

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05919

研究課題名(和文)植物資源からの多糖類の抽出とそれを利用した食品機能剤の創出

研究課題名(英文)Extraction of polysaccharides from plant resources and their use as food functional ingredients

研究代表者

中村 彰宏(Nakamura, Akihiro)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：00803735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物資源としてマメ類に関し、栄養成分を分離した未利用資源を原料に、弱アルカリ性条件下で加圧抽出することで高分子の多糖類を効率よく抽出できることを見出した。走査型プローブ顕微鏡で解析したマメ類多糖類は、いずれも多分岐構造を持っていた。レンズマメ、インゲンマメ、およびエンドウの多糖類はドリンクヨーグルトの分散安定剤としての機能を有し、構成糖であるガラクトツロン酸のメチルエステル基の分解により、機能が向上することを発見した。3年の研究により当初計画していた(1)未利用資源の高度利用、(2)多糖類の分子構造と機能性の相関解析、(3)新たな食品用の機能性素材の創出について一定の成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、農産資源から食素材を製造する過程で副生する未利用資源を原料として多糖類機能剤を創出するプロセスが確立される。また、未利用資源を単に食資源として活用するに留まらず、少量で食品の物性と品質保持に有効な高付加価値素材を創出することで、食資源のアップサイクルに貢献する。また、多糖類機能剤の構造、物性、食品における機能性に関するデータベースを構築することで、「多糖類の構造」と「食品での用途」が直結となり、これまで長い間「職人技」であった多糖類を用いた食品の設計が、科学的根拠に基づいて実践できるようになる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on beans as the agricultural plant resources. The fiber from which the nutrients were already separated was used as the raw material. We found that high-molecular-mass polysaccharides can be efficiently extracted with hot water under weakly alkaline conditions. The legume polysaccharides analyzed by SPM showed a multi-branched structure regardless of the type of legume. Polysaccharides derived from lentils, kidney beans, and peas had functions as dispersion stabilizers for acidified milk beverages. We discovered that the decomposition of methyl ester group of galacturonic acid of composing sugars improves the property of protein particle stabilization. Through 3 years research, we have achieved a certain level of results in the initially planned (1) advanced use of unused food resources, (2) correlation analysis between the molecular structure and functionality of polysaccharides, and (3) creation of new functional ingredients useful for the processed foods.

研究分野：食品科学

キーワード：食品 植物資源 多糖類 安定剤 乳化剤 構造解析 未利用資源 品質評価

1. 研究開始当初の背景

植物由来の農産資源は、気候変動への対応や環境配慮の観点から極めて重要な食糧資源と位置付けられる。農産資源は、一次加工或いは二次加工されて食料として食されるが、澱粉、タンパク質、脂質など栄養成分に分けて付加価値のある食素材として利用されることも少なくない。食素材を加工する工程において、多量の副産物が未利用資源として生じる。食品産業界ではこうした未利用資源を削減する技術の開発と並行して、未利用資源を原材料として活用し、より付加価値が高い食素材などに転換する「アップサイクル」技術の創出に取り組んでいる。植物由来の農産資源の場合、未利用資源はセルロース、ヘミセルロース、或いはペクチンなどを含む繊維質で構成されることが多い。中でも水溶性多糖類は、少量の添加で増粘やゲル化などの特性を示すことから、食品の品質や保存性を向上する食品機能剤として広く利用される。澱粉、タンパク質、脂質など栄養成分以上に高付加価値な食素材として利用できることから、新たな水溶性多糖類の創出は、未利用資源のアップサイクルに繋がる重要且つ有望な研究課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、未利用資源の高度利用と高付加価値化を目指し、水溶性多糖類を抽出する技術を創出するとともに、水溶性多糖類を加工食品の品質向上に寄与する機能性素材として利用すること、その技術の創出を目的とした。また、これら水溶性多糖類の機能性は、糖鎖構造に由来すると考えられるが、糖鎖構造と食品における機能の相関を包括的に研究した報告は殆どない。本研究では水溶性多糖類の分子構造の解明、構造と食品における機能との相関解析に取り組み、将来は「食品の設計」に資する水溶性多糖類の構造と機能のデータベース構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 多糖類の調製

マメ類としてレンズマメ(2018年カナダ産)、インゲンマメ(2018年日本産)、エンドウ(2018年カナダ産)などを収集し、内皮を除去したのち、加水して磨砕し、遠心濾過を繰り返して澱粉とタンパク質を除去した繊維を得た。繊維に固形分4%になるように加水したのち、pH、温度、時間の因子を組み合わせで多糖類を抽出し、高分子多糖類(質量平均分子量500 kg/mol以上)を高収率(繊維に対する収率15%以上)で抽出できる最適条件を確立した^{1, 2)}。多糖類は凍結真空乾燥機で乾燥し、デシケーターにて保管して実験に用いた。また、高分子多糖類を分離精製する場合、多糖類水溶液に99.5%エタノールを最終濃度が60%(w/w)以上になるように添加して多糖類を沈殿させ、遠心分離による沈殿として回収した。また、低メチルエステル化エンドウ多糖類の調製は、エンドウ繊維から調性した高メチルエステル化エンドウ多糖類を用い、水溶液をpH12、40℃、1時間処理してエステルを分解し、pH5に調整したのち、エタノール沈殿により精製した。

(2) 多糖類の組成分析、分子量分布と質量平均分子量の算出

多糖類を希硫酸分解し、構成糖をアミノカラム(Shodex Ashipak NH2P-40 3E; 昭和電工)を用いたHPLCにて分析した³⁾。ゲル濾過クロマトグラフィー多角光散乱検出器(Size exclusion chromatography-Multi-angle laser light scattering method: SEC-MALS, Dawn Eos; Wyatt Technology)により、多糖類の分子量分布、質量平均分子量、および推定分子形状の解析を行った³⁾。

(3) 糖の結合様式の分析

多糖類を構成する糖の結合様式は箱守法にてO-メチル化されたアルジトールを加水分解後にメタノール、ピリジン、および無水酢酸中でアセチル化し、GC-FID/MS(model 5980A; Hewlett-Packard)で分析した⁴⁾。

(4) 多糖類の物性解析

粘度特性、ゲル形成性などの基本物性は、コーンプレート式回転型粘度計(DV2TCP with CPA-52Z cone; Brookfield)を用いて測定した。

(5) 走査型プローブ顕微鏡(SPM)による多糖類の構造解析

SPM(SPA300HV+SPI3800N:SII社)を用いて多糖類の分子構造を解析した。Tween20(1mM)を含む多糖類の水溶液(1μg/mL)の0.5μL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⁵⁾。

(6) 多糖類の食品における機能の評価

① 乳タンパク質の分散安定化機能の評価

乳酸菌飲料の安定剤としての機能について評価を行った。8%脱脂粉乳の懸濁液を 80°C で 20 分加熱したのち氷冷し、50%乳酸を添加して pH 3.6-4.4 に調整し、加熱溶解して 4°C まで冷却した多糖類水溶液と砂糖溶液を混合した後、10 MPa で高圧ホモジナイザー (Econizer Labo01: 三丸機械工業) を通して乳酸菌飲料を調製した。コーンプレート式回転型粘度計で粘性を測定した。遠心分離により沈殿率を測定した。レーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD-2200: 島津製作所) でメディアン径と粒度分布を測定した。動的光散乱測定装置 (DLS: Litesizer 500; AntonPaar) で粒子直径と ζ 電位を測定した⁶⁾。デジタルマイクロスコープ (VHX-950F; Keyence) およびオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800; Keyence) で分散しているタンパク質粒子の微細構造を観察した。尚、酸性乳飲料中のタンパク質と多糖類はそれぞれ Fast Green FCF と Calcoflower White Stain で蛍光標識し、オールインワン蛍光顕微鏡で観察した。

② 水中油型乳化物の乳化機能の評価

ダイズ多糖類及びアラビアガムの研究で構築した O/W 乳化物の評価系を用いて、乳化活性と乳化油滴の分散安定化の機能を解析した。中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール、レモンオイル、比重調整剤 (Sucrose Acetate Iso-butylate: SAIB) の混合物を油相に用い、多糖類水溶液を水相として添加したのち、10MPa で高圧ホモジナイザーを通して O/W 乳化物を調製した。乳化油滴の粒度分布、粒子直径、 ζ 電位、デジタルマイクロスコープ およびオールインワン蛍光顕微鏡で分散している油滴の微細構造を観察した。尚、O/W 乳化物の油滴と多糖類はそれぞれ Nile Red と Calcoflour White Stain で蛍光標識した。更に香氣成分の GC-MS 分析により乳化安定性と乳化機構の解析を行った⁷⁾。

4. 研究成果

(1) 水溶性レンズマメ多糖類 (Soluble Lentil Polysaccharide: LPS)

温度、pH、および時間を組み合わせ、レンズマメ繊維から高分子の LPS を高収率で得るための条件を導き出した。最適な抽出温度と時間は 120°C、90 分であり、最適な抽出 pH は酸性で pH 4、弱アルカリ性で pH 8 の 2 点であった。これら条件下、レンズマメ繊維当たりの LPS 収率は pH 4 抽出で 23.3%、pH 8 抽出で 19.6%であった。pH 4 および pH 8 で抽出した LPS を LPS4 及び LPS8 とした。

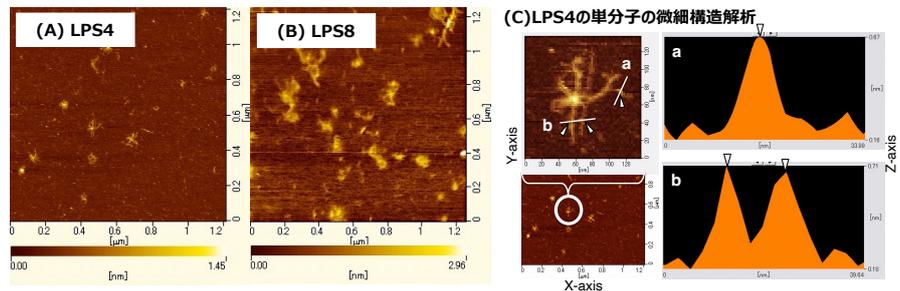


図 1. 走査型プローブ顕微鏡によるLPS (LPS4/LPS8) の分子形状観察

Scanning probe microscope (SPM) images of LPS4 and LPS8 deposited from a 1 μ g/ml solution. (A) LPS4; (B) LPS8. Image size: 1 μ m \times 1 μ m.

(C) SPM image of a single molecule of LPS4. The X-Y (left panel) and Z (right panel with arrowheads) plots accord to a flat surface and height of the samples on a mica plane, respectively. The cross section is shown by the line with arrowheads. Image size: 120 nm \times 120 nm.

SEC-MALS 法で解析した LPS 主成分の重量平均分子量 (Mw) は、LPS4 で 830 kg/mol、LPS8 で 1,130 kg/mol といずれも極めて高分子量であった。メチル化分析の結果、LPS4 と LPS8 は糖鎖の結合様式は同じだが、構成糖の組成が異なることが明らかになった。LPS4 がグルコース 52.7%、アラビノース 27.6%、ガラクトuron酸 6.0%であったのに対し、LPS8 はアラビノースの含量が高く、アラビノース 50.0%、グルコース 19.3%、ガラクトuron酸 13.0%であった。また、SPM で観察した LPS4 と LPS8 分子は、分子の中心から周辺にかけて糖鎖が伸びる特徴的な多分岐構造を示した (図 1)。この分子構造は、水溶性ダイズ多糖類 (Soluble Soybean Polysaccharide; SSPS) に類似であり、分岐が少なく直鎖構造をもつ柑橘果皮由来のペクチンとは大きく異なっていた。

また、LPS4 および LPS8 は、いずれも酸性条件下で乳タンパク質を分散安定化する機能を有していた。無脂肪乳固形分 3% (w/w) と LPS 0.4% (w/w) からなるドリンクヨーグルトの系において、LPS4 は pH 3.6-4.4 において、LPS8 は pH 3.8-4.4 において乳タンパク質を 1.0 μ m 未満の微細粒子の状態分散安定化した (図 2)。本研究により、世界規模で栽培されるレンズマメの繊維質からドリンクヨーグルトの分散安定剤として実用可能な新たな水溶性多糖類が見出された。その構造と機能性は先行する水溶性ダイズ多糖類に酷似していた。

(2) 水溶性インゲンマメ多糖類(Kidney bean polysaccharide; KPS)

インゲンマメ繊維から pH 9、120℃、30 分の加熱で繊維収率 26% の高い収率で Mw が 2,530 kg/mol の KPS を得た。SPM で観察した KPS 分子は、先行研究で構造が明らかになった LPS と同じく特徴的な多分岐の構造を示した。

2.5% (w/w) レモンオイル、2.5% (w/w) KPS の系において、高圧ホモジナイザーで 15 MPa にて均質化処理して調製した水中油型の乳化香料は、メディアン粒径 0.7 μm の単峰性の油滴の状態分散していた。食品乳化剤として世界中で利用されるアラビアガムを用い、同条件で調製した乳化香料のメディアン粒径は 0.8 μm であり、KPS はアラビアガムに勝る乳化活性を示した。KPS 及びアラビアガムで得た乳化香料を 4℃、20℃、40℃、及び 60℃ にて 30 日保存し、経時的に乳化物のメディアン粒径と粒度分布を測定した。また、乳化香料中に残存するリモネンを SPME (PDMS ファイバー) で吸脱着して GC-MS で分析定量することで、乳化香料の保存安定性とリモネンの徐放性を

解析した。30 日保存したアラビアガム乳化物は 40℃ 及び 60℃ 保存でメディアン粒径が 1.5 μm 及び 3.2 μm まで増大し、リモネン量は 85% 及び 73% まで減少していた。KPS 乳化物は同保存条件でメディアン粒径が 1.0 μm 及び 1.4 μm とアラビアガム乳化物より粒径変化が小さい一方、リモネン量は 74% 及び 55% まで減少していた。この結果より、KPS はアラビアガムに勝る乳化安定性を示す一方、香气成分の徐放性に優れることが明らかになった。更に、香气成分の徐放性は、油滴界面の構造と関連性があると予想し、KPS で構成される乳化油滴の界面構造について解析を進めた。KPS の多糖類糖鎖を酵素(ペクチナーゼ: Pectinex Ultra SP-L)で分解しながら油滴粒径を DLS で測定し、乳化物表面を覆う KPS の層厚の解析を試みた。油滴の粒子直径は酵素分解により減少し、多糖類糖鎖の損失により油滴の凝集と合一を誘発した結果、粒子直径は経時的に増大した。酵素処理前の粒子直径から酵素処理により最小化した粒子直径を KPS の糖鎖厚として算出した。その厚さは 15-25nm と見積もられ、水中に分散する KPS 分子の粒径 12-20 nm に近いことから、KPS は油滴表面に単分子層を形成して吸着していると推定された。更なる研究が必要だが、KPS 乳化物で徐放性に優れる原因は、油滴表面に多糖類及びタンパク質で被覆されていない隙間(チャンネル)が存在し、香气成分が放出され易くなっている可能性が考えられた。また、KPS には先行研究の LPS と同じく、酸性下で乳タンパク質粒子の凝集沈殿を抑制し、分散安定化する機能があることを明らかにした。無脂肪乳固形分 3% (w/w) と KPS 0.4% (w/w) からなるドリンクヨーグルトの系において、KPS は pH 3.8-4.4 の範囲で乳タンパク質粒子を 14 日の長期に渡り微細分散し、沈殿の発生を抑制していた。

本研究により、インゲンマメの繊維質から乳化食品の乳化安定剤、並びにドリンクヨーグルトの分散安定剤として実用可能な水溶性インゲンマメ多糖類が見出され、その構造と機能性は先行する水溶性ダイズ多糖類やレンズマメ多糖類に類似であることが明らかになった。

(3) 水溶性エンドウ多糖類(Soluble Pea Polysaccharide; PPS)

ペクチンは主要な構成糖であるガラクトuron酸の O-6 位がメチルエステル化されており、メチルエステル化度によりペクチン分子の実効負電荷が異なるため、酸性下での乳タンパク質表面への静電吸着力が変化する可能性がある。一方、ダイズ、レンズマメ、インゲンマメなどマメ類種子の多糖類は、ガラクトuron酸の含量が 15-25% とそれ程高くないが、メチルエステルを除去或いはメチルエステル化度を下げることで乳タンパク質との反応性が向上し、分散安定化能が向上する可能性が考えられた。そこで、エンドウ繊維由来の PPS を用い、エステル化度と乳タンパク質の分散安定化能の相関を解析するとともに、安定化のメカニズムについて解析を試みた。

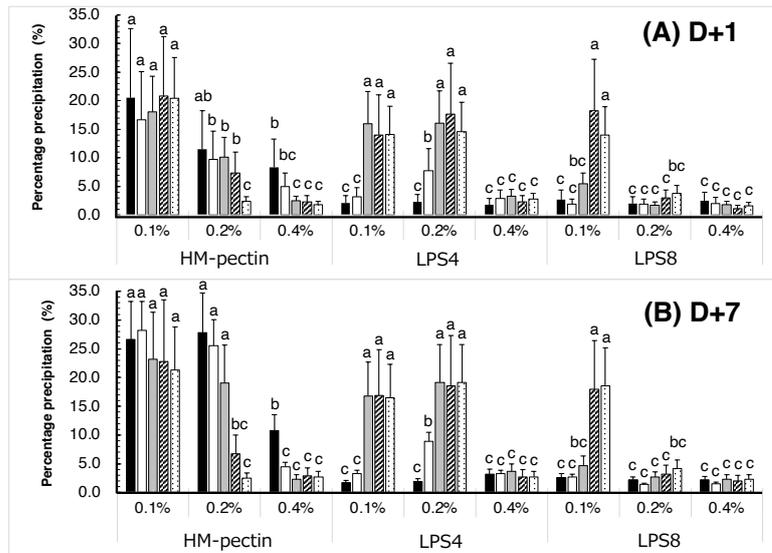


図 2. レンズ豆多糖類による酸性下での乳タンパク質の安定化(沈澱率)

Precipitation value after centrifugation of acidified milk stabilized by LPS4, LPS8, or HM-pectin. The histogram indicates precipitation value of acidified milk prepared with different LPS4, LPS8, or HM-pectin concentrations; 0.1%, 0.2%, and 0.4%, and different pHs; ■ pH 3.6, □ pH 3.8, ▒ pH 4.0, ▨ pH 4.2, and □ pH 4.4. Bars indicate standard deviation (n=3). Different superscript letters indicate significant differences (p < 0.05) between the values of precipitation percentage.

エンドウ繊維より抽出した高メチルエステル化 PPS (HM-PPS; メチルエステル化度 (DMe)=71.0%)と、HM-PPS のメチルエステルを分解して得た低メチルエステル化 PPS (LM-PPS; DMe=25.2%)を用い、エステル化度および機能特性の解析を行なった。SEC-MALS で算出した HM-PPS と LM-PPS の Mw は、いずれも約 1,000 kg/mol と見積もられた。HM-PPS と LM-PPS は、アラビノース 42.2-47.1%、グルコース 26.6-31.0%、ガラクトuron酸 17.5-18.0%で構成され、両者の構成糖に差異は認められなかった。SPM で観察した HM-PPS と LM-PPS の分子構造は、いずれも分岐を持つ直鎖構造であり、本研究で明らかになった LPS および KPS の分子構造に類似の構造であった。また、HM-PPS と LM-PPS は、いずれも pH 4.4 以下の酸性下で乳タンパク質粒子を分散安定化する機能を有す一方、乳タンパク質への吸着特性と分散安定化の機構に違いが認められた (図 3)。

LM-PPS は、pH 3.6-4.4 で乳タンパク質の凝集を最小限に抑えて微細粒子として分散させ、乳タンパク質粒子の表面に形成した LM-PPS の実効負電荷により静電反発を起こして 4℃にて 14 日の長期に渡り安定状態を維持した。一方、HM-PPS は、乳タンパク質を微細粒子として分散する点は同じだが、負電荷が弱い PPS 糖鎖の絡まりによって経時的に乳タンパク質粒子が架橋凝集し、長期の安定性が維持できないことが明らかになった。

これら研究結果より、PPS はガラクトuron酸のメチルエステルが除去されることで乳タンパク質表面の正電荷部位への吸着力が向上し、ドリンクヨーグルトの安定化機能が向上すると推察した。この研究成果はガラクトuron酸含量が低い多糖類であっても、メチルエステル化度を調整することで乳タンパク質粒子への静電吸着力が改善され、安定化機能を向上できる可能性を示唆する有用な成果と言える。

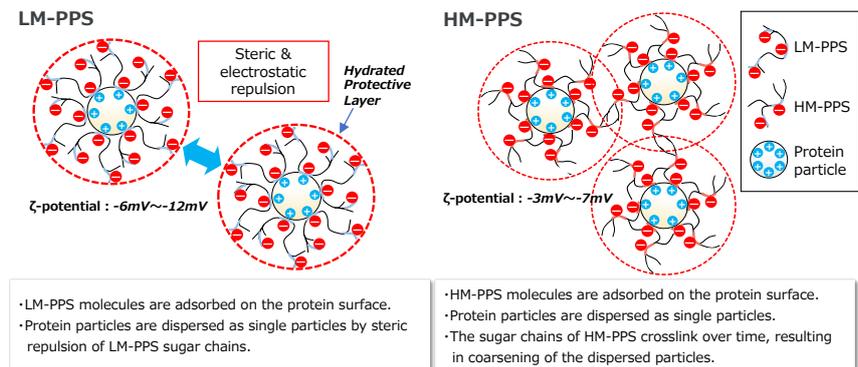


図 3. HM-PPS あるいは LM-PPS による乳タンパク質粒子の分散安定化機構 (推定モデル)

以上の通り、本研究課題の遂行により、レンズマメ、インゲンマメ、エンドウなどマメ類に関し、栄養成分を分離して残る未利用資源を原料に、主に弱アルカリ性条件下で加圧抽出することで高分子の水溶性多糖類を効率よく抽出できることを見出した。分子構造は SPM を用いることで解析が可能であり、マメ類種子の多糖類はいずれも多分岐構造を持つ多糖類であることが初めて明らかになった。更に、レンズマメ、インゲンマメ、およびエンドウの多糖類は、酸性下で凝集する乳タンパク質に静電的に吸着して安定化する分散安定剤としての基本特性を有しており、構成糖であるガラクトuron酸の O-6 位のメチルエステル基の分解により、その機能を調整できる可能性が示唆された。また、インゲンマメ由来の水溶性多糖類は、食品の天然乳化剤として利用されるアラビアガムと同等の乳化活性および乳化安定性を有していることが明らかになった。

当初計画の未利用資源の高度利用、多糖類の分子構造と機能性の相関解析、および新たな食品用の機能性素材の創出については一定の成果を得たと考える。一方、マメ類種子の繊維から得られる水溶性多糖類は、いずれも分岐構造を持ち、増粘やゲル化を誘発する直鎖構造を持つ多糖類は得られていない。本研究は、「食品の設計」に資する水溶性多糖類の構造と機能のデータベースの構築を目指しており、マメ類以外の未利用食資源についても研究する必要がある。

<引用文献>

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. Nomura, K et al., *Food Hydrocolloids*, **117**, 106740 (2021).
4. Hakomori, S., *Journal of Biochemistry*, **55**, 205-208 (1964).
5. Nakamura, A., et al., *Food Hydrocolloids*, **29**, 75-84 (2012).
6. Nobuhara, T., et al., *Food Hydrocolloids*, **34**, 39-45 (2014).
7. Chivero, P., et al., *LWT - Food Science and Technology*, **69**, 59-66 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura, A., Ohboshi, H., Sakai, M., Nomura, K., Nishiyama, S., Ashida, H.	4. 巻 144
2. 論文標題 Extraction of water-soluble polysaccharides from kidney beans and examination of their protein dispersion and stabilization properties under acidic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Research International	6. 最初と最後の頁 110357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodres.2021.110357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Kei, Sakai Madoka, Ohboshi Hitomi, Nakamura Akihiro	4. 巻 117
2. 論文標題 Extraction of a water-soluble polysaccharide fraction from lentils and its potential application in acidified protein dispersions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Hydrocolloids	6. 最初と最後の頁 106740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodhyd.2021.106740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井円香, 西山節子, 木田晴康, 中村彰宏
2. 発表標題 インゲンマメ多糖類の乳化性と乳化機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 多糖類の分子構造の解析と食品における物性功能について
3. 学会等名 食品ハイドロコロイドシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
デンマーク	Department of Food Science	Aarhus University	