

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：27301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650498

研究課題名(和文) 正確な健康情報を提供するための難消化性オリゴ糖量の高精度評価法に関する研究

研究課題名(英文) Study on establishment of high precise determination method for nondigestible oligosaccharide

研究代表者

田辺 賢一 (Tanabe, Kenichi)

長崎県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：60585727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食物繊維や難消化性オリゴ糖は複雑多様なため、画一的かつ正確な定量法が確立されていない。そのため、本研究の目標は、難消化性糖質の正確な定量法を開発することである。本研究では、難消化性オリゴ糖公定法のAOAC 2009.01法の欠陥を証明し、その問題点を解決した改良変法を提案することを目的とした。

AOAC 2009.01法では、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖が水解されず、難消化性オリゴ糖として定量される問題点を明らかにした。我々が提案するブタ小腸粘膜酵素を用いた改良変法は、加工食品中の消化性オリゴ糖を確実に水解し、難消化性オリゴ糖と消化性糖質を区別して正確に定量できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Developing an accurate quantitative method for nondigestible oligosaccharides is a long-term project. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) method 2009.01 was recently developed. However, the method may not be able to measure nondigestible oligosaccharides accurately. The objectives of this study were to clarify the inaccuracy of AOAC method 2009.01 for the measurement of nondigestible oligosaccharides and to propose an improved method.

AOAC method 2009.01 was able to hydrolyze digestible oligosaccharides. The method could not accurately quantify oligosaccharides because it could not be used to distinguish between digestible and nondigestible oligosaccharides. To solve this problem, we proposed an improved method using porcine intestinal enzymes instead of amyloglucosidase. The improved method completely hydrolyzed digestible oligosaccharides, and distinguished nondigestible oligosaccharide from digestible oligosaccharide in commercially available processed food.

研究分野：保健栄養学

キーワード：難消化性オリゴ糖 定量法 食品分析 プレバイオティクス 難消化性糖質 食物繊維 ルミナコイド

1. 研究開始当初の背景

国民の健康に対する関心が高い現代においては、多様な健康効果が期待できる難消化性オリゴ糖や食物繊維を利用した様々な健康志向食品が市場に出回っている。消費者が期待する健康効果が得られるような正確な食品成分表示を実現させるには、正確な難消化性糖質定量法は不可欠である。しかし、その統一定量法は未だ確立されていない。

栄養表示基準制度で採用されている難消化性オリゴ糖定量法の AOAC 2001.03 法では、酵素処理過程に欠陥があるため、消化性糖質が難消化性として誤って定量されることを我々は明らかにしている。一方、近年になって新たな難消化性オリゴ糖の定量法として AOAC 2009.01 法が開発されたが、その原理は AOAC 2001.03 法を踏襲しているため、定量法の欠点は改善されていない可能性が高い。我々は、AOAC 2009.01 法に採用されている *Aspergillus niger* 由来のアミログルコシダーゼ(低分子糖質加水分解酵素)に着目し、その酵素を哺乳類由来の小腸粘膜酵素に代替することによって、問題点を解決できると仮説を立てて検証することにした。

2. 研究の目的

食物繊維や難消化性オリゴ糖などは機能性食品素材として健康志向食品に積極的に使用されている。それゆえ、食品中の難消化性糖質含量を明らかにすることは、消費者が期待する生理機能を保証するうえで重要である。本研究の最終目標は、食物繊維ならびに難消化性オリゴ糖の統一定量法を確立させることである。本研究では、難消化性オリゴ糖の定量に焦点を置き、AOAC 2009.01 法では難消化性オリゴ糖を正確に定量できないことを実証し、その要因を明らかにすると共に、その問題点を解決した改良変法の確立を試みた。

3. 研究の方法

1. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証

AOAC 2009.01 法の問題点を明らかにするため、難消化性オリゴ糖としてフラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖ならびにラフィノースの3種類を用いた。消化性オリゴ糖としてスクロース、イソマルチュロース、カップリングシュガー[®]、マルトトリオース、パノースならびにイソマルトオリゴ糖の6種類を試験物質として用いた。実験方法は、AOAC 2009.01 法に準じて実施し、試験物質を正確に定量できるか否かを検討した。本研究の正確とは、消化性オリゴ糖は加水分解されて定量されず、難消化性オリゴ糖は加水分解されずに定量されることを示している。

2. AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の検証

AOAC 2009.01 法の問題点を明らかにするため、定量法に採用されている *Aspergillus niger* 由来のアミログルコシダーゼを用いて、その基質特異性ならびに AOAC 2009.01 法に添加している酵素添加量(Unit)が適切であるか検討した。

3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法の提案と検証

本研究で提案する改良変法は、*Aspergillus niger* 由来のアミログルコシダーゼの替りとしてブタ小腸粘膜酵素を用いることにした。改良変法と AOAC 2009.01 法の差異は、酵素を代替することのみとし、実験手順ならびに操作等に差異がないようにした。

ブタ小腸粘膜酵素の妥当性の検討は、ヒト小腸粘膜酵素と基質特異性の比較を実施した。また、改良変法へのブタ小腸粘膜酵素の添加量(Unit)は、 α -グルコシダーゼ unit 量を基準とし、消化性糖質である可溶性デンプン、スクロースならびにイソマルトオリゴ糖が完全に加水分解される酵素添加量を検討して決定した。

改良変法が難消化性オリゴ糖を正確に定量できるか否かを検討するため、まず始めに、前述の実験と同じ3種類の難消化性オリゴ糖ならびに6種類の消化性オリゴ糖を試験物質とし、定量実験を実施した。

その後、市販クッキーに難消化性オリゴ糖を添加して調製したオリゴ糖含有モデル食品ならびに市販されている難消化性オリゴ糖含有食品を試験物質とし、AOAC 2009.01 法ならびに容器包装に記載されている難消化性オリゴ糖含有量と定量結果を比較・評価した。

4. 研究成果

1. AOAC 2009.01 法によるオリゴ糖定量の問題点の検証

平成 24 年、25 年度には、AOAC 2009.01 法では、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるスクロース、イソマルチュロース、カップリングシュガー[®]、パノースならびにイソマルトオリゴ糖が加水分解されず、難消化性オリゴ糖として定量される問題点を明らかにした。

2. AOAC 2009.01 法に用いられているアミログルコシダーゼによるオリゴ糖水解能の検証

AOAC 2009.01 法のオリゴ糖定量における問題点の原因は、AOAC 2009.01 法指定の *Aspergillus niger* 由来のアミログルコシダーゼでは、基質に対する特異性が強いために小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖であっても水解できずに難消化性オリゴ糖として誤って定量されることを明示した。また、AOAC 2009.01 法指定の酵素添加量では、酵素添加量が不十分であるため、消化性オリゴ糖を加水分解することができずに難消化性オリゴ

糖として定量されることも明らかにした。

3. AOAC 2009.01 法のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替した改良変法の提案と検証

平成 25 年、26 年度は、AOAC 2009.01 法の難消化性オリゴ糖定量における問題点を解決するため、AOAC 2009.01 法に用いられている *Aspergillus niger* 由来のアミログルコシダーゼをブタ小腸粘膜酵素で代替し、より正確な定量法の開発を試みた。その結果、本研究で提案する改良変法は、ヒト小腸粘膜酵素で消化されるオリゴ糖を確実に加水分解し、難消化性オリゴ糖と消化性糖質を区別して定量できることを提示した。また、市販クッキーに難消化性オリゴ糖を添加して調製したオリゴ糖含有モデル食品を測定試料としても、改良変法は食品中の難消化性オリゴ糖のみを正確に定量できることを明らかにした。次いで、市販されている難消化性オリゴ糖含有特定保健用食品や健康食品を測定試料とした場合においても、食品中の消化性オリゴ糖を単糖まで加水分解し、難消化性オリゴ糖のみを定量できることを提示した。また、得られた定量結果は、容器包装に記載されているオリゴ糖含有量と同程度であった。以上の結果、改良変法は、AOAC 2009.01 法と比較し、より正確に難消化性オリゴ糖を定量できることが示唆された。さらに、改良変法の難消化性オリゴ糖定量における定量結果の室内再現性を検討した結果、その室内再現性は高かった。したがって、改良変法は難消化性オリゴ糖定量法として精度が高いことも示唆された。

AOAC 2009.01 法の改良変法は、今後解決すべき課題を抱えているが、難消化性オリゴ糖を包括する難消化性糖質（広義の食物繊維）の正確な定量法になりうると考える。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Tanabe K, Nakamura S, Oku T. Inaccuracy of AOAC method 2009.01 with amyloglucosidase for measuring non-digestible oligosaccharides and proposal for an improvement of the method. Food Chemistry 2014, 151: 539-546.
2. Tanabe K, Nakamura S, Omagari K, Oku T. Determination Trial of Nondigestible Oligosaccharide in Processed Foods by Improved AOAC Method 2009.01 Using Porcine Small Intestinal Enzyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry (in press).

〔学会発表〕（計 8 件）

1. ○田辺賢一，中村禎子，奥 恒行：難消化性オリゴ糖定量法(AOAC 2009.01 法)

の問題点とその改善策の提案．日本食物繊維学会学術集会、2012 年 11 月 23 日～11 月 24 日、中村学園大学（福岡県福岡市）。

2. ○田辺賢一，中村禎子，奥 恒行：難消化性オリゴ糖定量法(AOAC 2009.01 法)における問題点とその改善策．日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 24 日～5 月 26 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）。
 3. ○田辺賢一，中村禎子，奥 恒行：AOAC 2009.01 公定法の酵素 - HPLC 法(難消化性オリゴ糖定量法)を基にした改良変法の妥当性に関する研究．日本食物繊維学会学術集会、2013 年 11 月 23 日～24 日、仁愛大学(福井県)
 4. ○田辺賢一，中村禎子，大曲勝久，奥 恒行：AOAC 2009.01 公定法の酵素 - HPLC 法を基にした改良変法による加工食品含有難消化性オリゴ糖定量の精度検討．日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日～6 月 1 日、酪農学園大学(北海道)
 5. ○田辺賢一，中村禎子，大曲勝久，奥 恒行：正確な健康情報を消費者に提供するための難消化性オリゴ糖定量法の開発に関する研究．日本応用糖質科学会、2014 年 9 月 23 日～9 月 26 日、朱鷺メッセ(新潟市)
 6. ○田辺賢一，中村禎子，奥 恒行：AOAC 2009.01 公定法(食物繊維定量法)を基にした改良変法に用いるブタ小腸粘膜酵素の妥当性の検討．日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会、2014 年 10 月 11 日～10 月 12 日、熊本県立大学(熊本市)
 7. ○田辺賢一，中村禎子，大曲勝久，奥 恒行：AOAC 公定法 2009.01 の改良変法による難消化性グルカン，難消化性デキストリンならびにポリデキストロースの総食物繊維定量の試み．日本食物繊維学会学術集会、2014 年 11 月 29 日～11 月 30 日、大妻女子大学(東京)
 8. ○Kenichi Tanabe，Sadako Nakamura，Tsuneyuki Oku. Inaccuracy of AOAC method 2009.01 with amyloglucosidase for measuring nondigestible oligosaccharides and proposal for an improvement of the method. Asian Congress of Nutrition, May 14-17, 2015, Yokohama, Japan
6. 研究組織
- (1)研究代表者
田辺 賢一 (Tanabe Kenichi)
長崎県立大学・看護栄養学部・助教
研究者番号：60585727

(2)研究分担者

奥 恒行 (Oku Tsuneyuki)
十文字学園女子大学・人間生活学部・客員
教授
研究者番号：50010096

中村 禎子 (Nakamura Sadako)
十文字学園女子大学・食・栄養・健康研究
所・客員研究員
研究者番号：60382438