

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：12101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06538

研究課題名(和文)豆類多糖類の分子構造の解析と食品における物性機能の研究

研究課題名(英文) Analysis of molecular structure of polysaccharides from beans and research on physical properties in foods

研究代表者

中村 彰宏 (Nakamura, Akihiro)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：00803735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マメ類多糖の構造と機能に関する網羅解析を目指し、レンズマメとインゲンマメに注目し、レンズマメ多糖(LPS)とインゲンマメ多糖(KPS)の基本物性の解析、原子間力顕微鏡(AFM)による構造解析、酸性乳飲料の安定化機能について解析した。LPSは分子量83万(pH4抽出)と110万(pH8抽出)、KPSは分子量250万の高分子多糖であった。水易溶性の低粘度多糖であり、ニュートン流体の挙動を示した。AFMで解析した構造はLPSが多分岐型、KPSが分岐のある直鎖型であった。いずれもガラクトン酸を含む酸性多糖類であり、酸性下で乳タンパク質粒子の凝集を抑える分散安定剤としての機能を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、ダイズ、レンズマメ、インゲンマメのマメ類種子の細胞壁を構成する水溶性多糖類は、分子量50万～250万の分岐構造を持つ多糖類であり、増粘やゲル化の物性機能は示さないがタンパク質など電荷を持つ粒子を増粘を伴わず微細分散する機能を有する事が明らかになった。食品の加工と保存において物性機能素材は不可欠である。一方、マメ類種子はそのまま食材として利用されるだけでなく、デンプン、油脂、タンパク質などの構成成分が分離されて活用される。ところが約40%を占める繊維は飼料として活用されるに留まっている。本研究成果は、繊維から新規な食品の物性機能素材を創出するものであり、学術的、社会的意義は深い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on lentils and kidney beans for comprehensive analysis of the structure and function of legume polysaccharides. Analysis of basic physical properties of lentil polysaccharide (LPS) and kidney bean polysaccharide (KPS), structural analysis by atomic force microscope (AFM), and stabilization function for acidified milk beverages were studied.

The molecular weight of LPS was estimated to be 0.83 million (pH 4 extraction) and 1.1 million (pH 8 extraction), while that of KPS was estimated to be 2.5 million. Those are low-viscosity polysaccharides readily dispersible in water, and exhibit Newtonian fluid behavior. The structure analyzed by AFM was that LPS showed multi-branched and LPS showed linear with branching. Both LPS and KPS were acidic polysaccharides containing galacturonic acid as a component sugar, and had the function as a dispersion stabilizer which suppresses aggregation of milk protein particles under acidic conditions.

研究分野：食品科学

キーワード：多糖類 食品 原子間力顕微鏡 分子構造 物性機能 機能改変 ナノテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

食品の加工及び製造技術や保存技術は、食品が持つ一次機能、二次機能、並びに三次機能に配慮し、食品成分の機能を生かした技術が活用されている。食品は衛生的に製造、消費されなければならない。殺菌技術、充填技術、包装技術、流通技術、保存技術など多様な技術改革が進められてきた。一方、消費者にとって極めて重要なのは、購入する商品がいつでも同品質、同価格で購入できることであり、食品の大量生産技術は、生産者のみならず、消費者にとっても極めて重要なファクターである。

このファクターを満たすために、生産技術と並び重要なのが、食品の設計であり、物性や食感を調整する添加物として様々な多糖類が利用されている。多糖類は、食品に0.05%～数%添加することで、その物性を大きく変える機能性素材である。カードラン、ジェラン、キサントラン、ウレランといった微生物が分泌するものや、アラビアガム、ペクチン、寒天、カラギーナン、グアガム、大多糖類のように植物の細胞壁を構成するものなど、その起源と特性は多岐に渡る。これら多糖類が利用される目的は、食品の製造、流通と保存、消費者の嗜好性の3つが挙げられる。これらの目的に合わせ、食品を製造する際には、複数の多糖類が併用されるが、先に述べた通り、起源により構造は勿論、特性が大きく異なるため、開発担当者は感覚的に（職人技で）多糖類を選び、食品に配合することが常であり、科学的根拠に基づく多糖類の利用技術が求められてきた。

多糖類の研究は、製造会社と公的研究機関の協業により、欧州（イギリス、オランダ、フランス中心）と米国で積極的に進められてきた。その研究は物性に関するものが殆どであり、構造については部分的な構造を解析するに留まっている。多糖類の構造に関する先端の研究は、Wrexham glyndwr 大学（イギリス）の William 教授のグループと Wageningen 大学（オランダ）の Schols 教授のグループが積極的に進めているが、多糖類の特徴的な部分構造に関する報告が殆どである。多糖類は、構成糖が多く、分子量が数万から数百万と均一ではないこと、更に、直鎖に限らず、分岐した構造を持つ場合も多く、従来の化学的及び物理化学的手法による解析では全体構造を明らかにすることが極めて難しかったためである。

我々はこれまでの大豆多糖類に関する研究で、構造、物性、食品機能（物性機能）について研究し、多くの技術と知見を得た。この一連の研究により、多糖類の構造と物性は相関があり、物性と食品における機能、例えば、ゲル化、乳化、分散などは、物性は勿論、構造とも相関が高いことを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究は、我々の大豆多糖類に関する一連の研究を発展させ、様々な植物資源から多糖類を抽出し、その構造、物性を解析するとともに、食品に利用した時の機能を網羅的に解析し、その相関図を完成することを目的とする。この相関図が完成することで、「構造」と「食品における機能」が直結となり、これまで「職人技」であった多糖類を用いた食品の設計を科学的根拠に基づいて実践できると考えている。

3. 研究の方法

平成29年度は、植物資源としてダイズやエンドウに次いで世界中で栽培されるレンズマメとインゲンマメを対象とし、多糖類を抽出した。原子間力顕微鏡（以下、AFM）によるマメ類多糖類の構造解析を進める一方、水溶解性、粘度特性などの基本物性を解析した。平成30年度は、大豆多糖類の研究で構築した酸性乳飲料（いわゆる、乳酸菌飲料）の評価系を用い、調製したマメ類多糖類による乳タンパク質の分散安定化の機能を解析した。

平成29年度

(1) 研究材料の調製

マメ類多糖類の抽出から研究を開始した。マメ類（レンズマメとインゲンマメ）を脱皮したのち、組織を磨砕し、除澱粉及び除タンパクを行った。多糖類を含む繊維を遠心分離により得た。繊維成分から pH と温度を検討して多糖類を抽出し、アルコール沈殿により水溶性のマメ類多糖類を精製した^{1,2)}。

(2) AFM による構造解析

AFM (SPA300HV+SPI3800N : SII 社)) を用いてマメ類多糖類の構造を解析した。多糖類の水溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をマイカ上に塗布して室温で乾燥し、サイクリックコンタクトモードで構造を解析した。サンプルの調製条件は多糖類により異なるため、多糖類の濃度検討が極めて重要である³⁾。過去の研究成果として、AFM で解析した大豆多糖類とペクチンの分子構造を図 1 に示した。

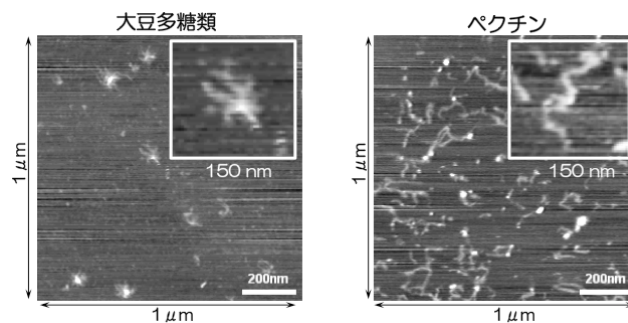


図 1. 大豆多糖類(多分岐)とペクチン(直鎖)

(3) 糖組成分析

澱粉やセルロースとは異なり、植物の細胞壁を構成する水溶性の多糖類は複数の糖で構成され、糖組成分析は多糖類の構造を解析する上で必須の分析項目である。全糖量はフェノール硫酸法で、ウロン酸量はブルメン克蘭ツ法で測定した。中性糖の組成は、マメ類多糖類の 1% 水溶液を硫酸分解後に中和し、アセトニトリルとリン酸を溶離液に用いた HPLC で分析した^{3,4)}。

(4) 物性の解析

水溶解性、粘度特性などの基本物性は、コーンプレート型回転粘度計を用いて測定した。濃度、温度、pH 等の条件を変え、物性を測定することで、マメ類多糖類の基本物性を解析した。

平成 30 年度

(1) マメ類多糖類の物性の解析

平成 29 年の計画に引き続き、調製したマメ類多糖類の水溶解性、粘度特性などの基本物性の測定を行った。

(2) 乳タンパク質の分散安定化機能の解析

大豆多糖類の研究で構築した酸性乳飲料の評価系を用いて、効率よく乳タンパク質の分散安定化機能を解析した。脱脂粉乳を乳酸菌で発酵して発酵乳を調製し、加熱溶解したマメ類多糖類の水溶液と砂糖溶液を混合した後、高圧ホモジナイザーを通して酸性乳飲料を調製した。4℃で 2 週間保存し、タンパク質粒子の粒子径と粒度分布、沈殿率、粘度と粘度特性を経時的に測定して安定性を評価した^{5,6)}。尚、多糖類の構造と機能の相関解析の実施にあたり、多分岐多糖類の代表として大豆多糖類、直鎖多糖類の代表としてペクチンを安定剤として調製した酸性乳飲料との機能比較を行った。

(3) 構造、物性、機能の相関の解析

乳タンパク質の安定性に対するマメ類多糖類の構造 (分子サイズ、直鎖、部分分岐、多分岐など) の関係を多変量解析で分析し、相関性を解析した。

参考文献

- 1) Nakamura, A., *et al.*, *Hydrocolloids Part 1*, 235-241 (2000).
- 2) Nakamura, A., *et al.*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**(10), 2249-2258 (2001).
- 3) Nakamura, A., *et al.*, *Food Hydrocolloids*, **29**, 75-84 (2012).
- 4) Kanatani, H., *et al.*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**(3), 575-577 (2012).
- 5) Nakamura, A., *et al.*, *Food Hydrocolloids*, **17**, 333-343 (2003).
- 6) Nobuhara, T., *et al.*, *Food Hydrocolloids*, **34**, 39-45 (2014).

4. 研究成果

(1) レンズマメ多糖類 (以下、LPS) の構造と物性機能の解析

レンズマメからデンプンとタンパク質を分離して繊維を調製した。この繊維から LPS を抽出し、分子構造と食品における物性機能の解析を行った。LPS の抽出は、固形分 4%、pH 3.0~pH 9.0、温度 80℃~135℃、時間 30分~120分を組み合わせて検討した。検討の結果、120℃で 90分加熱することで繊維から約 35% の収率で LPS を得た。また、pH 4 抽出 (以下、pH 4 LPS) と pH 8 抽出 (以下、pH 8 LPS) で LPS の構成糖が異なる事が明らかになった。分子排除クロマトグラフィー-多角光散乱法 (以下、SEC-MALS) を用いて LPS の重量平均分子量と分子形状の解

析を試みた。重量平均分子量は、pH 4 LPS が $M_w=8.3 \times 10^5$ 、pH 8 LPS が $M_w=1.1 \times 10^6$ であった。Mark-Houwink-Sakurada の式に基づく Conformation plot slope 値は、pH 4 LPS が 0.36、pH 8 LPS が 0.30 であり、LPS は分岐が多い分子形状を持つ可能性が示唆された。

LPS の粘度特性をコンプレート型回転粘度計で解析した。pH 4 LPS と pH 8 LPS はアラビアガムや大豆多糖類と同じく水溶液は低粘度であり、pH、温度、剪断速度の変化に対しても粘性が変化がしないニュートン流体の粘度挙動を示した。また、糖組成分析の結果、pH 4 LPS はグルコースを主な構成糖とし、アラビノース、ガラクトース、ラムノース、及びガラクトツロン酸で構成されていた。pH 8 LPS はアラビノースを主な構成糖とし、グルコース、ガラクトース、ラムノース、及びガラクトツロン酸で構成されていた。抽出 pH によって構成糖が異なる点に関し、多糖類そのものが異なるのか、複数の異なる多糖類が共存するのかについては明らかに出来ておらず、更なる研究が必要である。

さらに AFM を用いた分子構造の解析により、LPS は多分岐構造を持つ多糖類であることが明らかになった。この構造は SEC-MALS で解析した Conformation plot slope 値を支持するものであった。尚、ペクチン及び大豆多糖類と比較した pH 4 LPS と pH 8 LPS の AFM 観察像を図 2 に示した。pH 4 LPS の単分子の構造を詳細に解析した結果、核をなす構造（糖鎖と推定）から放射線状に糖鎖が伸びた特徴的な多分岐構造であることが明らかになった（図 2. E）。糖鎖の断面高を解析したところ、0.5 nm と見積もられたことから、AFM 像で確認した糖鎖は基本的に一本鎖であると推定された（図 2. F）。

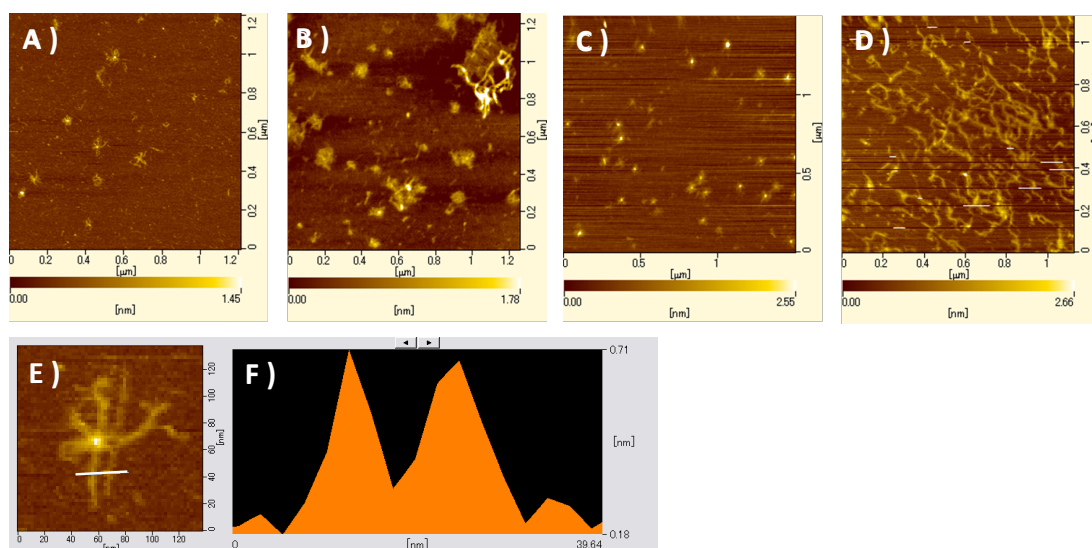


図 2. LPSのAFMによる分子構造の解析

A) pH 4 LPS, B) pH 8 LPS, C) 大豆多糖類, D) ペクチン, E) pH 4 LPS単分子の解析像, F) pH 4 LPSの単分子の糖鎖断面の解析像

多糖類水溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 0.5 μL をマイカ上に滴下して室温にて乾燥後、AFM (SPA300HV) を用いてDFMモードにて観察した。

LPS の食品への応用として、LPS を安定剤として用いた酸性乳飲料を作製し、上清率、低温保存時の沈殿率、飲料の粘度特性から機能を評価した。pH 4 LPS は大豆多糖類よりも安定化能が低い結果となった。一方、pH 8 LPS は pH 4 LPS より安定化能が高く、大豆多糖類に相当する安定化能を示した。これは、正電荷を帯びた乳タンパク質粒子の表面に多糖類が吸着するためのドライビングフォースとなるガラクトツロン酸の量に起因すると考えられた。大豆多糖類のガラクトツロン酸量は 18 % である。pH 8 LPS のガラクトツロン酸量は 14 % と大豆多糖類に近いものの、pH 4 LPS のそれは 6 % と極めて低い。そのため、pH 4 LPS はタンパク質粒子の表面に対する吸着効率が低く、また吸着しても実効負電荷が小さいために静電的反発力が小さいことから十分な安定能を発現しなかったものと推定した。

(2) インゲンマメ多糖類（以下、KPS）の構造と物性機能の解析

インゲンマメからデンプンとタンパク質を分離して繊維を調製した。この繊維から KPS を抽出し、分子構造と食品における物性機能の解析を行った。KPS の抽出は、固形分 4 %、pH 3.0 ~ pH 11.0、温度 80 $^{\circ}\text{C}$ ~ 135 $^{\circ}\text{C}$ 、時間 30 分 ~ 120 分を組み合わせで検討した。検討の結果、

pH 9、120 °C、30 分の加熱により繊維から約 30%の収率で KPS を得た。KPS の重量平均分子量は $M_w=2.5 \times 10^6$ と LPS よりも高分子であり、KPS の Conformation plot slope 値は 0.41 であることから、分岐が少なく直鎖に近い分子形状を持つ可能性が示唆された。KPS の粘度特性をコーンプレート型回転粘度計で解析した。pH 依存性は認められず、温度低下に伴って増粘するペクチンや大豆多糖類によく似た粘度特性を示した。せん断速度に対するせん断応力が一定であることからニュートン流体と結論付けた。糖組成分析の結果、KPS はアラビノース、ガラクトース、キシロース、グルコース、及びガラクトツロン酸を構成糖とする多糖類であった。さらに AFM を用いた分子構造の解析により、KPS は分岐の少ない直鎖構造を持つ多糖であることが明らかになった。この構造は SEC-MALS で解析した Conformation plot slope 値が示唆するペクチンに近い直鎖構造を支持するものであった。尚、ペクチン及び大豆多糖類と比較した AFM の観察像を図 3 に示した。

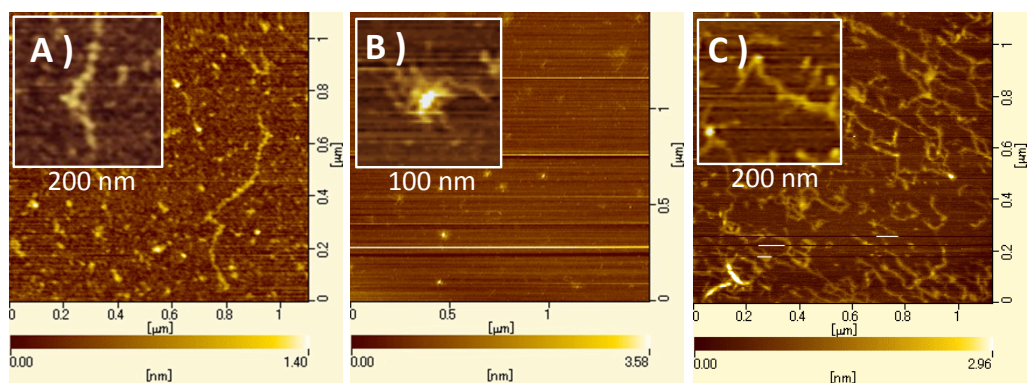


図 3. KPSのAFMによる分子構造の解析

A) KPS, B) 大豆多糖類, C) ペクチン

多糖類水溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 0.5 μL をマイカ上に滴下して室温にて乾燥後、AFM (SPA300HV) を用いてDFMモードにて観察した。

KPS の食品への応用として、KPS を安定剤として用いた酸性乳飲料を作製し、上清率、低温保存時の沈殿率、飲料の粘度特性から機能を評価した。KPS は pH 3.6~4.4 の広い pH 範囲で乳タンパク質を分散安定化し、その能力は大豆多糖類>KPS>ペクチンの順であった。飲料の粘度特性は、ペクチン添加区より低粘度で、大豆多糖類添加区より高粘度となっている。ペクチンと大豆多糖類の中間的な構造を持つと考えられる KPS の分子構造が、この機能特性に影響を与えていると推定された。酸性乳飲料をグルタルアルデヒドで固定したのち凍結切断し、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いて分散しているタンパク質粒子の構造を観察した。図 4 に示す通り、KPS は乳タンパク質粒子の表面を覆うように吸着し、部分的に架橋構造を作って粒子の合一や凝集を抑え、分散安定化する機構が推定された。

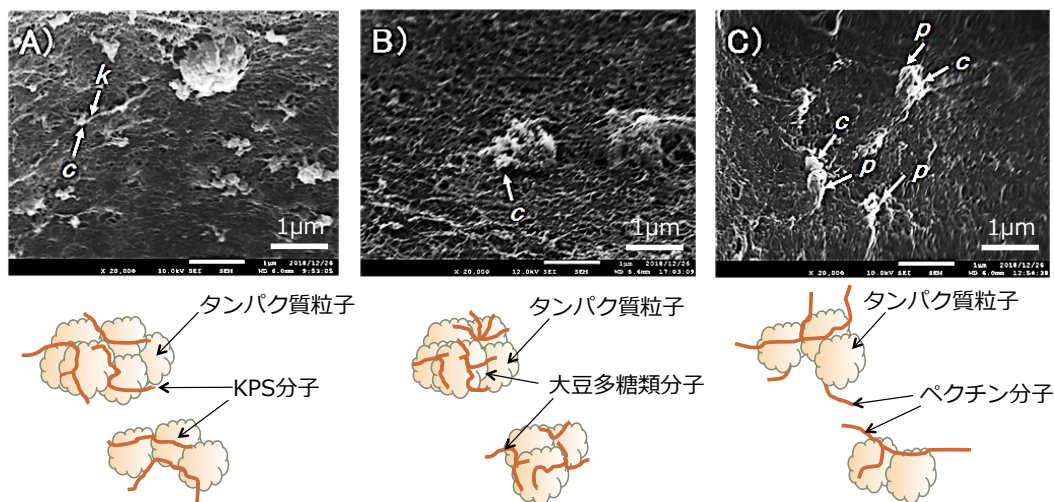


図 4. 酸性乳飲料中のタンパク質粒子の走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による観察と多糖類安定剤による分散モデル

A) KPS, B) 大豆多糖類, C) ペクチン, k: KPS分子, c: カゼイン粒子, p: ペクチン分子

(3) まとめ

本研究により、マメ類多糖類として、LPS と KPS の分子構造と酸性乳飲料における乳タンパク質の安定化能を解析した。LPS は大豆多糖類及びエンドウ多糖類に近い多分岐多糖類であり、KPS はペクチンに近い分岐の少ない直鎖多糖類であった。マメ類の細胞壁多糖類は、多分岐多糖類のみと考えられてきたが、マメの種類により種子の細胞壁を構成する水溶性多糖類の構造が異なることが初めて明らかになった。また、LPS 及び KPS はいずれも酸性下で乳タンパク質を分散安定化する機能を有していた。但し、その機構は多糖類の分子構造により異なると推定された。すなわち、多分岐多糖類である LPS は、高圧ホモジナイザーで微細化されたタンパク質粒子の表面に静電的に吸着し、低粘度で分散状態を維持した。直鎖多糖類である KPS は、微細化されたタンパク質粒子を KPS 分子が架橋する形で吸着し、増粘を伴って分散状態を維持していた。今後は、より多くのマメ類から多糖類を抽出し、分子構造と食品における物性機能の解析を進め、実用的な多糖類データベースの構築を進める計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

中村彰宏、日本応用糖質科学会東日本支部ミニシンポジウム、「マメ由来多糖の構造と食品における物性機能について」、2018 年。

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称：ペクチン性多糖類およびその製造方法

発明者：中村彰宏、戸邊順子、足立典史

権利者：不二製油株式会社

種類：特許

番号：第 6131853 号

取得年：2017 年

国内外の別：国内

名称：マメ科種子多糖類コハク酸誘導体エステル及びその製造方法

発明者：佐藤みなみ、吉田靖彦、中村彰宏

権利者：不二製油株式会社

種類：特許

番号：第 6131558 号

取得年：2017 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

本研究成果を広く公開するため、茨城大学農学部のマメ類に関する研究者と共同でホームページを作成した。URL は以下の通りである。

<http://mame.agr.ibaraki.ac.jp/index.html>