

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18500602

研究課題名 (和文) “とろみ” 特性を有するカリン種子分泌多糖の構造と  
機能性に関する研究研究課題名 (英文) Structure and rheological properties of the seed-surface  
mucilage of Karin (*Chaenomelese sinensis*).

研究代表者

中田 忍 (NAKATA SHINOBU)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：00164210

研究成果の概要 (和文) : カリン果実中の種子表層から分泌される粘性多糖の構造と物性についての検討を行い、以下のような結果を得た。カリン種子粘性多糖には $\beta$ -1,4 結合のキシログルカンと側鎖にアラビノースを有するグルクロノキシランの 2 種類の多糖分子鎖から構成され、粘性の発現にはおそらく水素結合により会合していると思われるこの 2 種の多糖の存在、とりわけ側鎖の存在が重要であることが示唆された。また、安定した粘性とともに適度な保湿性も有することから、食品分野における嚥下補助材等などへの応用が期待される。

研究成果の概要 (英文) : The seeds of Karin (*Chaenomelese sinensis*), usually discarded, are surrounded with transparent mucilage, which appears readily extractable with water to give hydrocolloidal solution. We report the structural features of Karin seed-surface mucilage and its colloidal characteristics. The structural feature of Karin seed-surface mucilage was assumed as *O*-2-substituted D-glucurono-L-arabino-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xylan. This unique seed-surface mucilage may be built up with the above acidic polysaccharide and D-xylo (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan, associated by intermolecular hydrogen bonding. Fibrous form cellulose was not found by hydrolysis of the Karin mucilage, not like quince. The thixotropic behavior and water-holding capabilities of the mucilage show Karin seed mucilage is appreciable to food additives and cosmetic utilization, such as lotion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2700,000	0	2700,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
2009 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
総計	3800,000	330,000	4130,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：1502

キーワード：粘性多糖、増粘剤、キシログルカン

## 1. 研究開始当初の背景

従来の知見では、カリンの果実自体の香りやポリフェノール系の成分について検討した報告はあるが、種子部分から得られる粘性成分についての報告は見られない。カリン以外の植物種子から抽出される粘性物質については、オオバコ (*Plantago psyllium*) 種子やマルメロ (*Cydoniavulgaris coblona*) などがこれまで知られている。特にカリンとは植物学的に類縁植物であるマルメロ種子の粘性物質については、これが酸性多糖であり、セルロースとマイクロフィブリルを形成して混在するとされている。しかしながら、カリンの粘性発現は、セルロースマイクロフィブリルではなく、キシログルカンの存在によることが強く予想されており、このことから従来のマルメロの粘性発現機構も再検討すべきとも考えられた。カリン粘性多糖の構造と粘性発現との関連を検討することは、カリンのみならず、粘性を有さない糖鎖を修飾することによりユニークな新規粘性物質の開発も可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

カリン (*Chaenomeles sinensis*) は中国原産でバラ科に属し、果実は硬くて酸味が強いので生食には適さないが、強い芳香を有しており、砂糖漬けや果実酒、乾燥させて咳止め等の薬用として現在利用されている。この果実から得られる種子を水中に放置すると非常に粘性の強い溶液が得られること、この粘性を発現する物質が高濃度にウロン酸を含む酸性多糖 (グルクロノアラビノキシラン) とキシログルカンであることをすでに明らかにしてきた。この粘性溶液は透明性が高く、触感が非常になめらかであるので、保湿剤として、また、カリンの果実自体が古来より親しまれてきた天然食品素材でもあることから、食品に添加する増粘剤や乳化剤等としての用途も考えられる。現在の食生活においては多様な粘性食品に対する注目が高まりつつあり、安全な増粘剤の開発は、今後さらに増加すると予想される、嚥下困難な高齢者等の介護食用添加剤としての用途が期待できる。また、対象としている種子部分は現在ほとんど利用されておらず、その機能性に対する知見が乏しいことから、有効成分を検索し利用することは工業的にも高い価値が期待できる。これらの用途に資するために、粘性多糖の構造を詳細に解析し、その物理化学的性質を解明し、高分子糖鎖構造を明らかにすることと、粘性を発現する機構を解明し、粘性の発現に重要な因子、保湿性などの機能性との相互作用を検討し、その上で、食品や介護食などのメディカルケアへの応用を検討することとした。

## 3. 研究の方法

### ① カリン種子粘性酸性多糖の調製

新鮮なカリン(山形県産)を購入後、ただちに種子を取り出した。種子重量の5倍容の水に一晩浸漬後、種子固形物を取り除き、透明な高粘性水溶液を得た。膨潤した種子の切片は顕微鏡下にて種子外皮表層に幅数 $\mu\text{m}$ 、高さ十数 $\mu\text{m}$ の袋状の構造物が観察され(図1)、粘性物質はこの部分から分泌されると考えられる。さらに種子には水を加え、同様の操作を2回繰り返した。得られた高粘性溶液に4倍容のエチルアルコールを加え、得られた沈殿物を水に透析後、凍結乾燥を行った。(カリン種子粘性多糖、収量: 種子湿重量の約3%)

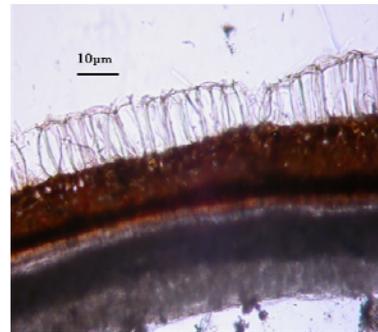


図1. カリン種子断面の顕微鏡写真 (100倍)

### ② 酵素分解および酸による部分加水分解

カリン種子粘性多糖の一部を0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解し、セルラーゼ(ONOZUKA R-10、(株)ヤクルト)を加え、40°Cで一晩反応させ、酵素を熱失活後、透析により高分子画分を得た。この高分子画分を酸で部分加水分解(1Nトリフルオロ酢酸(TFA)、80°C、6h)した後、陰イオン交換カラム(AG1-X8、1.5×10cm)を用いて、吸着されない中性オリゴ糖画分と、1N酢酸溶液にて溶出される酸性オリゴ糖画分を得た。

### ③ 糖の化学分析

多糖は酸加水分解(2N TFA、120°C、6h)、中和後に生成単糖をアルジトールアセテート(alditol acetate)誘導体としてGLCにより中性糖の分析を行った(カラム: TC-70、温度210°C)。オリゴ糖の分析はDionex社の陰イオン液体高速クロマトグラフィーを用いたHPAEC-PAD(High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)法により解析した。溶出液として150mM水酸化ナトリウム溶液と150mM水酸化ナトリウム/0.1M酢酸ナトリウム溶液を用い、40分間で酢酸ナトリウム濃度150-400mMとなるようにグラディエントプログラムを設定して溶出した(流速1.0 mL/分)。

多糖のメチル化は箱守法により行い、加水

分解後の部分メチル化単糖をアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーにより同定した。

全糖量の定量はマイクロ化したフェノール硫酸法により行い、ウロン酸の定量はヒドロキシジフェニール法により測定し、全糖量に対するウロン酸の比率を算出した。カルボキシル基の還元は carbodiimide を用いて行った。

#### ④ 粘度測定

測定にはE型回転粘度計(VISCONIC E型、東京計器)を用いた。

#### ⑤ 保湿性の測定

NH<sub>4</sub>Cl 飽和水溶液を用いて相対湿度を75%に調整したデシケータ中に精秤した多糖試料を重量一定になるまで放置、その後塩化カルシウム飽和水溶液にて35%に調整したデシケータ内で同様に放置、試料の増加重量をその湿度での吸収水分量として算出し、各相対湿度での水分保持率を求めた。

### 4. 研究成果

#### ① カリン種子粘性酸性多糖の構造解析

カリン種子粘性酸性多糖は構成糖として arabinose、xylose、glucose (モル比 1.0 : 2.2 : 3.2) の他にウロン酸を23%含んでいた。また、旋光度は  $[\alpha]_D -60.5^\circ$  (0.25%, 0.1N NaOH) を示した。カリンの近縁種であるマルメロ種子の水溶性多糖中にはセルロースマイクロフィブリル (cellulose microfibrils) が存在することが報告されている。一方、カリン種子より得られた粘性酸性多糖にセルラーゼを作用させると、粘性の低下が観察された。酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中、40°C でセルラーゼを反応させながら回転粘度計で経時的に粘度測定を行った結果、図2に示すように、反応開始5分から急激な粘度低下が起こり、1時間後には反応前の40%にまで粘度が低下した。そこで、セルラーゼ作用後の粘性酸性多糖溶液を透析することにより、透析膜内液の高分子画分と膜外液の低分子画分を得、各画分について糖鎖構造の検討を行った。

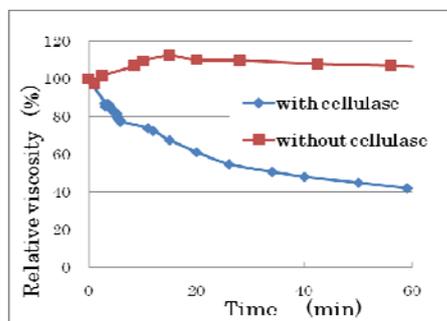


図2. カリン粘質多糖の粘性に及ぼすセルラーゼの影響

膜外液の低分子画分にはグルコース以外にオリゴ糖 (cellobiose、isoprimeverose

など) が存在したが、ウロン酸は存在しなかった。 $\beta$ -D-galactosidase (E. C. 3. 2. 1. 23, from *Asp. oryzae*) を作用させると galactose の遊離が確認されたことから xylose に galactose は  $\beta$  結合していると考えられる。また、galactose、isoprimeverose が存在することから、カリン粘性多糖中には cellulose microfibrils ではなく、galacto-xyloglucan の存在することが示された。(図3)

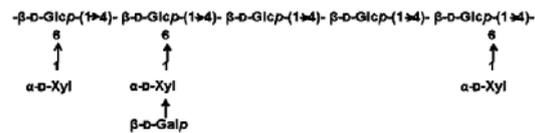


図3. カリン粘性多糖 xyloglucan の推定構造

高分子画分は主要中性糖として arabinose、xylose、galactose (1.0 : 2.7 : 0.4) を含み、さらに36.6%含まれているウロン酸はグルクロン酸 (GlcUA) であることを HPAEC により確認した。ウロン酸の結合は比較的酸加水分解に対して強いので、部分水解を行い、アルドビウロン酸 (aldobiuronic acid) の分離を行った。部分水解後に得られた中性オリゴ糖画分 (rhamnose : arabinose : galactose : glucose : xylose tr : 1.5 : 0.4 : tr : 3.0) と xylose を主とし、グルクロン酸を含む酸性オリゴ糖画分 ( $[\alpha]_D +66.5^\circ$ , 0.4%) を得た。そこでこの画分について Bio Gel P-2 カラムを用いてゲル濾過を行い、二糖に相当する主要糖画分を分離し、その一部についてカルボキシル基還元の後、メチル化分析を行った。(表1) カルボキシル基還元後に末端 glucose に相当する

2, 3, 4, 6-tetra-O-Me-glucose が出現したこと、また、3, 4-di-O-Me-xylose が認められたので、この部分のオリゴ糖は一種の aldobiuronic acid と推定された。さらに酸性多糖の結合様式を検討するために、メチル化分析を行った結果、非還元末端の arabinose、glucose、1, 4 結合の xylose、さらに2位に枝分かれをもつ xylose 残基の存在が認められ、1, 4 結合の xylose を主鎖とし、側鎖として GlcUA、glucose、arabinose が結合することが示唆された。(図4)

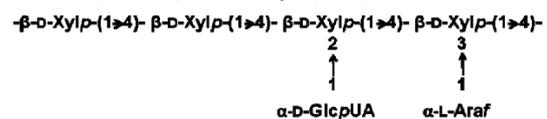


図4. カリン種子酸性多糖

gulucurono-xyloglucan の推定構造

表1. メチル化分析の結果

	Linkage indicated	Molar ratio	
		Native	After -COOH reduction
<b>[ Acidic oligosaccharide fraction]</b>			
3, 4-di-O-Me-Xyl	2→Xyl <sub>p</sub> 1→	1.0	1.0
2, 3, 4, 6-tetra-O-Me-Glc	Glc <sub>p</sub> 1→	-	0.6
	Glc <sub>u</sub> 1→		
<b>[ Neutral oligosaccharide fraction]</b>			
2, 3, 4-tri-O-Me-Ara	Ara <sub>4</sub> 1→	1.15	0.98
2, 3, 4, 6-tetra-O-Me-Glc	Glc <sub>p</sub> 1→	0.48	0.94
2, 3, 6-tri-O-Me-Gal	→4Gal <sub>p</sub> 1→	-	1.23
2, 3-di-O-Me-Xyl	→4Xyl <sub>p</sub> 1→	tr	1.00
3-O-Me-Xyl	→4Xyl <sub>p</sub> 1→ 2	1.27	1.08

これら xyloglucan と gulucurono-xyloglucan は分子鎖が共有結合するのでなく、分子鎖の会合した形で存在し、粘性の発現にはこの会合状態が不可欠であると考えられる。マルメロ種子粘質物には cellulose microfibrils が存在し、酸性多糖に物理的に絡まる形で存在すると言われているが、われわれの検討結果からカリンと同様に xyloglucan の可能性も考えられる。

### ② カリン種子酸性多糖の粘性

カリン種子粘性多糖は thixotropic な粘性の挙動を示した。(図 5)

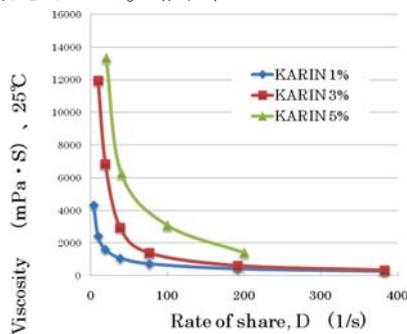


図 5. カリン種子粘性多糖の粘性

この粘性の発現に対する xyloglucan の影響を明らかにするために、セルロース、または構造のよく知られた xyloglucan であるタマリンドの xyloglucan (TXG) を添加し、粘性を測定した。TXG の構造はセルラーゼでカリンの粘性多糖から分解除去される xyloglucan に類似し、より側鎖の多い構造であることが知られている。各成分が単独で示す粘度に比べてより粘度が増大することが認められた。(図 6) セルロース (cellulose, powder, ~20 μ, Sigma-Aldrich Co. Ltd.) を同量添加した場合にはこのような粘性の

上昇は示さなかったことから、glucan の側鎖部分の存在が粘性発現に重要であることが示唆された。一方、カリン酸性多糖のカルボキシル基を還元した場合には TXG の添加による粘性上昇はなく (粘性は 1/10 以下)、粘性発現には酸性多糖のカルボキシル基とグルカンの側鎖が同時に関与するものと考えられる。

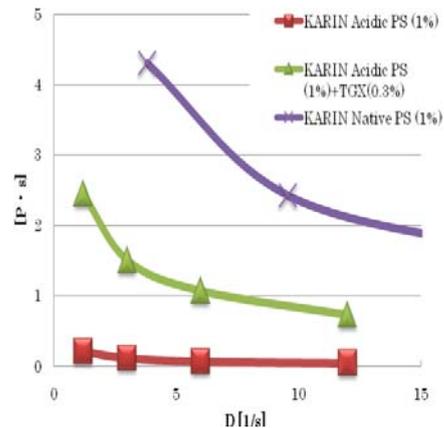


図 6. カリン多糖の粘性に対するタマリンドキシログルカンの影響

### ③ カリン種子酸性多糖の保湿性

保湿特性について他の多糖試料と比較して行った。相対湿度を 75% および 35%、それぞれの相対湿度での水分保持率およびその変動幅を図 7 に示した。ヒアルロン酸やじゅんさいの水溶性多糖<sup>7,8)</sup> は吸湿量が高く変動幅も大きい、カリンは中間的な値を示した。

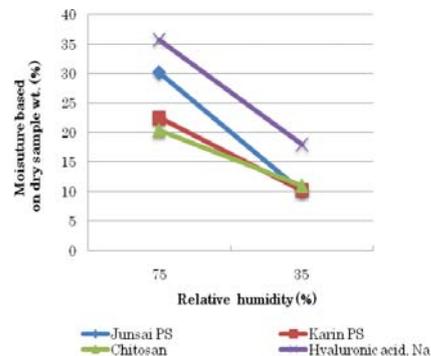


図 7. カリン種子粘質多糖の保湿性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ①中田忍、角田万里子、三崎旭、  
カリン(*Chaenomelese sinensis*) 種子由来の  
粘性多糖の糖鎖構造と”とろみ”特性、微量  
栄養素研究、査読あり、第 26 巻、2009、  
pp. 46-49

〔学会発表〕(計 3 件)

- ①中田 忍、角田 万里子、三崎 旭、カリン(*Caenomelese sinensis*) 種子由来の粘性多糖の糖鎖構造と“とろみ”特性、第 26 回日本微量栄養素学会学術集会、2009 年 6 月 5 日、京都リサーチパーク (京都)

- ②中田 忍、角田 万里子、三崎 旭、  
カリン(*Caenomelese sinensis*) 種子表層から  
分離した粘性多糖の糖鎖構造と機能特性、第  
29 回日本糖質学会年会、2009 年 9 月 10 日、  
飛騨・世界生活文化センター (岐阜)

- ③Shinobu Nakata, Mariko Kakuta, and Akira Misaki,  
Structure and hydrocolloidal properties  
of the seed-surface mucilage of Karin,  
*Chaenomelese sinensis*.、The 2008 Plant  
Polysaccharide Workshop、2008 年 8 月 4 日、  
Sigtuna (Sweden)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 忍 (NAKATA SHINOBU)  
大阪教育大学・教育学部・教授  
研究者番号：00164210

### (2) 研究分担者

角田 万里子 (KAKUTA MARIKO)  
甲南女子大学・人間科学部・教授  
研究者番号：00131516