSHC の生理活性についてはまだ認められてお

らず、その点でも本章のデータは興味深い。

ペクチンによるコレステロール抑制の発現機構としては、現在までにコレステロールの吸収抑制^{34,35)}あるいは腸内細菌により生産された短鎖脂肪酸による体内でのコレステロール合成抑制^{36,37)}が報告されている。レモンペクチンと比較して、SP の場合には短期的な血中コレステロール上昇抑制活性や肝臓への蓄積抑制効果は失われており、コレステロールの吸収は抑制されていないと推測される。また、盲腸重量、その内容物の pH、短鎖脂肪酸量を測定したところ、短鎖脂肪酸の生産量はデータのばらつきが大きく有意な差としては認められなかったものの、盲腸重量、内容物 pH では変化が見られ、盲腸内微生物の活性化を指示するデータは得られている。しかし、今回のデータではその生理活性の発現機構を説明するには至っておらず、これらの腸内細菌の血中コレステロール上昇抑制効果への関与を含めた活性の発現メカニズムについては今後更なる検討が必要である。

4. 要約

大豆おからのペクチン性多糖を効率よく抽出するために、ヘキサメタリン酸の濃度、処理温度、pH を考え抽出率の変化を調べた。2%ヘキサメタリン酸溶液を用い、弱酸性下で 100℃以上に加温することにより蛋白質の混入を防ぎつつ、ペクチン性多糖を効率よく抽出できることを示した。また、この方法を用いてペクチン性多糖を調製し、市販の大豆食物繊維と物性および構造の比較を行ったところ、中性下での粘度、分子量分布、および中性糖組成にほとんど差がないものの、金属塩添加による粘度上昇、およびガラクツロン酸の分子内での分布に差があることが明らかになった。

大豆ペクチン性多糖のラットのコレステロール代謝への影響を調べた。ペクチン性多糖は、コレステロール添加による血中コレステロール濃度の上昇を徐々に抑制したものの、レモンペクチンが持つ即効的な血中コレステロール濃度の抑制機能や、肝臓

へのコレステロールの蓄積抑制機能は保持していなかった。これらの生理活性の発現機構の解析を目的として行った盲腸内の短鎖脂肪酸の分析結果は、データのばらつきが大きく有意な結果は得られなかったものの、盲腸の重量および内容物 pH に変化することが確認されており腸内細菌の何らかの関与が示唆される。

このヘミセルコースはキシロース、アラビノースなどの中性糖が主成分であるが、その中にはグルクロン酸やガラクトロン酸などのウロン酸も少量含まれている²⁷⁾。このウロン酸含量の定量には、カルバゾール法²⁸⁾やホーヒドロキシジフェニル法²⁹⁾などの比色分析法が用いられてきたが、これらの比色分析法は共存する糖の種類や濃度によって発色が変わること、ウロン酸の種類がわからないなどの問題点を持つ³⁰⁾。

また、ヘミセルコースは本来水溶性のものであるが、細胞壁に存在する状態では不溶性のセルコースマイクロフィブリルと水素結合しているため容易には抽出できず、アルカリ、酵素、酸化などの処理を加えることによって初めて抽出が可能になる³¹⁾。エクストルーダーは、加熱処理液に酸素、糖、酸、酵素、塩類、添加剤、成形、乾燥、包装、貯蔵の多くの操作をこなす多目的の食品加工機械である³²⁾。このエクストルーダーを用いてヘミセルコースを抽出する試みとしては、数件の報告³³⁾もみられることができるが、これらでは抽出条件は検討されておらず、エクストルーダーの各コブの特性が十分に把握されていない。

そこで本報では、代表的な食品包装であるコーンブランを材料として用い、ヘミセルコースの抽出条件において、あまり検討されていないウロン酸の定量と、定性的な鑑定法の検討を行った³⁴⁾。また、工業用エクストルーダーの使用が、原料外皮からのヘミセルコースの抽出に有効であるのかについても併せて検討した³⁵⁾。

このヘミセルコースはキシロース、アラビノースなどの中性糖が主成分であるが、その中にはグルクロン酸やガラクトロン酸などのウロン酸も少量含まれている²⁷⁾。このウロン酸含量の定量には、カルバゾール法²⁸⁾やホーヒドロキシジフェニル法²⁹⁾などの比色分析法が用いられてきたが、これらの比色分析法は共存する糖の種類や濃度によって発色が変わること、ウロン酸の種類がわからないなどの問題点を持つ³⁰⁾。

また、ヘミセルコースは本来水溶性のものであるが、細胞壁に存在する状態では不溶性のセルコースマイクロフィブリルと水素結合しているため容易には抽出できず、アルカリ、酵素、酸化などの処理を加えることによって初めて抽出が可能になる³¹⁾。エクストルーダーは、加熱処理液に酸素、糖、酸、酵素、塩類、添加剤、成形、乾燥、包装、貯蔵の多くの操作をこなす多目的の食品加工機械である³²⁾。このエクストルーダーを用いてヘミセルコースを抽出する試みとしては、数件の報告³³⁾もみられることができるが、これらでは抽出条件は検討されておらず、エクストルーダーの各コブの特性が十分に把握されていない。

そこで本報では、代表的な食品包装であるコーンブランを材料として用い、ヘミセルコースの抽出条件において、あまり検討されていないウロン酸の定量と、定性的な鑑定法の検討を行った³⁴⁾。また、工業用エクストルーダーの使用が、原料外皮からのヘミセルコースの抽出に有効であるのかについても併せて検討した³⁵⁾。

第五章 コーンヘミセルロースに関する研究

穀物外皮に含まれている水溶性ヘミセルロースは、植物細胞の細胞壁を構成する成分であるが^{88,89)}、その血清コレステロール上昇抑制効果が既に確認されていること^{90,91)}、水溶性であるので飲料などへの利用が可能であることなどから注目を集めている。

このヘミセルロースはキシロース、アラビノースなどの中性糖が主成分であるが、その中にはグルクロン酸やガラクトン酸などのウロン酸も少量含んでいる^{92,93)}。このウロン酸含量の定量には、カルバゾール硫酸法⁶²⁾や m-ヒドロキシジフェニル法⁹⁴⁾などの比色分析法が用いられてきたが、これらの比色分析法は共存する糖の種類や重合度によって発色が違うこと、ウロン酸の種類がわからないなどの問題点を持つ^{95,25)}。

また、ヘミセルロースは本来水溶性のものであるが、細胞壁に存在する状態では不溶性のセルロースマイクロフィブリルと水素結合しているため容易には抽出できず、アルカリ、加熱、加圧などの負荷を加えることによって初めて抽出が可能になる⁹⁶⁾。

エクストルーダーは、短時間高温加熱に加え、混合、混練、剪断、破碎、加圧、成形、膨化、乾燥、殺菌の多くの操作を1台で行える多目的の食品加工機械である^{97,98)}。このエクストルーダーを用いてヘミセルロースを抽出する試みとしては、数件の特許⁹⁹⁻¹⁰¹⁾を挙げることができるが、これらでは抽出条件は検討されておらず、エクストルーダーの持つどの特性が効いたかは明らかではない。

そこで本章では、代表的な穀物外皮であるコーンブランを材料として用い、ヘミセルロースの構造解析において、あまり検討されていないウロン酸の定量と、定性的な測定法の検討を行った⁵²⁾。また、二軸エクストルーダーの使用が、穀物外皮からのヘミセルロースの抽出に有効であるのかについても併せて検討した¹⁰²⁾。

1. 実験材料及び方法

1-1 実験材料

コーンブランは、A. E. STRLEY Mfg. Co. のベストブラン 90 を使用した。ベストブラン 90 には食物繊維が 92 %、ヘミセルロースが 62 % 含まれていた。

1-2 エクストルーダー

エクストルーダーは日本製鋼所製の小型二軸エクストルーダー model TEX-L (ラボレーター) を用いて、Fig. 23 に示したスクリューパターンで操作した。スクリューの直径が 30 mm、長さが 300 mm ($L/D=10$)、ダイの直径が 4 mm (一穴) のものを用い、回転数は 80 rpm、バレル先端温度を 110°C に設定した。試料の供給は自然供給で行い、ダイから放出される試料の量を測定することにより処理速度を算出した。

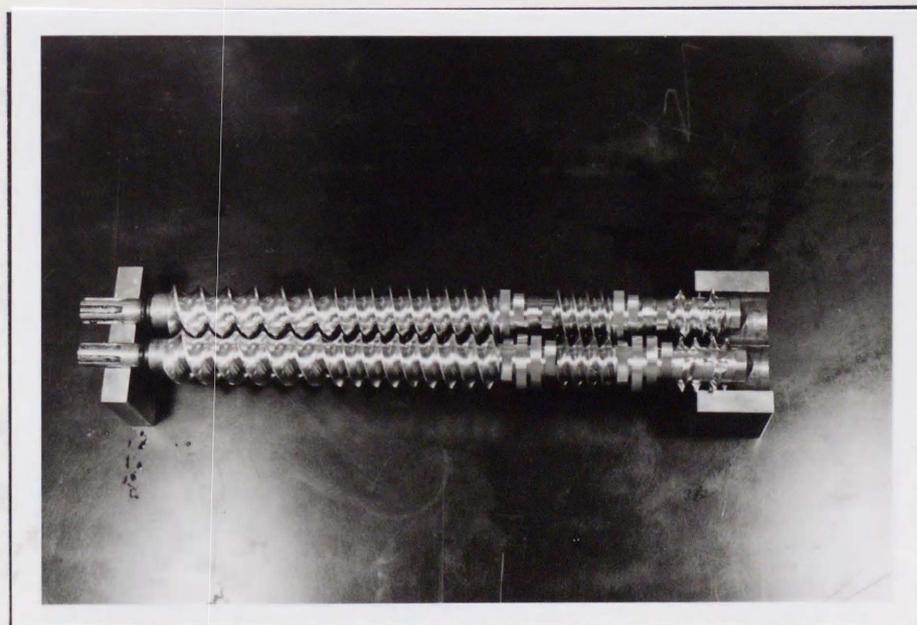


Fig. 23. Screw Pattern Used for Extraction of Hemicellulose from Corn Bran.

1-3 コーンヘミセルロースの抽出

1) アルカリ抽出

ウロン酸分析の試料としては、福本らのいなわらからの方法¹⁰³⁾により、コーンブランから以下のように抽出したものを使用した。400 g のコーンブランに対し、10 倍量の水を加え 2 時間煮沸した後に、残さを流水で 1 昼夜洗浄した。その残さに有効塩素 2% の次亜塩素酸ソーダ溶液 3,400 ml を加え 20℃ に 1 晩置き、再び流水で 1 昼夜洗浄した。次に、この残さに 10% NaOH 溶液 4 l を加え 20℃ で 20 時間抽出した後に、8000 rpm、20 分間遠心分離して上清を回収した。この上清に濃塩酸を加え pH を 4.5 に調整した後に、等量のアセトンを加え沈澱を得た。この沈澱を 50% アセトン、アセトン、エタノール、エチルエーテルの順に洗い減圧乾燥してヘミセルロース標品を得た。400 g のコーンブランから 231 g を回収した。

2) エクストルーダーを用いた抽出

200 g のコーンブランと一定量の NaOH 溶液を十分混合後、上記の条件で二軸エクストルーダーで処理し、ヘミセルロースを抽出した。次に、NaOH 添加前の試料重量 10 g 相当分のエクストルーダー処理物に蒸留水を 200 ml に達するまで加え、1 時間室温で攪拌することによって可溶化されたヘミセルロースを溶出させた。遠心分離 (6,000 rpm、20 分) により残さを除去し、得られた上清を抽出画分とした。

1-4 水溶性高分子成分の定量

抽出画分中の水溶性高分子成分の定量は、ゲルろ過カラムを用いた HPLC 分析により行なった。まず、得られた抽出画分 10 μ l を下記のシステムで HPLC を行ない、その void volume から Retention time 20 分までの高分子領域のエリア面積を計算した。次に、この水溶性高分子のエリア面積と、キシロースを標準物質としてフェノール硫酸法⁶¹⁾により定量した水溶性高分子の全糖量との間の検量線をもとにして全糖量に換算し、それを水溶性高分子量とした。

なお、使用した HPLC の分析条件は以下の通りであった。装置：島津 LC-9A システム, カラム：TSK-gel G5000PW (7.5 mm ID \times 60.0 cm, Toso), カラム温度：

50℃, 流速: 1.0 ml/min, 移動相: 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.0), 検出器: 示差屈折計。

1-5 構成糖の分析

1) HPLC によるウロン酸分析

0.2% ヘミセルロースと 0.2% グリセロール (内部標準) を含む試料溶液 0.5 ml に、等量の 2 N トリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、100℃、2 時間加温することにより加水分解した¹⁰⁴⁾。得られた加水分解試料は陰圧下で乾固させた後に、1.0 ml の蒸留水に溶解させ HPLC で分析した。Column, Shodex SUGAR SH1821 (8 x 300 mm); precolumn, Shodex SUGAR SH1011P (6 x 50 mm); column temp., 40℃; flow rate, 1.0 ml/min; mobile phase, 0.001 N H₂SO₄。

2) 比色分析

比色分析法によるウロン酸定量は、Galambos の硫酸カルバゾール法により測定した⁶²⁾。中性糖含量は、硫酸カルバゾール法でウロン酸含量を測定後、フェノール硫酸法⁶¹⁾で求めた吸光度からウロン酸に相当する吸光度を減じ、その差から求めた。中性糖の標準物質としては、ヘミセルロースの主な構成糖であるキシロースを選んだ。

3) GLC による中性糖の分析。

1) と同様の方法で試料を加水分解後、アルジトールアセテート化し GLC を用いる日下部らの方法で、中性糖組成を分析した⁶⁶⁾。

4) HPLC による中性糖の分析

この方法による試料中の中性糖の分析は、2N 硫酸中で 2 時間煮沸後¹⁰⁵⁾、脱塩し、以下のシステムの HPLC により分析した。装置: 島津 LC-6A システム, カラム: Aminex HPX-87P (7.8 mm ID x 30.0 cm, Bio-rad), カラム温度: 85℃, 流速: 0.6 ml/min, 移動相: 蒸留水, 検出器: 示差屈折計

2. 実験結果

2-1 HPLC によるコーンヘミセルロース中のウロン酸と中性糖の測定

(1) ウロン酸と中性糖の HPLC による分離条件の確認

ヘミセルロースの主要な構成糖であるグルクロン酸、ガラクトuron酸、キシロース、アラビノースと内部標準であるグリセロールを、各1%ずつを含んだ溶液 50 μ l を HPLC で分析した。そのクロマトグラムを Fig. 24. A に示す。グルクロン酸はガラクトuron酸より早く溶出し、ウロン酸間の分離が可能であることが示された。中性糖についてはほぼ同じ保持時間で溶出し、多くの場合は一つのピークとして溶出した。

(2) コーンヘミセルロースの分析

コーンブランから抽出したヘミセルロースを 1N TFA で加水分解したものについて、前項と同じ条件で HPLC 分析を行った。そのクロマトグラムを Fig. 24. B に示す。グルクロン酸と中性糖が検出されガラクトuron酸は検出されなかった。また、ガラクトuron酸は、今回の加水分解の条件では二次的な分解を受けることが報告されているが、グルクロン酸は二次分解物らしいピークも見られず、かなり安定であることが示された。

また、ドリセラゼによりレモンペクチンが単糖にまで分解されることを松橋らは報告しているが²⁵⁾、コーンブランについては同酵素で分解できなかった。またいくつかの市販のセルラーゼ剤によっても分解を試みたが、いずれも完全に単糖にまでは分解できなかった。

次に、今回の方法と従来から用いられている他のウロン酸と中性糖の測定方法の比較を Table 20 に示した。今回使用した方法と、その他の方法の間には大きな差は見られなかった。このことは、簡便で精度が高い HPLC 法が、従来から用いられている比

Table 20. Contents of glucuronic acid and neutral sugars of corn hemicellulose

Method	Glucuronate (%)	Neutral sugars (%)	Glucuronate neutral sugars
HPLC	5.71 ^a	49.47 ^b	1 / 11.126
Colorimetry	5.81 ^a	105.2 ^c	1 / 11.357
Colorimetry + GLC	5.81 ^a	88.4 ^c	1 / 10.036

The values represent the average of five separate analyses.
 a) Determined by the method of Sakuma¹⁰.
 b) Determined by the method of Sakuma¹⁰. The amount of neutral sugars obtained was equivalent to the amount of glucuronic acid obtained from total sugar yield by the phenol-sulfuric acid reaction. Neutral sugar is expressed as anhydrous basis.
 c) Determined by the method of Sakuma¹⁰ as aldohexose acetate derivatives, after TPA¹¹ treatment.

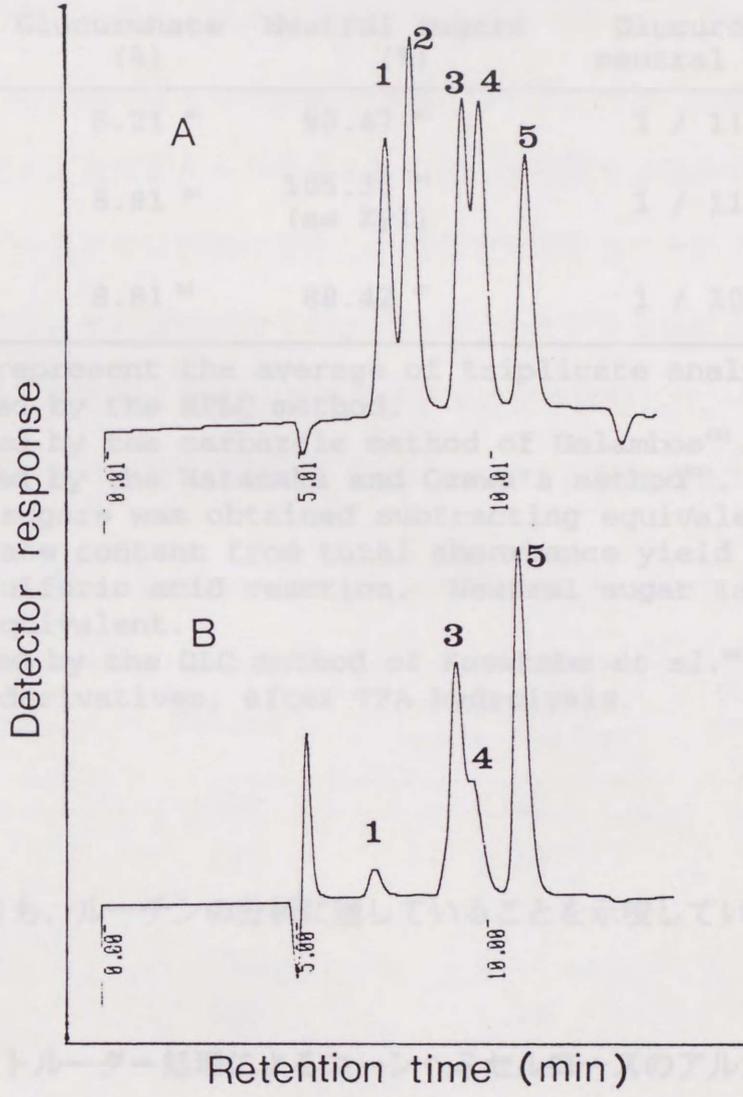


Fig. 24. HPLC Chromatograms of Uronates and Neutral Sugars.

A: a model mixture of standard sugars and glycerol (0.1% of individual standards). B: hydrolysis products of corn hemicellulose, with the addition of 0.1% glycerol.

Operation conditions for HPLC: column, Shodex SUGAR SH1821 (8 x 300 mm); pre-column, Shodex SUGAR SH1011P (6 x 50 mm); mobile phase, 0.001 N sulfuric acid; column temperature, 40°C; flow rate, 1.0 ml/min; chromatograph, Jasco TRI ROTAR-IV; detector, Jasco RID-300. Peak identity: 1, glucuronate; 2, galacturonate; 3, xylose; 4, arabinose; 5, glycerol (internal standard).

Table 20. Contents of glucuronic acid and neutral sugars of corn hemicellulose

	Glucuronate (%)	Neutral sugars (%)	Glucuronate/neutral sugars
HPLC	8.21 ^{a)}	90.47 ^{a)}	1 / 11.160
Colorimetry	8.81 ^{b)}	105.35 ^{c)} (as Xyl)	1 / 11.957
Colorimetry - GLC	8.81 ^{b)}	88.42 ^{d)}	1 / 10.036

The values represent the average of triplicate analyses.

a) Determined by the HPLC method.

b) Determined by the carbazole method of Galambos⁶²⁾.

c) Determined by the Hatanaka and Ozawa's method⁶³⁾. The amount of neutral sugars was obtained subtracting equivalent to glucuronate content from total absorbance yield by the phenol-sulfuric acid reaction. Neutral sugar is expressed as xylose equivalent.

d) Determined by the GLC method of Kusakabe *et al.*⁶⁶⁾ as alditol acetate derivatives, after TFA hydrolysis.

色分析法などよりも、ルーチンの分析に適していることを示唆している。

2-2 二軸エクストルーダー処理によるコーンヘミセルロースのアルカリ抽出

アルカリ存在下での二軸エクストルーダーによるヘミセルロースの抽出条件を検討した。処理条件としては、コーンブラン 200 g に、0.5、1.0、2.0、4.0N の NaOH 溶液を、200、300、400、500 ml ずつ添加し、エクストルーダー処理を行なった。次に、この処理物に蒸留水を加え 1 時間攪拌し、抽出された可溶性成分を溶出させ HPLC 法で分析した。

エクストルーダー操作の条件は、バレル先端温度を 穀物ヘミセルロースのアルカリ抽出において高収率を示す 110℃ に固定し、試料の供給は自然供給とした。その際の

試料の処理速度およびスクリー先端部の圧力を測定した結果を Table 21 に示す。処理速度に開きがあるが、NaOH の添加量を増加するにつれて圧力が減少する傾向にあることが分かる。また、NaOH 溶液の添加量を 500 ml より増加させるとバレル内で液相と固相の分離が起こり不連続な処理となった。一方、200 ml より少ない場合には駆動系に対して負荷がかかりすぎるために、本装置では処理できなかった。

エクストルーダー処理後は試料に加水し、室温で攪拌することにより抽出された成分を水に溶出させた。その溶出画分中の水溶性高分子をゲルろ過による HPLC を用いて分析したところ、平均分子量 100 万の高分子の存在を確認した。その高分子成分をフェノール硫酸法により定量した結果を Fig. 25 に示す。横軸にはエクストルーダー

Table 21. Parameters of extrusion of corn bran

NaOH concn.	Volume ^{a)}	Processing rate (kg/h)	Maximum pressure (kg/cm ²)
0.5 N	200	7.22	16
	300	4.13	3
	400	2.33	2
	500	5.16	1
1.0 N	200	6.31	16
	300	5.76	7
	400	3.29	3
	500	2.35	2
2.0 N	200	6.47	8
	300	4.73	3
	400	4.04	2
	500	3.33	1
4.0 N	200	6.34	6
	300	5.51	2
	400	4.69	1
	500	5.18	1

a) volume of NaOH solution added to 200 g of refined corn bran.

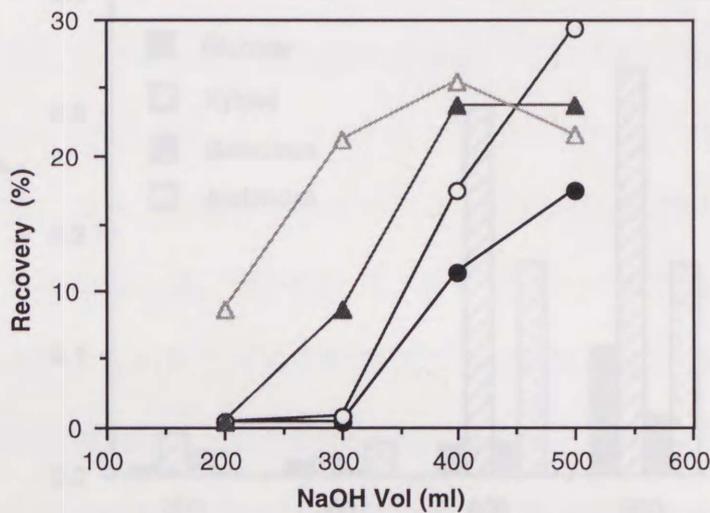


Fig. 25. Effect of Volume and Concentration of NaOH Solution Added to 200 g of Refined Corn Bran on Yield of Hemicellulose.

●, 0.5N NaOH; ○, 1.0N NaOH; ▲, 2.0N NaOH; △, 4.0N NaOH

処理時にコーンブラン 200 g に対して加えた NaOH 溶液の量を、縦軸にはコーンブラン量に対する水溶性高分子画分の回収率を示した。2.0 と 4.0N の NaOH の液量を 400 ml から 500 ml と増加させた時には高分子画分の回収率が横ばい、あるいは減少したが、それ以外の場合は NaOH 溶液の液量が増加するにつれて、高分子成分の回収率も増加した。また、4.0N NaOH 200 ml と 2.0N NaOH 400 ml、あるいは 2.0N NaOH 200 ml と 1.0N NaOH 400 ml のように、NaOH の絶対量が同じ場合でも、NaOH の液量が多い方が回収率が高かった。

次に、いろいろな抽出液中の中性糖含量を測定した (Fig. 26)。いずれの場合ともキシロースとアラビノース、および少量のガラクトースとグルコースが検出された。このキシロース、アラビノースの含量の増減と、Fig. 25 で示された高分子成分の回収率の間には高い相関関係があり、本章で記述する高分子成分は、キシロースとアラビノースが主成分であるヘミセルロースであることが示唆された。以上のように、この

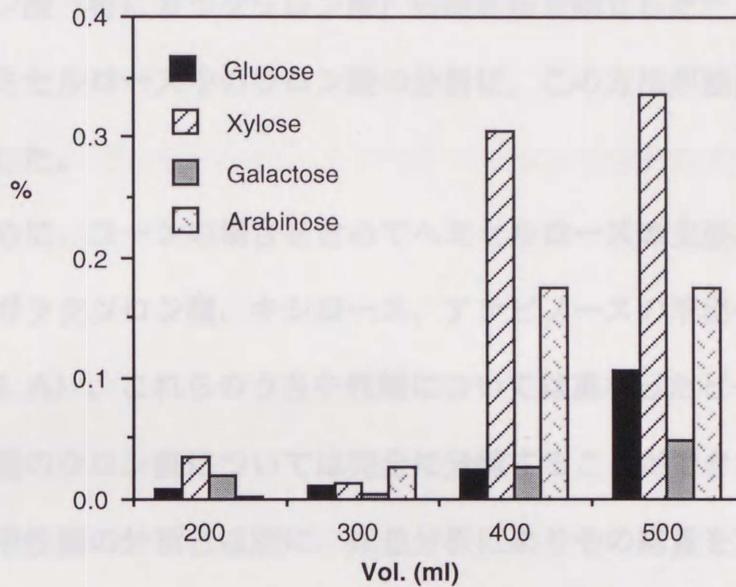


Fig. 26. Neutral Sugar Contents in the Extracts with 1.0 N NaOH.

実験で抽出されたヘミセルロースは、分子量が 100 万程度、アラビノース/キシロース比が 0.52 であり、この値は竹内らがとうもろこしから 2.0% NaOH で抽出したコーンブランヘミセルロース とほぼ一致している⁹¹⁾。

3. 考察

植物の細胞壁の構成成分のうち、ペクチンや一部のガム質などはウロン酸を含んだ酸性多糖として扱われているが、中性多糖として扱われているヘミセルロースの中にも少量のウロン酸が含まれている。しかし、中性糖部分については GLC や GC-MS などにより詳細に調べられているものの、ウロン酸についてはあまり詳細に調べられていない。これは、中性糖の場合と比べて、ウロン酸に対する簡便で、正確な定量及び定性的な分析法が確立していなかったことに起因する。

しかし、畑中らはペクチンの構造を解析する過程に於て、HPLC を用いる簡便で正確なウロン酸（特にガラクトuron酸）の測定法を確立した³⁰⁾。そこで、上記の問題点を持つヘミセルロース中のウロン酸の分析に、この方法が適用できないかどうかについて検討した。

まず初めに、コーンの場合を含めてヘミセルロースの主要な構成成分であるグルクロン酸、ガラクトuron酸、キシロース、アラビノースの溶出位置を標準品で確認した (Fig. 24. A)。これらのうち中性糖については重なったピークとして溶出したのに対し、2種のウロン酸については完全に分離することができた。従来、ウロン酸については、中性糖の分析とは別に、比色分析によりその総量を求める方法や、還元後に中性糖と同様に分析する方法が採られていたが、本章で示した方法では、還元等の処理をすることなしに直接ウロン酸を定量分析することができた。

ペクチンの場合には、単糖まで加水分解するためにドリセラゼを用いて成功したが、コーンヘミセルロースに対しては完全に加水分解することができなかった。また、他の市販の酵素剤についても検討したが、いずれも完全には加水分解することができなかったので、従来からヘミセルロースの加水分解に広く使われている TFA の存在下で加熱する方法を採った。今回用いた試料では比較的熱に安定なグルクロン酸のみを含んでいたことから問題はなかったが、熱に不安定なガラクトuron酸を含む場合にはさらに分解法を検討する必要がある。

以上のように、加水分解法については再検討を必要とするものの、HPLC 法は2種以上のウロン酸の組成と中性糖含量を直接分析することが可能である。本分析法を用いることによって、従来、複雑な分析過程が必要であった一部のヘミセルロース⁹³⁾ や、植物中の粘質物、アルギン酸など¹⁰⁶⁾ の構成糖の分析を、より簡便に行うことが可能である。

また、従来ヘミセルロースは工業的にはアルカリ条件下で抽出されているが、この方法では作業員の安全性、出てくる廃液の処理などの厄介な問題を持っている。エク

エクストルーダーを用いてヘミセルロースを抽出する試みとしては、中性条件で加圧装置として用いた特許、アルカリ存在下で反応装置として用いた特許などがあるが⁹⁹⁻¹⁰¹⁾、その際の抽出条件は十分に検討されておらず、エクストルーダーの持つどの特性が効いたかは明らかではなかった。そこで本章では、代表的な穀物外皮であるコーンブランを材料に用い、二軸型エクストルーダーの使用が穀物外皮からのヘミセルロースの抽出に有効であるのかについて検討した。

当初、二軸エクストルーダーによる加圧効果が、抽出率の向上に關与するのではないかと考え実験を行なったが、本章の実験では加圧はあまり抽出率の向上に關与せず、むしろアルカリの添加量が多い方が抽出率を向上させた (Table 21、Fig. 25)。この結果は、原材料へのアルカリの添加量を増やすことによる粘度の低下が、二軸エクストルーダー内での原材料の流動性や分散性を向上させ、アルカリを効率的に利用できた結果ではないかと推測できる。この推測が正しいと仮定すると、スクリー回転数を上げるなど装置内での混合分散効果を上げる操作を行なうことによって、さらに抽出効率が上がる事が期待できる。

ここで示した方法は、原材料に対して2～2.5倍程度のアルカリ溶液量で済むこと、2～2.5 Nのアルカリ溶液を用いるのはエクストルーダー処理時の短時間のみで済むこと、水によるヘミセルロースの溶出から後の工程は、0.1～0.125 Nの希アルカリ溶液として処理できることなどの利点を持っている。抽出温度、スクリー回転数などエクストルーダーに関する条件、加水による溶出の条件、装置のアルカリに対する耐久性などを更に検討する必要があるが、以上の結果より二軸エクストルーダーを、アルカリ抽出のリアクターとして用いることによって、穀物外皮からヘミセルロースを効率的に抽出できることが示された。

4. 要約

グルクロン酸、ガラクトuron酸及び中性糖が混合した試料の HPLC による分析について検討し、良好な結果を得た。この HPLC 分析法を用いれば、コーンヘミセルロースのuron酸組成と中性糖含量を直接定量できることを見だし、従来法より簡便な、また精度的にも優れた分析法を確立した。

ヘミセルロースの効率的抽出を目的として、二軸エクストルーダーによる、加圧下でのアルカリによるヘミセルロースの抽出を、コーンブランを材料として検討した。0.5N あるいは 1.0N の NaOH を原材料の 2 から 2.5 倍加えた場合に、1 から 3 kg/cm₂ の低加圧下で最も効率よく抽出できたことから、高圧効果よりむしろ二軸エクストルーダー内部での粘度低下に伴う混合分散効果の方が、抽出率の向上に寄与することが示唆された。

第六章 総括

ペクチンやヘミセルロースなどのウロン酸を含む酸性多糖は、優れた食物繊維として、生理活性、特に血漿中のコレステロール低下活性を持つことが報告されている。しかし、これらの多糖は、現在まだ特定保健用食品として、その生理活性の表示を認められていない。それは、ペクチンについては粘度とゲル化能によりその機能を期待できるだけの量を添加できないためであり、ヘミセルロースについてはウロン酸の正確な分析法と、効率的な抽出法が確立されていないことによる。そこで、本研究ではこれらの問題点を解決し、特定保健用食品としての利用を可能にすることを目的に研究を行った。

1. レモンペクチンの分子量と血漿コレステロール低下作用の相関関係について

レモンペクチンの高粘度とゲル化能はその高分子量に起因するが、高分子量はまた、血漿コレステロールの低下作用にも必要だとされている。そこで、レモンペクチンの分子量とラットにおけるコレステロール低下作用の相関関係を検証し、酵素を使って低粘度でなおかつ活性を保持したペクチンの開発が可能であるかどうかについて検討した。

酵母 *Kluyveromyces fragilis* の培養上清を酵素源に用い、反応時間を変えることにより分子量 66,000 と 185,000 の低分子ペクチンを調製し、その粘度がいずれも元のレモンペクチン（分子量 750,000）より低いことを示した。さらに、これらのラットに対する生理活性を検定したところ、分子量 185,000 のペクチンの場合は、元のレモンペクチンと同様に試験開始直後から効果が表れるのに対し、分子量 66,000 のペクチンの場合は、試験開始直後にはその効果が現れないものの、試験期間が進むに連れて効率が表れることを明らかにした。このことは分子量 185,000 程度であ

ればそのコレステロール低下作用は保持しているものの、分子量 66,000 にまで低分子化した場合には、短期間で示されるべき生理作用が失われることが示唆された。

2. 大豆ペクチン性多糖の構造解析について

ペクチンの構造は大量のガラクトツロナンとそれに挟まれた中性糖側鎖を含むラムノガラクトツロナンから構成される。小豆やインゲン豆は、中性糖を多く含むもののペクチンと同様にガラクトツロナン領域とラムノガラクトツロナン領域で構成される多糖（ペクチン性多糖）を含有している。一方、大豆から豆腐などを製造する際に産出するおからは、その廃棄が問題となってきたことから、おからから多糖を抽出、精製し、用途を開発するためその構造について検討した。

大豆おからから 2% ヘキサメタリン酸溶液を用いてペクチン性多糖を抽出し、炭酸緩衝液の pH 勾配 (9.0→11.0) による DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより、ガラクトツロン酸の多い画分と少ない画分に分画し、ガラクトース、アラビノースなどの中性糖を含む多糖を得た。分画した多糖について、3種のペクチナーゼと2種のヘミセルラーゼを作用させたところ、大豆多糖中にも他種のペクチンと同様にガラクトツロナン領域を両端に持つ多糖が存在することが明らかになった。また、本論文で初めて精製したかび *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼを用いて中性糖側鎖についても分析し、今までに報告されていたガラクトース部分のみでなく、アラビノース部分についても直鎖のポリマーとして存在していることを示した。

3. 大豆ペクチン性多糖の応用について

本章では大豆おからから大量にペクチン性多糖を抽出する方法を確立し、その物性および生理活性を検討した。

ペクチンの抽出に効果があるヘキサメタリン酸を用い、2%溶液中で100℃で2時間加熱することにより、タンパク質の混入を防ぎつつ、効率的にペクチン性多糖を抽出

できることを明らかにした。この多糖は、レモンペクチンよりも高分子でありながらかなり低粘度であり、市販の大豆食物繊維には認められない金属塩添加時の増粘効果を保有していた。

その生理活性をレモンペクチンと比較したところ、長期間摂取させた場合にはラット血漿中のコレステロール上昇抑制機能を持つものの、即効的な血中コレステロール上昇抑制機能や肝臓へのコレステロールの蓄積抑制機能は認められなかった。この結果は分子量のみではなく、多糖の構造が生理的效果に大きな影響をおよぼすことを示した。

4. コーンヘミセルロースの糖分析法および抽出法について

既に生理活性が確認されているコーンヘミセルロースの研究のなかで、まだ十分検討されていないウロン酸部分の分析法、およびより効率的な抽出法について検討した。

ウロン酸の分析法については、弱酸性下でイオン交換型のカラムを用いた HPLC 分析が、従来の方法よりも簡便で精度的にも優れた分析法であることを示した。

抽出のために二軸エクストルーダーを採用し、アルカリを用いた加圧下での抽出条件を検討し、高圧の効果よりもむしろエクストルーダー内部での粘度低下に伴う混合分散効果が、抽出率の向上に寄与することを明らかにした。

5. 結論

本研究の結果、従来その粘度とゲル化能のために生理活性を期待できるだけの量を添加することが不可能だったレモンペクチンについては、酵素により低分子化することによって、あるいは現在廃棄物として処理されている大豆おから中のペクチン性多糖をヘキサメタリン酸を用いた穏やかな方法で抽出することによって低粘度、高溶解性でありかつ、血中コレステロール上昇抑制効果を持つペクチン性多糖が得られるこ

とを見いだした。また、既に生理活性が明らかになっているコーンヘミセルローズについてはその効率的な抽出法と分析法を示した。

以上のように、本研究により本来優れた生理活性を持つことが明らかにされていたこれらのウロン酸含有多糖の食品への添加を容易とした。最近の成人病の増加などにより脚光を浴びている機能性食品などへの応用が期待される。

- 3) 「食物繊維」、伊藤誠、橋山徳八編、第一出版 (1987)。
- 6) 伊藤氏、ジャパンフードサイエンス、1989-12、36-37 (1989)。
- 7) 江佐子、辻野か、鈴木誠次郎、栄養学雑誌、33、273-281 (1975)。
- 8) E. McKey, Nutr. Abstracts., 18, 290-294 (1973)。
- 9) K. Kikkawa, A. Tsuchi, A. Yoshida, H. Sugiyama, and K. Shimidzu, Milk. Reg. Inter., 4, 231-236, 1972。
- 10) 林良誠、フードケイカル、1989-9、34-46 (1989)。
- 11) 松橋信平、広島大学修士論文 (1991)。
- 12) 池田正登、橋中千雄、昭和56年度農芸化学会大会講演要旨集、p. 494 (1961)。
- 13) 佐藤康、広島大学修士論文 (1980)。
- 14) G. G. Angelini, R. Zeghla, and J. E. McKey, Cereal Sci. Today, 12, 223-227 (1967)。
- 15) 川村信一郎、日食工業、14、514-523, 552-562 (1967)。
- 16) 橋山徳八、化学と生物、11、95-105 (1980)。
- 17) D. P. Burkitt, Cancer, 28, 3-13 (1971)。
- 18) 池田正登, New Food Industry, 31, 9-17 (1989)。
- 19) A. Key, F. Granelle, and J. T. Anderson, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106, 553-558 (1961)。
- 20) S. Inoue, Y. Nagamatsu, and G. Nakaraku, Agric. Biol. Chem., 48, 633-640 (1984)。
- 21) F. Yonaguchi, W. Shimizu, and S. Hatayama, Biocol. Biotech. Biaches., 58, 679-682 (1994)。

文 献

- 1) S. Arai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 9-15 (1996).
- 2) 中島茂, 食品と開発, **22**, 44-47 (1987).
- 3) 剣持雅幸, 食品工業, **1991-4. 15**, 44-57 (1991).
- 4) 滝本浩司, 月刊フードケミカル, **1996-1**, 85-93 (1996).
- 5) 『食物繊維』、印南敏、桐山修八編、第一出版 (1987).
- 6) 伊藤汎, ジャパンフードサイエンス, **1989-12**, 30-37 (1989).
- 7) 辻悦子、辻啓介、鈴木慎次郎, 栄養学雑誌, **33**, 273-281 (1975).
- 8) S. Mokady, *Nutr. Metabol.*, **15**, 290-294 (1973).
- 9) S. Kiriyama, A. Enishi, A. Yoshisa, N. Sugoyama, and H. Shimahara, *Nutr. Rep. Inter.*, **6**, 231-236, 1972
- 10) 林良純, フードケミカル, **1989-9**, 34-46 (1989).
- 11) 松橋信平, 広島大学博士論文 (1991).
- 12) 池田正吾、畑中千歳, 昭和56年度農芸化学会大会講演要旨集, p. 498 (1981).
- 13) 松浦康, 広島大学博士論文 (1988).
- 14) G. O. Aspinall, R. Begbie, and J. E. McKay, *Cereal Sci. Today*, **12**, 223-227 (1967).
- 15) 川村信一郎, 日食工誌, **14**, 514-523, 553-562 (1967).
- 16) 桐山修八, 化学と生物, **18**, 95-105 (1980).
- 17) D. P. Burkitt, *Cancer*, **28**, 3-13 (1971).
- 18) 辻啓介, *New Food Industry*, **31**, 9-17 (1989).
- 19) A. Key, F. Granole, and J. T. Anderson, *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.*, **106**, 555-558 (1961).
- 20) S. Inoue, Y. Nagamatsu, and C. Hatanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 633-640 (1984).
- 21) F. Yamaguchi, N. Shimizu, and C. Hatanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 679-682 (1994).

- 22) F. Yamaguchi, S. Uchida, S. Watabe, H. Kojima, N. Shimizu, and C. Hatanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2130-2131 (1995).
- 23) 塩田芳之、根岸智史、畑中千歳, 日食工誌, **33**, 399-406 (1986).
- 24) 畑中千歳, 小沢潤二郎: 農化, **48**, 421-428 (1966).
- 25) S. Matsushashi, S. Inoue, and C. Hatanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1053-1057 (1992).
- 26) 辻悦子, 辻啓介, 鈴木慎次郎, 栄養学雑誌, **33**, 273-281 (1975).
- 27) American Institute of Nutrition, *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977).
- 28) J. Folch, M. Lee, and G. H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 29) 武野史朗, 山田裕之, 関谷啓治, 藤谷武一, 大津啓嗣, 栄食誌, **43**, 421-425 (1990).
- 30) 畑中千歳, 横引敬一, 松橋信平, 広島大生物生産学部紀要, **25**, 41-48 (1986).
- 31) A. Darvill, M. Mcneil, P. Albershim, and D. P. Delmer, in *The Biochemistry of Plants*, Vol. 1. ed. by N. E. Tolbert, Academy Press, New York, 1980, pp. 91-124.
- 32) J. A. de Vries, F. M. Rombouts, A. G. J. Vorgen, and W. Pilnik, *Carbohydr. Polym.*, **3**, 245-258 (1983).
- 33) Y. Matsuura, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1675-1677 (1987).
- 34) P. E. Pfeffer, L. W. Doner, P. D. Hoagland, and G. G. McDonald, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 455-461 (1981).
- 35) T. Ide and M. Horri, *Br. J. Nutr.*, **62**, 539-550 (1989).
- 36) G. A. Spiller, M. C. Chernoff, R. A. Hill, J. E. Gates, J. J. Nassar, and E. A. Shipley, *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 754-759 (1980).
- 37) 海老原清: 化学と生物, **29**, 697 (1991).
- 38) M. Levrat, S. R. Behr, C. Rémésy, and C. Demigne, *J. Nutr.*, **121**, 672 (1991).

- 39) 東良和美、三崎旭：名古屋経済大学・市邨学園短期大学自然科学研究会誌、**22**, 9-13 (1988).
- 40) 大豆加工食品副産物高度利用研究開発事業報告書 - 『おから』の産出と利用の現状、問題点- [中間報告] , 食品産業センター (1991).
- 41) 関口良治, 食品と科学, **1991**, 90-95 (1991).
- 42) G. O. Aspinall, I. W. Cottrell, S. V. Egan, I. M. Morrison, and J. N. C. Whyte, *J. Chem. Soc. (C)*, **1967**, 1071-1080 (1967).
- 43) T. Kikuchi and H. Sugimoto, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 87-92 (1976).
- 44) A. J. Barrett and D. H. Notrhcote, *Biochem. J.*, **94**, 617-627 (1965).
- 45) J. A. de Vries, A. G. J. Voragan, F. M. Rombouts, and W. Pilink, *Chemistry and Function of Pectins*, ACS Symposium Series 310, M. L. Fishma, J. J. Jen, eds., American Chemical Society, Washington, D. C., 1986, p. 157-174.
- 46) B. V. McCleary and N. K. Matheson, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **44**, 147-276 (1986).
- 47) J. R. Thomas, A. G. Darvill, and P. Albershim, *Carbohydr. Res.*, **185**, 279-305 (1989).
- 48) S. Matsushashi, K. Yokohiki, and C. Hatanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1417-1418 (1989).
- 49) S. Matsushashi, N. Nishikawa, T. Negishi, and C. Hatanaka, *J. Liquid. Chromatogr.*, **16**, 3203-3215 (1993).
- 50) S. Emi, J. Fukumoto, and T. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1891-1898 (1971).
- 51) J. M. Labavitch, L. E. Freeman, and P. Albersheim, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5904-5910 (1976).
- 52) F. Yamaguchi, S. Inoue, and C. Hatanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1742-1744 (1995).

- 53) F. Yamaguchi, Y. Ota, and C. Hatanaka, *Carbohydr. Polym.* 印刷中
- 54) T. Tagawa and A. Kaji, *Carbohydr. Res.*, **11**, 293-301 (1969).
- 55) F. Yamaguchi and C. Hatanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1191-1192 (1993).
- 56) C. Hatanaka, K. Sakamoto, and Y. Wada, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3347-3348 (1990).
- 57) C. Hatanaka and J. Ozawa, *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 627-632 (1964).
- 58) Y. Kegoya, M. Setoguchi, K. Yokohiki, and C. Hatanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1055-1060 (1984).
- 59) 畑中千歳、小沢潤一郎, *農化*, **42**, 645-650 (1968).
- 60) J. A. de Vries, F. M. Rombouts, A. G. J. Voragaen. and W. Pilnk, *Carbohydr. Polym.*, **4**, 89-101 (1984).
- 61) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers, and F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 62) J. T. Galambos, *Anal. Biochem.*, **19**, 119-132 (1967).
- 63) 畑中千歳, 小沢潤一郎, *農化*, **40**, 98-105 (1966).
- 64) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 65) P. Albersheim, D. J. Nevins, P. D. English, and A. Karr, *Carbohydr. Res.*, **5**, 340-345 (1967).
- 66) 日下部功, 神山由, 安井恒男, *農化*, **51**, 167-169 (1977).
- 67) C. Hatanaka and Y. Kobara, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2943-2949 (1980).
- 68) 松橋信平, 畑中千歳, *農化*, **65**, 883-885 (1991).
- 69) U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 70) P. Andrews, *Biochem. J.*, **96**, 595-606 (1965).
- 71) 塩田芳之, 松浦康, 畑中千歳, *日食工誌*, **29**, 712-719 (1982).
- 72) 松浦康, 畑中千歳, 小沢潤一郎, *農化*, **47**, 497-501 (1991).

- 73) M. Morita, *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 626-630 (1965)
- 74) J. A. de Vries, C. H. den Ujil, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, and W. Pilnik, *Carbohydr. Polym.*, **3**, 193-205 (1983).
- 75) 前田裕一, *食品と科学*, **27**, 47-49 (1992).
- 76) I. Asai, T. Ohmoto, K. Hirahara, K. Masutake, H. Iida, T. Ohashi, H. Furuta, and H. Maeda, Effect of Soluble Soybean Polysaccharides on Dispersion Stability of Artificially Acidified Milk Protein, in "Functional Properties of Polysaccharide. Fundamentals and Applications, Foods, Pharmaceuticals and Cosmetics.", 52-56 (1993).
- 77) C. M. G. C. Renald, and J. Thibault, *Carbohydr. Res.*, **244**, 99-114 (1993).
- 78) G. L. Baker, and C. W. Woodmansee, *Fruit Prod. J. Am. Food Manuf.*, **28**, 164-185 (1944).
- 79) R. M. McCready, A. D. Shepherd, and W. D. Maclay, *Fruit Prod. J. Am. Food Manuf.*, **26**, 36-39 (1942).
- 80) T. F. Schweizer, A. R. Bekhechi, B. Koellreutter, S. Reiman, D. Pometta, and B. A. Bron, *Clin. Nutr.*, **38**, 1-11 (1986).
- 81) Z. Mader, *Am. J. Clin. Nutr.*, **38**, 388-393 (1983).
- 82) J. W. Erdman and E. J. Fordyce, *Am. J. Clin. Nutr.*, **49**, 725-737 (1989).
- 83) F. Yamaguchi, H. Kojima, M. Muramoto, Y. Ota, and C. Hatanaka, *Biosci. Biochem. Biotech.*, **60**, 2028-2031 (1996).
- 84) F. Yamaguchi, M. Muramota, N. Shimizu, and Y. Ota, *Food Tech. Inter.*, 印刷中
- 85) C. Révész and C. Demigne, *Biochem. J.*, **141**, 85-91 (1974).
- 86) 古田均、前田裕一、武井千恵美、津村和伸、森弘之, 特開平 3-236759
- 87) 星祐二、大豆の科学 (朝倉書店)、p. 134-151 (1992).
- 88) D. W. James, Jr., J. Preiss, and A. D. Elbein, "The Polysaccharides" Vol. 3, ed. by G. O. Aspinall, Academic Press,

- 1985, pp. 107-207.
- 89) P. M. Dey and K. Brinson, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, 265-382 (1984).
- 90) 綾野雄幸, 太田富貴雄, 渡辺幸雄, 中村強, 滝沢まゆみ, *栄養と食糧*, **35**, 431-439, (1982)
- 91) 竹内政保, 菅原正義, 高庄敏幸, 江頭祐嘉合, 真田宏夫, 綾野雄幸, *日食工誌*, **38**, 981-989, (1991)
- 92) K. C. B. Wilkie, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **36**, 215-264 (1979).
- 93) K. Nishitani and D. J. Nevins, *Plant Physiol.*, **91**, 242-248 (1989).
- 94) N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hanson, *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489 (1973).
- 95) T. M. C. C. Filisetti-Cozzi and N. C. Carpita, *Anal. Biochem.*, **197**, 157-162 (1991).
- 96) 小林幹彦, *多糖の分離・精製法*, 初版 (学会出版センター, 東京), p. 19, (1987)
- 97) 土井悦四郎, *食品工業における化学, 技術の進歩 (II)*, 第1版 (光琳, 東京), p. 81, (1986)
- 98) 野口明德, 五十部誠一郎, *日食工誌*, **33**, 798-804 (1986)
- 99) G. J. Tyson and W. Madison, USP 4842877
- 100) 小笠原武雄, 佐々木康人, 窪田正二郎, 片岡軍司, 特開平2-124069
- 101) 青江誠一郎, 小田泰士, 中岡正令, 黒沢誠治, 特開平2-276801
- 102) 山口文秀, 清水典子, 川田正美, 高木義和, 前田進, *日食工誌*, **39**, 625-628 (1992).
- 103) 福本寿一郎, 辻阪好夫, 竹西繁行, *農化*, **44**, 447-456 (1970).
- 104) I. M. Morrison, *Phytochemistry*, **27**, 1097-1100 (1988).
- 105) L. Hough, J. V. S. Jones, and P. Wusteman, *Carbohydr. Res.*,

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御助言を頂いた広島大学太田安英教授に感謝の意を表します。また、長年に渡り有益なる御助言を頂いた広島大学永松康德助教授に感謝の意を表します。

さらに、今回の学位取得の機会を頂いた藤田哲・前日本たばこ産業株式会社食生活研究所所長（現（株）ジェイティキャニング参与）、加藤陽・日本たばこ産業株式会社食生活研究所所長に心からの感謝の意を表します。また、共同研究者でもある食生活研究所機能性チームの諸氏、半年間の研修中、共に仕事をした広島大学酵素化学研究室の諸氏、および、厳しい日程の商品開発の中での今回の論文作製を温かく見守って頂いた食生活研究所第2研究チームの諸氏の御支援なくしては本論文はまとまらなかったと思います。ここに感謝の意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたり終始温かく御指導して頂いた、故・畑中千歳先生に深く感謝すると共に、本研究は恩師の志を継ぐものであることをここに表します。