

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450135

研究課題名(和文)ペクチン分解酵素群を利用した食品加工副産物からの有用オリゴ糖生産法の開発

研究課題名(英文)Production of useful oligosaccharides from food processing by-product using pectinolytic enzymes.

研究代表者

阪本 龍司(SAKAMOTO, Tatsuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：10275282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物を原料とした食品製造後には加工副産物が大量に発生するが、その有効利用は十分ではなく、高付加価値化技術の開発が求められている。本研究では副産物中の主成分であるペクチンおよびヘミセルロースを、酵素分解することで、23種のオリゴ糖(OL)を調製し、それらの生理機能を評価した。腸内環境の改善が期待できるプレバイオティクス作用についてはアラビノキシロ-OL、アラビノ-OL、キシロ-OLで良好な結果が認められた。マクロファージ様細胞を用いて、免疫賦活作用および抗炎症作用を検討した結果、前者はメトキシ化不飽和ガラクチュロン酸(GalA)-OLで、後者はフリーなGalA-OLで高活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Food processing using plants as raw materials generates large quantities of processing byproducts. These are insufficiently utilized at present, and high added-value technology must be developed to ensure their efficient use. In this study, 23 kinds of oligosaccharides (OLs) were prepared from pectins and hemicelluloses, major components amongst these byproducts, by enzymatic decomposition and their physiological functions evaluated. Good results were observed for arabinoxylo-OLs, arabino-OLs, and xylo-OLs in terms of prebiotic activity, suggesting potential to improve the intestinal environment. Investigation of immunostimulatory and anti-inflammatory activities using mouse macrophage-like cells found high activity in terms of the former for methoxylated, unsaturated galacturonic acid (GalA)-OLs, and in terms of the latter for free GalA-OLs.

研究分野：酵素利用学

キーワード：バイオマス ペクチン ヘミセルロース 糖質分解酵素 オリゴ糖 プレバイオティクス 免疫賦活作用 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁多糖は自然界で最も豊富な有機化合物であり、セルロース、ヘミセルロース、ペクチンから構成されている。その主成分であるセルロースからのエタノール変換技術の開発は最重要課題であるが、総合的なバイオマス利用を達成するためには、細胞壁中に数十パーセント含まれるペクチンやヘミセルロースを資源化する必要がある。食品加工産業から大量に発生する非可食部分は、低コストで安定供給が可能であり、豊富な糖質を含んでいることから、機能性素材として利用することが期待できる。成分的には木質系バイオマスと比べてリグニン含量が低く、ペクチンおよびヘミセルロース含量が比較的高いことが特徴である。これらは複雑な修飾基を有するヘテロ多糖であり、また植物種および各組織により構造が異なっていることから、選択的あるいは効率的に分解するためには、それらの糖鎖構造を理解した上で、処理方法を最適化する必要があるが、ペクチンおよびヘミセルロース分解酵素に関する理解はあまり進んでいない。このような理由から、これらの糖質（食品加工副産物）は動物飼料や微生物発酵原料などへの利用に留まり、高付加価値物質の生産原料にはあまり用いられていないのが現状である。一方で、それらの糖質の構造多様性は様々な用途の新規機能性物質に変換できるポテンシャルを秘めていると考えられる。

2. 研究の目的

食品加工産業から大量に発生する非可食部分は家畜飼料等に使用されているが、高度利用化は達成できていない。本研究は非可食部の主要成分である植物細胞壁多糖のうち、ペクチンとヘミセルロースに焦点を絞り、その機能性オリゴ糖の創製を指向するものである。これらの多糖は複雑な構造を有するヘテロ分岐多糖であり、その構造多様性は様々な用途の新規機能性糖質素材に変換できる可能性を秘めている。安価な食品加工副産物からの有用物質生産は、当該産業の活性化に寄与するだけでなく、資源循環型社会の構築という観点からも社会的意義は非常に高いものとする。本研究では食品加工副産物から得られる多糖を酵素的に分解することで様々なタイプのオリゴ糖を調製し、さらにそれらの生理機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) 食品加工副産物からの多糖の調製

分岐アラビナンおよび直鎖アラビナン

水酸化カルシウム溶液中に甜菜粕を懸濁し、100 で12時間処理した。残渣を除去後、抽出液にエタノールを添加し、多糖を回収した。本多糖を水に溶解し、陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで、酸性多糖と分離した中性多糖を分岐アラビナンとした。

さらに本多糖に対して、側鎖アラビノース

遊離活性を有するアラビノフラノシダーゼを作用させた。反応後の溶液にエタノールを添加し、沈殿した画分を直鎖アラビナンとして回収した。

I型アラビノガラクトン

水酸化ナトリウム溶液中に脱脂大豆粉を懸濁し、120 で1時間処理した。残渣を除去後、抽出液を濃縮・透析し、陰イオン交換クロマトグラフィーに供して酸性多糖を分離することで、I型アラビノガラクトンを回収した。

(2) 各種オリゴ糖の調製

オリゴ糖の調製には、(1)で獲得した多糖の他は市販の多糖（シトラスポリガラクトuron酸、アップルペクチン、ポテトラムノガラクトuron、ラーチウッドアラビノガラクトン、小麦アラビノキシラン、バーチウッドグルクロノキシラン、ローカストビーンガラクトマンナン、コンニャクグルコマンナン）を使用した。

多糖分解酵素として、ポリガラクトuronナーゼ、ペクチンリアーゼ、ラムノガラクトuronナーゼ、ラムノガラクトuron（RG）リアーゼ、RG ラムノハイドロラーゼ、エンドアラビナナーゼ、エンド-1,4-ガラクトナーゼ、1,6-ガラクトナーゼ、エンド-キシランナーゼ、エンド-マンナナーゼ、ドリセラナーゼを使用した。

上記の基質と酵素を反応させ、その処理液を限外濾過、活性炭カラム、ゲルろ過カラムなどに供することで、目的のオリゴ糖を単離した。また、フェルロイルオリゴ糖については、甜菜粕および小麦フスマを複合酵素製剤（ドリセラナーゼ）で処理し、その反応産物をSephadex LH カラムに供することで種々のオリゴ糖を単離した。

得られたオリゴ糖の構造は構成糖分析、高性能陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、MALDI-TOF MS、NMR などにより分析した。

(3) 各種オリゴ糖の生理機能評価

有用腸内細菌増殖活性

各種腸内細菌を用いた純粋培養系でのオリゴ糖資化性試験

15種の腸内細菌（Bifidobacterium 属5種、Lactobacillus 属2種、Bacteroides 属3種、Clostridium 属3種、Eubacterium 属2種）を対象として、以下の方法に従って各種オリゴ糖の資化性試験を行った。1%オリゴ糖を含むPYF培地（アルゴンガスにより脱酸素処理済）に各種細菌を1%植菌し、嫌気条件下において37 で3日間静置培養した。嫌気状態はアネロパック用角形ジャーにアネロパック・ケンキを入れることで維持した。24時間毎に培養液をサンプリングし、濁度およびpHを測定することで細菌の生育を評価した。

ヒト腸内細菌群を用いた混合培養系でのオリゴ糖資化による菌叢変化

成人男子 5 名より採取した便を 50%グリセリンで希釈した後、等量混合し菌体試料を調製した。本試料を用いてと同様の方法で 3 日間培養し、培養液の濁度および pH を測定した。また、培養前後の菌叢変化を評価するため、全菌体よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として標的菌種 (*Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Bacteroides* 門、*Firmicutes* 門) の 16S rDNA 特異的プライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。

免疫賦活作用

オリゴ糖の処理によりマウス由来マクロファージ様細胞 RAW264.7 が産生する一酸化窒素 (NO) 量を指標として、免疫賦活作用を評価した。RAW264.7 を 96 穴プレート中で、5% CO₂ 下 37 °C で 24 時間前培養した。培養液に各種オリゴ糖 (終濃度 1 mg/ml) を添加し、上記条件下でさらに 24 時間培養した。培養上澄中に産生された NO 量を Griess assay により測定した。なお、本実験で使用したオリゴ糖濃度では、細胞毒性がないことを MTT assay により確認した。

抗炎症作用

オリゴ糖 (終濃度 1 mg/ml) で 30 分間前処理した RAW264.7 に、LPS (0.1 µg/ml) を添加し、この条件下で 24 時間培養することにより炎症を誘発させた。Griess assay により、培養上澄中の NO 量を測定し、オリゴ糖無添加時との産生量を比較した。

4. 研究成果

(1) 食品加工副産物からの多糖の調製

甜菜粕はペクチン含量が高く、特にその主要構成糖であるアラビノースは乾燥重量で約 20%含まれている。まず構成多糖である分岐アラビナンを弱アルカリ条件下で熱処理することにより抽出し、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。本多糖はアラビノースにより高頻度に分岐しているため、酵素作用を受けにくい。そこで、アラビノフラノシダーゼ処理を施すことで、側鎖アラビノースを遊離させ、直鎖アラビナンを調製した。I 型アラビノガラクトタンは β-1,4-ガラクトタンを主鎖とするヘテロ分岐多糖であり、大豆中に多量に含まれている。そこで、加工副産物である脱脂大豆を原料としてアルカリ抽出等により本多糖を調製した。

(2) 各種オリゴ糖の調製

研究代表者が保有している反応特性の異なる数多くのペクチンおよびヘミセルロース分解酵素を用いて、種々の植物由来多糖を分解することで、構成糖・重合度・結合位・修飾基などが異なるオリゴ糖を調製した。すなわち、ホモガラクトチュロン系 (4 種)、ラムノガラクトチュロン系 (3 種)、アラビナン

系 (1 種)、ガラクトン系 (3 種)、キシラン系 (4 種)、マンナン系 (3 種)、フェルロイルオリゴ糖 (5 種)、計 23 種のオリゴ糖を調製した。

(3) 各種オリゴ糖の生理機能評価

有用腸内細菌増殖活性

各オリゴ糖についてヒト腸内細菌を用いた資化性試験を行ったところ、ガラクトオリゴ糖やアラビノキシロオリゴ糖 (AXO)、アラビノオリゴ糖 (AO)、キシロオリゴ糖 (XO) に善玉菌選択増殖活性が認められた。次にこれらのオリゴ糖に焦点を絞り、成人の便を用いた混合培養系でのオリゴ糖添加による優占菌種変化をリアルタイム PCR により分析した。その結果、AXO、AO、XO においては、*Bifidobacterium* 属と *Bacteroides* 属の優占率の増加が認められ、プレバイオティクス作用を有することが明らかとなった。また、XO については 2 糖よりも 3 糖と 4 糖の混合物で、その効果はより顕著であった。

免疫賦活作用および抗炎症作用

マウスマクロファージ様細胞を用いて、培養上澄中に産生される NO 量を指標に免疫賦活作用および抗炎症作用を評価した。

RAW264.7 を各種オリゴ糖 (終濃度 1 mg/ml) で処理したところ、メチルエステル化された不飽和ガラクトチュロン酸 (GalA) オリゴ糖に最も高い免疫賦活活性が認められた。

一方、抗炎症作用についてはフリーな GalA オリゴ糖に最も強い NO 産生抑制効果が確認された。

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 7 件)

Iwai M, Yamada H, Ikemoto T, Matsumoto S, Fujiwara D, Takanaka S, Sakamoto T., Biochemical Characterization and Overexpression of an Endo-rhamnogalacturonan Lyase from *Penicillium chrysogenum*. *Mol Biotechnol.* (2015) 57:539-548. 査読有
doi: 10.1007/s12033-015-9847-4.

Iwai M, Kawakami T, Ikemoto T, Fujiwara D, Takenaka S, Nakazawa M, Ueda M, Sakamoto T., Molecular characterization of a *Penicillium chrysogenum* exo-rhamnogalacturonan lyase that is structurally distinct from other polysaccharide lyase family proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2015) 99:8515-8525. 査読有
doi: 10.1007/s00253-015-6600-7.

Shinozaki A, Hosokawa S, Nakazawa M,

Ueda M, Sakamoto T., Identification and characterization of three *Penicillium chrysogenum* -l-arabinofuranosidases (PcABF43B, PcABF51C, and AFQ1) with different specificities toward arabino-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol.* (2015) 73-74:65-71. 査読有
doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.04.003.

Eda M, Ishimaru M, Tada T, Sakamoto T., Kotake T, Tsumuraya Y, Mort AJ, Gross KC., Enzymatic activity and substrate specificity of the recombinant tomato -galactosidase 1. *J Plant Physiol.* (2014) 171:1454-1460. 査読有
doi: 10.1016/j.jplph.2014.06.010.

Shinozaki A, Kawakami T, Hosokawa S, Sakamoto T., A novel GH43 -l-arabinofuranosidase of *Penicillium chrysogenum* that preferentially degrades single-substituted arabinosyl side chains in arabinan. *Enzyme Microb Technol.* (2014) 58-59:80-86. 査読有
doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.03.005.

Sukhumsirichart W, Deesukon W, Kawakami T, Matsumoto S, Seesom W, Sakamoto T., Expression and characterization of recombinant GH11 xylanase from thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10. *Appl Biochem Biotechnol.* (2014) 172:436-446. 査読有
doi: 10.1007/s12010-013-0508-4.

Sakamoto T., Ishimaru M., Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) 97:5201-5213. 査読有
doi: 10.1007/s00253-013-4946-2.

〔学会発表〕(計 15 件)

國重由花、*Penicillium chrysogenum* 由来新規エキソ - ラムノガラクチュロナンリアーゼの反応特性解析および X 線結晶構造解析、日本農芸化学会大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

久保笙子、*Penicillium chrysogenum* 由来ペクチンメチルエステラーゼの異種発現と反応特性解析、日本農芸化学会大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

山本智大、ペクチンおよびヘミセルロース由来オリゴ糖のプレバイオティクス機能評価、日本応用糖質科学会大会、2015 年 9 月

16 日、奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市)

丸田秋穂、アラビアガムに高活性を有する -D-ガラクトピラノシダーゼの特性解析、日本応用糖質科学会大会、2015 年 9 月 16 日、奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市)

松本翔太郎、カビの生産するラムノガラクチュロナンラムノハイドロラーゼ (RGRH) のクローニングおよび機能解析、日本応用糖質科学会大会、2015 年 9 月 16 日、奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市)

Woranuch K, Purification of ferulic acid esterase from *Bacillus megaterium*., The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), 2015 年 6 月 7 日 (Maastricht, Netherlands)

Seesom W, Endo- -1,4-mannanases from thermotolerant *Bacillus* sp., The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), 2015 年 6 月 7 日 (Maastricht, Netherlands)

阪本龍司、ペクチンおよびペクチン分解酵素の基礎と応用について、農産物有用化合物活用研究会、2014 年 11 月 5 日、和歌山県民文化会館 (和歌山県和歌山市)

岩井麻凜、*Penicillium chrysogenum* によるラムノガラクチュロナン分解機構の解析、日本応用糖質科学会大会、2014 年 9 月 24 日、新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

篠崎文香、*Penicillium chrysogenum* 由来アラビナン分解酵素による甜菜ファイバーからのアラビノース生産、日本応用糖質科学会大会、2014 年 9 月 24 日、新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

阪本龍司、食品系未利用バイオマスの有効利用、関西グライコサイエンスフォーラム、2014 年 5 月 24 日、大阪市立大学 (大阪府大阪市)

阪本龍司、食品系未利用バイオマスの有効利用、応用細胞生物学会、2013 年 12 月 6 日、大阪府立大学 (大阪府堺市)

阪本龍司、非セルロース系バイオマスの有効利用、日本バイオプラスチック協会、2013 年 11 月 8 日、大阪府立大学 (大阪府堺市)

岩井麻凜、*Penicillium chrysogenum* の生産するエンド-およびエキソ-ラムノガラクチュロナンリアーゼ、日本応用糖質科学会

大会、2013年9月25日、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

篠崎文香、Penicillium chrysogenum によるL-アラビナン分解機構の解明、日本応用糖質学会大会、2013年9月25日、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪本 龍司 (SAKAMOTO, Tatsuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10275282

(2) 研究協力者

岩井 麻凜 (IWAI, Marin)

篠崎 文香 (SHINOZAKI, Ayaka)

松本 翔太郎 (MATSUMOTO, Shotaro)

久保 笙子 (KUBO, Shoko)

丸田 秋穂 (MARUTA, Akiho)

山本 智大 (YAMAMOTO, Tomohiro)

國重 由花 (KUNISHIGE, Yuika)

SUKHUMSIRICHART, Wasana

WORANUCH, Kanoknat

SEESOM, Weeranuch