

A377.7

H721

'93

食物纖維構成多糖の微細構造

課題番号 03680054

平成5年度科学研究費補助金 一般研究C研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 加藤陽治
弘前大学教育学部助教授

平成5年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

1. 課題番号 03680054
2. 研究課題 食物繊維構成多糖の微細構造
3. 研究組織
研究代表者 加藤陽治（弘前大学・教育学部・助教授）
4. 研究経費
- | | |
|-------|---------|
| 平成3年度 | 1、700千円 |
| 平成4年度 | 200千円 |
| 平成5年度 | 200千円 |
| 合計 | 2、100千円 |

5. 研究発表

(1) 学会誌等

加藤陽治、藤田美香、浅利宇多子（1993）貯蔵および加熱処理に伴うゴボウのイヌリンの変化。弘前大学教育学部紀要69:131-135

加藤陽治（1993）水不溶性食物繊維のグルコースのin vitroにおける拡散速度に与える影響。日本栄養・食糧学会誌46:351-355

Yoji Kato and Toshiyuki Watanabe (1993) Isolation and characterization of a xyloglucan from gobo (Arctium lappa L.). Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 57:1591-1592

加藤陽治、松倉純子（1994）主要葉菜類の炭水化物組成。弘前大学教育学部紀要71:61-71

(2) 口頭発表

Yoji Kato and Donald J. Nevins: Structural studies of Zea shoot cell-wall polysaccharides. XXXII Yamada Conference on Plant Cell Walls as Biopolymers with Physiological Functions. 1992年5月（大阪）

加藤陽治：葉菜類の多糖類組成の比較。日本家政学会第44回大会 1992年5月（仙台）

加藤陽治：水不溶性食物繊維の標準デキストラン及びマルトデキストリンに対する浸透性。日本家政学会第45回大会 1993年5月（東京）

はしがき

日常の食生活における食物繊維摂取量の減少が種々の疾患（消化器疾患、糖尿病など）を引き起こすことが明らかになるにつれて、生体機能調節因子としての食物繊維の重要性が認められている。食物繊維の大部分は植物性食品のいわゆる植物細胞壁に由来するといっても過言ではない。

食物繊維の生体に対する作用は、食物繊維の起源や物性によって差異がある。このことは、食物繊維の生理機能解明の基礎研究として、細胞壁構成多糖類の化学構造や物理化学的性質を明らかにすることは不可欠であることを示している。

本研究は、このような背景を踏まえ、平成3年度から平成5年度の3年間にわたって行われたものであり、本報告書に含まれている内容は、以下の通りである。

- 1 植物性食品由来の食物繊維構成多糖類について 3 頁
- 2 ゴボウキシログルカンの微細構造 14 頁
- 3 葉菜類キシログルカンの構造比較 19 頁
- 4 水溶性食物繊維（イヌリン）の貯蔵および加熱処理による変化 22 頁
- 5 水不溶性食物繊維のグルコースのin vitroにおける拡散速度に与える影響 27 頁
- 6 ホホバキシランの構造解析 32 頁

第1章 植物性食品由来の食物繊維構成多糖類について

1. 研究目的

食物繊維は、「ヒトの消化酵素で消化されない食品成分」と定義され、近年、第六の栄養素としてその摂取の重要性が叫ばれている。食物繊維は、他の栄養素と異なり、それが消化管内を通過する間に栄養効果を発揮する。栄養効果として、耐糖性改善効果、血しょうコレステロールの正常化効果、コレステロール胆石の形成抑制効果、大腸癌発生率の抑制効果、有害物質の毒性制御効果などが知られている。このような栄養効果は、食物繊維の由来や食物繊維構成多糖類の違い、また水に対する溶解性などにより異なっている¹⁻⁴⁾。

食物繊維の生理機能を明らかにするための基礎研究として、葉菜類のなかから日常の食生活で摂取する機会の多い、キャベツ、ハクサイ、チンゲンサイ、ホウレンソウ、およびレタスを選び、炭水化物組成を調べることを目的とした。

2. 材料と方法

【材料】

キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスを弘前市内のスーパーマーケットより購入し、可食部100g（生重量）を凍結乾燥した。乾燥重量は、順に6.710g、4.587g、10.220g、6.513g および3.698gであった。乾燥させた野菜は、乳鉢磨砕により粉末とし、以後の実験に供した。

デンプン加水分解酵素のグルコアミラーゼ (*Rhizopus niveus*, 35単位/mg) およびイソアミラーゼ (*Pseudomonas*, 59,000単位/ml) は、生化学工業から購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

【炭水化物の分画】

80%メタノール抽出-----粉末試料約1.0g（乾燥重量）を50ml容栓付き遠心管に入れた。これに80%メタノール50mlを加え、100°Cに1.5時間保った後、遠心操作（3,000rpm、30分）により不溶性画分と可溶性画分に分けた。不溶性画分は同じ抽出・遠心操作をさらに2回行った。最後に得られた80%エタノール不溶性画分はアセトン洗浄後、風乾し、さらに真空デシケーター内で乾燥させた。アセトン洗液は可溶性画分に加え、減圧下濃縮乾固し、80%メタノール可溶性画分とした。本画分中の糖量は、フェノール・硫酸法⁵⁾にてグルコース量として求めた。

80%メタノール不溶性画分のグルコアミラーゼおよびイソアミラーゼ処理-----80%エタノール不溶性画分を50ml容栓付き遠心管に入れ、50mMの酢酸：酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）50mlに懸濁し、沸騰湯浴中で10分間加熱処理した。室温まで冷却後、イソアミラーゼ（118単位）とグルコアミラーゼ（7単位）を加え、表面を数滴のトルエンで覆い40°Cで24時間反応させた。反応後、遠心操作（3,000rpm、30分）により上清画分と沈澱画分に分けた。沈澱画分は再度同条件下で酵素処理を行った。最後に得られた沈澱画分は水で十分洗浄し、「水不溶性画分」とした。

遠心上清画分（沈澱画分の水洗浄液を含む）は凍結乾燥した。乾燥物を10mlの水に溶解し遠心操作（3,000rpm、30分）で不溶物を除去し、あらかじめ蒸留水で平衡化しておいたBio-Gel P-2のガラスカラム（4.5 × 22 cm）にのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は7.5mlずつフラクションコレクター（ADVANTEC SF-100）で集め、そのなかから適量とりフェノール・硫酸法にて糖量を測定した。カラムのボイドボリューム（試験管番号14~21）に溶出した糖を「水可溶

性多糖画分（WS）」とした。単糖溶出位置（試験管番号33～38）に溶出した糖量をもって「デンプン」量とした。

【水不溶性画分の分画】⁶⁾

各々の水不溶性画分を50ml容栓付き遠心管に入れ、50mlの0.25% シュウ酸アンモニウム水溶液に懸濁し、100°Cで1～2時間加熱処理し、室温まで冷却後、遠心操作（3,000rpm、30分）で上清画分と沈澱画分に分けた。沈澱画分はさらに2回同操作を繰り返した。シュウ酸アンモニウム抽出液は蒸留水に対して透析後、凍結乾燥して「ペクチン様物質画分（PS）」とした。

シュウ酸アンモニウム抽出残渣は、引続き50mlの4%水酸化カリウム水溶液に懸濁し、窒素ガス下、室温で24時間攪はんし、遠心操作で上清と沈澱画分に分けた。沈澱画分は同操作を繰り返した。4%水酸化カリウム抽出残渣を24%水酸化カリウム水溶液で同様に2回抽出操作を行った。4%および24%水酸化カリウム抽出液はそれぞれ酢酸で中和し蒸留水に対して透析し、凍結乾燥し「ヘミセルロース-I（HC-I）」および「ヘミセルロース-II（HC-II）」とした。

24%水酸化カリウム抽出残渣は、酢酸、メタノールおよびエーテルで順次洗浄後、乾燥し「セルロース画分（CL）」とした。

【WS、PS、HC-I、HC-II及びCL画分の構成糖量】

中性糖量：試料(1mg)を1mlの2Mトリフルオロ酢酸（TFA）で5時間、100°Cで加水分解し、分解物を減圧乾固し、200μgの2-デオキシグルコース（ガスクロマトグラフィー分析の内部標準物質）を加えた。CL画分の場合は、試料(5mg)を72%硫酸に懸濁・溶解（約1時間）後、硫酸濃度が1.5Mになるように蒸留水で希釈し100°Cで3時間加水分解した。反応物を炭酸バリウムで中和後、2-デオキシグルコースを加え、よく攪はんし濾過した。濾液をAmberlite IR-120（H+型）で処理し減圧乾固した。それぞれ、得られた加水分解物中の構成中性単糖はアルジトールトリフルオロアセテートとした後、ガスクロマトグラフィーにて定量した。ガスクロマトグラフは日立製のG-500を用い、カラムは1.5%QF-1/Chromosorb W(AW-DMCS)（0.4 × 200 cm、ガラスカラム）を用い140°Cの定温で分析した⁷⁾。

酸性糖量：試料溶液から適量とりカルバゾール・硫酸法⁸⁾にてガラクトロン酸相当量として求めた。但し、本法では、中性糖も発色するので、予めその影響量を調べておき上記中性糖量からその影響量を算出、カルバゾール・硫酸法で求めた値から差し引き【真の酸性糖量 = カルバゾール・硫酸法にて求めた酸性糖量 - （ガスクロマトグラフィー法で求めた中性糖量 × 0.23）】、酸性糖量とした。

【ペーパークロマトグラフィー】

東洋濾紙No.50を用いた。中性糖は65% n-プロパノールで展開（上昇法、2回）、酸性糖は酢酸エチル：水：酢酸：ギ酸（18:4:3:1）で展開（下降法）し、風乾後、アルカリ性硝酸銀試薬で糖を発色⁹⁾した。

【糖結合様式の分析】

水可溶性多糖（WS、約1mg）あるいは水不溶性多糖（約10mg）を箱守法¹⁰⁾にてメチル化した。メチル化多糖は酸で加水分解後、水素化ホウ素ナトリウムで還元してアルジトールし、ピリジンと無水酢酸でアセチル化し、ガスクロマトグラフィーによる分析¹¹⁾を行った。ガスクロマトグラフは日立製のG-500を用い、カラムはJ&W社のヒューズドシリカキャピラリーカラムDB-225（0.32mm × 15m）を用い、140°Cから200°Cまで1分あたり2°Cの昇温で分析した。

【フェルラ酸の定量】

80%メタノール不溶性画分（10mg）を1N水酸化ナトリウムに懸濁し、一晚室温放置後、遠心上清を塩酸にて酸性にしてエーテル抽出を行った。エーテル層を減圧乾固し、1N水酸化ナトリウムに溶解して吸収スペクトルを測定した。また、340nmでの吸収を測定し、フェルラ酸量を

求めた¹²⁾。

3. 結 果

各葉菜類に含まれる炭水化物の一連の分画操作を図1に示す。試料は凍結乾燥後、乳鉢磨砕により粉末化し、まず80%メタノールでの加熱処理を行った。この処理で可溶化したものを減圧乾固後、水に可溶性のものを「単糖・オリゴ糖画分」とした。メタノール不溶性物質は乾燥後、グルコアミラーゼとイソアミラーゼの組み合わせによる除デンプン操作に供した。この操作過程で細胞壁より可溶化した多糖とデンプン分解物（グルコース）の分離はBio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーで行った。カラムのボイドボリューム画分に溶出した糖を「水可溶性多糖画分（WS）」とした。また、得られたグルコースの量をもってデンプン量とした。除デンプン操作過程での水不溶性物質を「水不溶性多糖画分」とした。

乾燥粉末1.000gからの単糖・オリゴ糖およびデンプンの収量は、それぞれキャベツで292.5mgと1.8mg、ハクサイで296.4mgと2.3mg、ホウレンソウで120.6mgと4.6mg、チンゲンサイで48.3mgと1.3mg、レタスで255.9mgと3.7mgであった。これら単糖・オリゴ糖画分をBio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供し、分子量分布を調べたところ、いずれも単糖あるいは、単糖と二糖が主要オリゴ糖であった。しかし、高級オリゴ糖の存在も確認された。

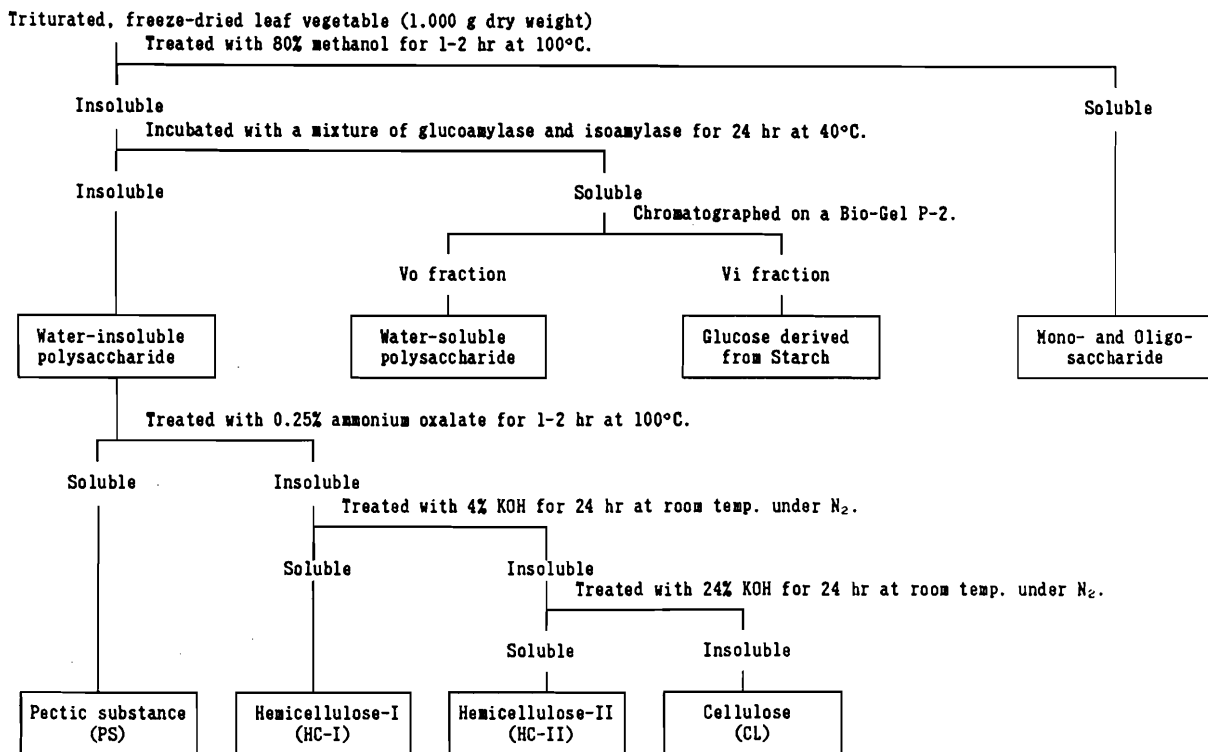


図1 各種葉菜類を構成している炭水化物の分画操作の概略

水可溶性多糖画分 (WS) の収量と構成糖組成の分析結果をまとめたのが表1である。いずれのWSもウロン酸 (U.A.)、ラムノース (Rha)、フコース (Fuc)、アラビノース (Ara)、キシロース (Xyl)、マンノース (Man)、グルコース (Glc)、およびガラクトース (Gal) から構成されている。ペーパークロマトグラフィ分析により、構成ウロン酸はおもにガラクトウロン酸であることが示された。また、WS中の多糖構成中性糖の結合様式の分析結果を表2に示す。

表1 各種葉菜類水可溶性多糖画分の収量と構成糖組成

Water-soluble polysaccharide fraction from	Yield (Total sugar) (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
Cabbage	40.9	87.3	2.1	0.7	2.8	1.1	0.6	0.9	4.4
Chinease cabbage	34.8	90.6	2.1	0.5	2.1	0.6	0.5	0.5	3.1
Spinach	30.5	72.1	4.4	0.4	11.8	1.1	0.8	1.5	7.8
Chingentsuai	26.6	72.4	4.5	1.4	6.5	1.9	1.7	2.6	9.1
Lettuce	41.1	87.8	2.4	0.5	2.3	0.3	0.7	1.0	4.9

a) From 1.000 g triturated, freeze-dried leaf vegetable.

表1と表2の結果および既知の細胞壁多糖の化学構造を参考¹³⁾にすると、WSに含まれている多糖の大部分は、D-ガラクトウロン酸残基が α -(1 \rightarrow 4)結合した直鎖構造のところどころに α -L-ラムノース残基が (1 \rightarrow 2)結合で挿入された多糖ラムノガラクトウロンナンであると考えてよい。そのラムノース残基に結合していると思われる中性多糖側鎖は、アラバン、ガラクトンあるいはアラビノガラクトン等複雑な構造をもつと考えられる。

しかし、非還元末端アラビノース (T-Ara)、3-結合ガラクトース (3-Gal)、6-結合ガラクトース (6-Gal) および3,6-結合ガラクトース (3,6-Gal) の顕著な量の存在は、中性糖側鎖 (アラバン、ガラクトンあるいはアラビノガラクトン) を有する酸性多糖の他に、中性多糖アラビノ-3,6-ガラクトンの存在の可能性も無視できない。

糖結合様式解析結果 (表2) から判断すると、これらラムノガラクトウロナンの側鎖構造並びにアラビノ-3,6-ガラクトンの微細構造には品種間差異があると思われる。

次に、それぞれの水不溶性画分を構成している多糖類の糖結合様式を解析するため、WSの場合と同様にメチル化分析を行った。図2と表3は、それぞれ部分メチル化アルジトールアセテートのガスクロマトグラムと同定された部分メチル化アルジトールアセテートの組成を示す。表3のデータだけからでは多糖の種類を決定することは不可能であるが、これまでの植物細胞壁多糖の構造に関する数多くの知見を参考にするとある程度多糖の種類を特定することができる。

すなわち、いずれの品種でも、① 側鎖構造を有するラムノガラクトウロンナン [2-結合と2,4-結合ラムノース (2-Rhaと2,4-Rha) が検出されたことから]、② フコースを有するキシロルカン [非還元末端キシロース (T-Xyl)、非還元末端フコース (T-Fuc)、4-結合と4,6-結合グルコース (4-Glcと4,6-Glc) の存在]、③ セルロース [顕著な量の4-結合グルコース (4-Glc) の存在]、④ アラバン [非還元末端、5-結合および3,5-結合アラビノース (T-Ara、5-Ara及び3,5-Ara) の検出]、⑤ (1 \rightarrow 4)-ガラクトン [4-結合ガラクトース (4-Gal) の存在]、および⑥ 分岐アラビノガラクトン [種々の結合様式をもつガラクトースとアラビノース残基の存在] 等を有すると考えられる。しかし、それら多糖の量比には若干の差があると思われる。

表2 各種葉菜類水可溶性多糖画分の糖結合様式

Peak No.	Methylated sugar	Deduced glycosidic linkage*	Amount**				
			Cabbage	Chinese cabbage	Spinach	Chingentsuai	Lettuce
1	2,3,5-Me ₃ -Ara***	T-Ara	8.5	8.3	5.2	6.0	4.6
2	2,3,4-Me ₃ -Xyl	T-Xyl	0.4	0.6	0.1	0.2	1.4
3	2,3,4-Me ₃ -Fuc	T-Fuc	0.4	0.7	0.1	0.7	0.1
4	3,5-Me ₂ -Ara	2-Ara	4.4	1.8	0.6	2.3	3.3
5	Unidentified		0.6	1.0	0.2	0.7	0.1
6	3,4-Me ₂ -Rha	2-Rha	3.6	6.0	2.0	3.2	1.4
7	2,5-Me ₂ -Ara	3-Ara	0.3	0.4	0.4	0.2	0.2
8	2,3,4,6-Me ₄ -Glc and/or 2,3,4,6-Me ₄ -Man	T-Glc and/or T-Man	0.3	0.3	0.1	0.5	0.2
9	2,4-Me ₂ -Xyl	3-Xyl	0.4	0.6	0.2	0.6	1.0
10	2,3-Me ₂ -Ara	5-Ara	7.0	5.5	13.2	4.6	1.8
11	2,3,4,6-Me ₄ -Gal, 2,3-Me ₂ -Xyl and/or 3,4-Me ₂ -Xyl	T-Gal, 4-Xyl and/or 2-Xyl	4.2	4.5	3.1	3.4	1.8
12	Unidentified		0.6	1.2	0.4	0.6	0.6
13	2-Me ₁ -Rha	3,4-Rha	0.7	1.1	0.3	1.0	0.4
14	Unidentified		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	3-Me ₁ -Rha	2,4-Rha	3.3	3.1	2.8	2.8	1.2
16	2-Me ₁ -Ara	3,5-Ara	9.5	5.5	11.0	13.9	8.4
17	3-Me ₁ -Ara, 2,4,6-Me ₃ -Gal and/or 2,3,6-Me ₃ -Man	2,5-Ara, 3-Gal and/or 4-Man	3.8	3.2	2.1	4.0	3.0
18	2,3,6-Me ₃ -Gal, 3,4,6-Me ₃ -Gal and/or 2,3,4-Me ₃ -Glc	4-Gal, 2-Gal and/or 6-Glc	4.6	2.4	4.2	2.5	1.8
19	2,3,6-Me ₃ -Glc	4-Glc	3.4	1.9	1.8	1.9	2.3
20	2,3,4-Me ₃ -Gal	6-Gal	12.1	5.3	29.1	14.0	8.6
21	2,6-Me ₂ -Gal	3,4-Gal	0.3	6.9	2.0	4.2	4.8
22	Unidentified		5.6	0.8	1.0	1.3	0.8
23	Unidentified		1.2	2.1	0.9	2.0	1.4
24	3,6-Me ₂ -Gal	2,4-Gal	5.8	1.7	2.8	1.7	9.3
25	Unidentified		2.1	2.2	1.4	2.2	4.0
26	2,3-Me ₂ -Glc	4,6-Glc	3.6	6.1	2.5	4.6	5.3
27	2,4-Me ₂ -Gal	3,6-Gal	0.8	12.5	4.5	8.1	11.8
28	Unidentified		1.0	1.9	0.0	1.4	0.0
29	Unidentified		11.4	12.2	7.8	11.3	20.3

* The numerical prefixes represent the carbon atoms involved in glycosidic linkages in the original polysaccharides. Prefix T indicates sugars linked through C(0)-1 only. ** % total area.

*** 2,3,5-Me₃-Ara = 2,3,5-tri-O-methyl-1,4-di-O-acetyl-arabinitol, etc.

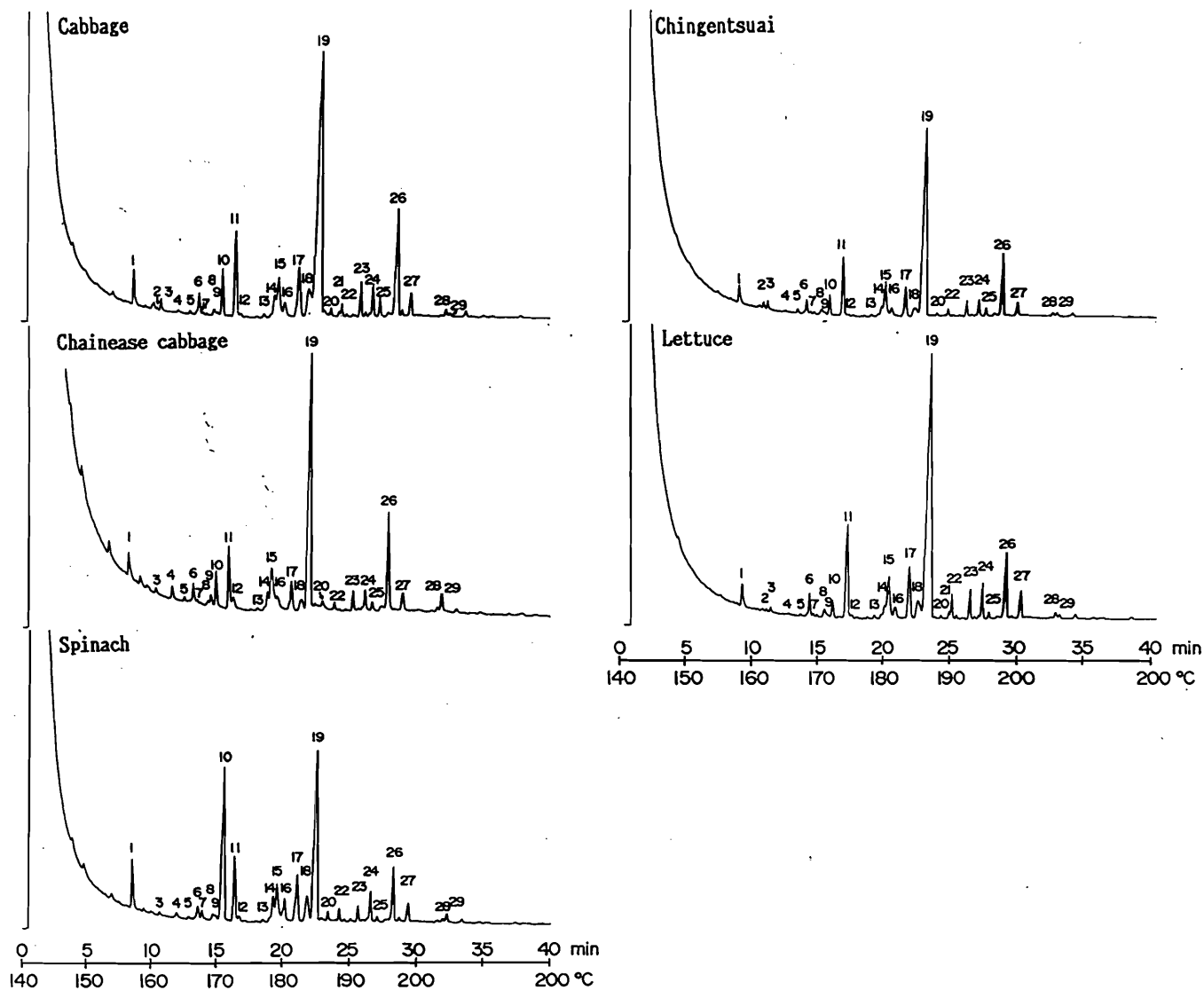


図2 各種葉菜類水不溶性画分構成多糖類に由来する部分メチル化アルジトールアセテートのガスクロマトグラム

表3 各種葉菜類水不溶性画分構成多糖類の糖結合様式

Peak No. in Fig.	Methylated sugar	Deduced glycosidic linkage*	Amount**				
			Cabbage	Chinease cabbage	Spinach	Chingentsuai	Lettuce
1	2,3,5-Me ₃ -Ara***	T-Ara	2.4	2.1	4.1	2.1	1.6
2	2,3,4-Me ₃ -Xyl	T-Xyl	0.1	0.0	0.0	0.6	0.1
3	2,3,4-Me ₃ -Fuc	T-Fuc	0.7	0.4	0.3	0.9	0.2
4	3,5-Me ₂ -Ara	2-Ara	0.2	0.9	0.5	0.1	0.1
5	Unidentified		0.2	0.4	0.2	0.4	0.1
6	3,4-Me ₂ -Rha	2-Rha	1.6	1.6	1.4	1.1	1.7
7	2,5-Me ₂ -Ara	3-Ara	0.1	0.4	0.9	0.1	0.2
8	2,3,4,6-Me ₄ -Glc and/or 2,3,4,6-Me ₄ -Man	T-Glc and/or T-Man	0.5	0.4	0.7	0.8	1.0
9	2,4-Me ₂ -Xyl	3-Xyl	0.2	1.0	0.5	0.3	0.0
10	2,3-Me ₂ -Ara	5-Ara	3.1	2.8	19.4	2.1	1.2
11	2,3,4,6-Me ₄ -Gal, 2,3-Me ₂ -Xyl and/or 3,4-Me ₂ -Xyl	T-Gal, 4-Xyl and/or 2-Xyl	7.5	6.1	6.7	7.7	9.5
12	Unidentified		0.1	0.6	0.3	0.1	0.3
13	2-Me ₁ -Rha	3,4-Rha	0.2	0.3	0.2	0.2	0.9
14	Unidentified		2.3	1.8	3.2	1.3	1.3
15	3-Me ₁ -Rha	2,4-Rha	4.2	9.0	4.9	5.7	5.7
16	2-Me ₁ -Ara	3,5-Ara	1.8	0.4	3.2	1.8	2.8
17	3-Me ₁ -Ara, 2,4,6-Me ₃ -Gal and/or 2,3,6-Me ₃ -Man	2,5-Ara, 3-Gal and/or 4-Man	5.4	3.7	5.8	4.4	5.9
18	2,3,6-Me ₃ -Gal, 3,4,6-Me ₃ -Gal and/or 2,3,4-Me ₃ -Glc	4-Gal, 2-Gal and/or 6-Glc	4.5	2.2	4.0	2.4	3.6
19	2,3,6-Me ₃ -Glc	4-Glc	43.6	36.2	26.1	45.5	46.0
20	2,3,4-Me ₃ -Gal	6-Gal	0.4	0.7	1.3	0.2	0.7
21	2,6-Me ₂ -Gal	3,4-Gal	0.2	0.0	0.0	0.1	0.6
22	Unidentified		0.7	0.6	1.3	0.7	1.8
23	Unidentified		2.1	2.6	1.3	1.8	2.1
24	3,6-Me ₂ -Gal	2,4-Gal	2.2	4.0	3.0	2.3	2.6
25	Unidentified		1.3	2.5	0.6	1.5	0.7
26	2,3-Me ₂ -Glc	4,6-Glc	10.3	12.7	5.4	9.3	6.0
27	2,4-Me ₂ -Gal	3,6-Gal	2.9	2.6	3.2	5.2	2.6
28	Unidentified		0.6	1.6	0.4	0.5	0.5
29	Unidentified		0.5	2.6	1.0	0.9	0.3

* The numerical prefixes represent the carbon atoms involved in glycosidic linkages in the original polysaccharides. Prefix T indicates sugars linked through C(0)-1 only. ** % total area.

*** 2,3,5-Me₃-Ara = 2,3,5-tri-0-methyl-1,4-di-0-acetyl-arabinitol, etc.

一般に植物細胞壁を構成する多糖はその化学試薬における抽出方法により、ペクチン様物質画分、ヘミセルロース画分、セルロース画分の三つに大別される。各画分に含まれる多糖の種類は、植物種や用いる組織の違いのみだけでなく、抽出操作の若干の違いだけでも大きく異なることがある。従って、種々の植物性食品の細胞壁を構成する多糖類の比較分析は、できるだけ同一の抽出・分画方法にて調製した標品を用いて行ったほうがよい。水不溶性多糖画分を加藤らの方法⁶⁾に従ってシュウ酸アンモニウム、4%水酸化カリウム および24%水酸化カリウムで順次抽出分画した。得られたペクチン様物質画分 (PS)、ヘミセルロース-I画分 (HC-I)、ヘミセルロース-II画分 (HC-II) およびセルロース画分 (CL) の収量と構成糖組成をまとめたものが表4である。

表4 各種葉菜類水不溶性画分を構成するペクチン様物質、ヘミセルロース-I、ヘミセルロース-IIおよびセルロース画分の収量と構成糖

Subfraction	Yield (Total sugar) (mg)	Ratio (%)	Sugar composition (wt%)							
			U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
<Cabbage>										
PS	47.4	31.5	88.9	3.7	0.6	1.8	0.5	0.5	0.9	3.1
HC-I	7.4	4.9	44.1	6.3	1.6	10.3	9.9	1.3	9.7	16.7
HC-II	12.8	8.5	33.4	2.0	3.8	3.1	12.8	4.3	28.0	12.7
CL	83.1	55.1	tr.	tr.	5.4	2.4	tr.	2.0	85.2	4.9
Total	150.7	100								
<Chinese cabbage>										
PS	30.4	25.4	81.5	6.7	0.6	2.5	0.9	0.9	2.1	4.9
HC-I	4.2	3.5	57.6	4.3	1.0	9.6	4.4	1.5	7.2	14.4
HC-II	10.2	8.5	20.8	2.0	4.4	3.2	18.0	3.7	34.4	13.6
CL	75.1	62.6	tr.	0.1	2.6	1.9	tr.	1.9	93.1	0.5
Total	119.9	100								
<Spinach>										
PS	10.1	9.7	54.4	10.5	0.9	12.5	1.2	1.5	4.6	14.5
HC-I	10.9	10.5	55.3	7.2	0.8	13.2	2.1	0.6	3.0	17.8
HC-II	11.4	11.0	7.2	3.1	4.0	4.2	27.4	4.2	35.1	14.8
CL	71.2	68.7	tr.	0.2	1.2	2.6	0.2	1.8	90.3	3.6
Total	103.6	99.9								
<Chingentsuai>										
PS	74.1	37.1	90.9	2.8	0.5	2.0	0.3	0.3	0.6	2.5
HC-I	14.6	7.3	70.8	2.9	1.1	4.1	4.4	0.8	6.8	9.2
HC-II	16.4	8.2	20.9	1.7	3.4	3.6	23.2	3.6	32.1	11.6
CL	94.4	47.3	tr.	0.5	1.1	1.8	1.0	2.8	88.2	4.6
Total	199.5	99.9								
<Lettuce>										
PS	52.4	33.1	91.9	2.7	0.2	1.5	0.3	0.2	0.3	2.7
HC-I	4.1	2.6	60.2	7.3	1.3	4.3	7.5	1.1	3.3	15.0
HC-II	13.1	8.3	22.7	3.4	3.5	1.9	31.9	1.9	24.5	10.1
CL	88.5	56.0	tr.	0.4	0.6	1.2	0.9	4.2	92.4	0.3
Total	158.1	100								

a) From 1.000 g triturated, freeze-dried leaf vegetable.

各画分の収量と糖組成を品種間で比較すると、ホウレンソウが他の4品種に比してPS含有量が少なく、かつ、PS画分の構成糖としてウロン酸が少ないことがわかる。上述のWSの大部分はペクチンであり細胞壁多糖に由来すると考えてよい。そこで、WSを含めた形で細胞壁構成多糖の割合を算出してみると、キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスでのペクチン様物質 (WS+PS) : ヘミセルロース (HC-I + HC-II) : セルロース (CL) の値はそれぞれ、46:11:43、42:10:49、31:17:53、45:14:42 および47:9:44のようになる。やはり、ホウレンソウが、他の品種に比較してペクチンが少ないことが明確となった。

また、上述の考えによればキャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスの細胞壁に存在するペクチン様物質 (WS+PS) のうちの約46%、53%、75%、26%、44% のペクチン様物質 (WS) が温水処理により細胞壁より可溶化したと考えられる。

ホウレンソウの培養細胞の細胞壁多糖にはフェルラ酸がエステル結合していることが知られている¹⁴⁾。そこで5品種についてフェルラ酸の存在の有無を調べたところ、5品種のなかでホウレンソウにのみ顕著な量のフェルラ酸の存在が確認され、その量は細胞壁多糖100mgあたり380 μ gであった。最近、加藤らはペクチン含有量の非常に少ない禾本科植物を代表するイネの培養細胞の細胞間 (細胞壁間) 接着物質としてフェルラ酸が重要な役割を担っていることを示唆している¹⁵⁾。

ホウレンソウが他の葉菜類に比べペクチン含有量が少なく、かつフェルラ酸を含むことが、食物繊維としての機能や調理特性にどのような影響を与えるか詳細に検討することは非常に興味のもたれるところである。

表5 各種根菜類水可溶性多糖画分の収量と構成糖組成

Water-soluble polysaccharide fraction from	Yield (Total sugar) (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
Turnip	33.3	79.2	3.2	0.9	7.0	trace	1.3	1.7	6.7
Japanese radish	25.0	71.6	4.0	1.0	9.1	trace	1.1	1.5	11.6
Edible burdock	14.9	67.8	2.7	3.1	13.1	trace	1.2	1.7	10.4
Carrot	55.6	76.4	4.9	1.4	6.5	trace	0.8	0.8	9.2
East Indian lotus	4.1	61.3	3.9	9.4	6.4	trace	0.8	5.0	13.3

a) From 1.000 g triturated, freeze-dried leaf vegetable.

表6 各種根菜類水不溶性画分を構成するペクチン様物質、ヘミセルロース-I、ヘミセルロース-IIおよびセルロース画分の収量と構成糖

Subfraction	Yield (Total sugar) (mg)	Ratio (%)	Sugar composition (wt%)							
			U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
<Turnip>										
PS	41.0	33.3	66.5	2.4	5.0	11.6	6.2	1.6	1.1	5.6
HC-I	8.7	7.1	11.5	5.6	2.4	21.7	18.1	13.4	11.6	15.6
HC-II	16.5	13.4	8.8	2.0	2.5	7.5	28.5	13.9	22.9	13.9
CL	57.0	46.3	tr.	tr.	-	0.9	0.7	1.9	92.8	3.7
Total	123.2	100.1								
<Japanese radish>										
PS	73.4	44.3	87.0	4.3	0.1	4.3	1.0	0.4	0.3	2.7
HC-I	5.4	3.3	21.3	8.0	3.6	17.9	19.8	6.4	9.5	13.5
HC-II	14.7	8.9	11.5	2.3	2.8	7.0	32.6	4.7	27.9	11.2
CL	72.1	43.5	tr.	tr.	-	1.0	1.1	2.2	91.2	4.5
Total	165.6	100								
<Edible burdock>										
PS	190.8	44.6	74.2	6.2	4.4	9.4	1.9	0.2	0.7	3.0
HC-I	12.7	3.0	44.8	5.6	0.8	17.4	16.3	2.4	4.0	8.7
HC-II	28.2	6.6	9.7	1.7	6.4	20.1	46.7	0.7	6.7	8.1
CL	195.9	45.8	tr.	tr.	-	1.0	2.3	3.0	87.7	6.0
Total	427.6	100								
<Carrot>										
PS	59.5	38.4	80.6	2.2	3.8	5.6	0.9	0.6	0.6	5.6
HC-I	3.6	2.3	25.6	8.7	1.0	17.8	11.6	5.6	11.0	18.6
HC-II	9.7	6.3	9.6	3.5	1.7	15.2	40.0	4.3	10.3	15.5
CL	82.2	53.0	tr.	tr.	-	1.5	-	2.9	89.8	5.9
Total	155.0	100								
<East Indian lotus>										
PS	20.2	30.4	68.4	2.8	0.3	8.6	0.9	1.2	10.6	7.4
HC-I	4.5	6.8	17.9	5.0	0.8	6.2	16.4	3.8	33.4	16.4
HC-II	10.0	15.0	17.4	1.9	1.2	8.6	22.0	2.6	28.8	17.5
CL	31.8	47.8	tr.	tr.	-	2.8	0.9	4.0	90.0	2.2
Total	66.5	100								

a) From 1.000 g triturated, freeze-dried root vegetable.

4. 考 察

キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスの全炭水化物量（内訳、単糖・オリゴ糖：デンプン：細胞壁多糖）を生重量100gあたりで比較してみると、キャベツで3,248mg（60.2:0.4:39.4）、ハクサイで2,064mg（65.4:0.5:34.2）、ホウレンソウで2,642mg（46.5:1.8:51.7）、チンゲンサイで1,785mg（17.5:0.4:82.0）、レタスで1,683mg（55.8:0.8:43.5）となる。チンゲンサイ以外の葉菜類は食物繊維（難消化性多糖）と同時に消化性糖質も供給していることになる。

また、細胞壁を構成している多糖の種類について5品種間で比較した場合、大きな違いがないと思われる。ただし、微細構造では差異があると考えられる。われわれは、すでにキャベツの水不溶性食物繊維が低分子糖を一時的に抱え込む性質を有し、*in vitro*においてグルコースの拡散速度を遅らせることを明らかにしている⁴⁾。従って、組成がほぼ同じであるホウレンソウ、ハクサイ、チンゲンサイおよびレタスにも同様な機能特性を期待することができる。

さらに、葉菜類の場合と同一方法にて、主要根菜類（ダイコン、ゴボウ、レンコン、ニンジンおよびカブ）から調製した、水可溶性多糖画分（表5）並びに水不溶性画分を分画して得たペクチン様物質画分、ヘミセルロース-I、ヘミセルロース-IIおよびセルロース画分（表6）の収量と構成糖を調べた。構成糖から判断して、壁を構成している多糖類（食物繊維）に葉菜類と根菜類に大きな相違はないと考えられる。

5. 引用文献

- 1) 印南 敏、桐山修八編：食物繊維、第一出版株式会社、東京、(1985)
- 2) Kritchevsky, D.: *Dietary fiber. Ann. Rev. Nutr.*, 8, 301 (1988)
- 3) 加藤陽治、秋山美香：日本栄養・食糧学会誌、46, 161 (1993)
- 4) 加藤陽治：日本栄養・食糧学会誌、46, 351 (1993)
- 5) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- 6) Kato, Y. and Matsuda, K.: *Plant Cell Physiol.*, 17, 1185 (1976)
- 7) Kato, Y., Ito, S., Iki, K. and Matsuda, K.: *Plant Cell Physiol.*, 23, 351 (1982)
- 8) Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.*, 4, 330 (1962)
- 9) Robyt, J. and French, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451 (1963)
- 10) Hakomori, S.: *J. Biochem.*, 55, 205 (1964)
- 11) Lindberg, B.: *Meth. in Enzymol.*, 28, 178 (1972)
- 12) Kato, Y. and Nevins, D.J.: *Plant Physiol.*, 75, 740 (1984)
- 13) 桜井直樹、山本良一、加藤陽治：植物細胞壁と多糖類、培風館、東京、(1991)
- 14) Fry, S.C.: *Biochem. J.*, 203, 493 (1982)
- 15) Kato, Y., Yamanouchi, H., Hinata, K., Ohsumi, C. and Hayashi, T.: *Plant Physiol.*, 104, 147 (1994)
- 16) Kato, Y. and Matsuda, K.: *Plant Cell Physiol.*, 18, 1089 (1977)

第2章 ゴボウキシログルカンの微細構造

1. 研究目的

先にわれわれは、ゴボウの細胞壁が中性糖を有するラムノガラクトナン、アラビナン、キシラン、ガラクトナン、アラビノガラクトナン、キシログルカンおよびセルロースから構成されていることをメチル化分析の結果をもとに示唆した¹⁾。また、本キシランの化学構造を詳細に解析し、ゴボウキシランは(1→4)- β -D-キシランを主鎖とし、そのキシロース残基の約8.3%にメチル- α -D-グルクロン酸が側鎖として結合していることを明らかにした²⁾。結果より、このキシランはペクチン同様陽イオン交換能をもつと考えた。

高等植物細胞壁構成多糖の一つであるキシログルカンは、壁の強度に影響を与えることが知られている。一方、キシログルカンに由来するオリゴ糖は、小腸におけるグルコースの吸収に阻害効果を及ぼすことが最近明らかになっている。そこで、本研究では、ゴボウキシログルカンの化学構造を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

先に、ゴボウ可食部細胞壁を熱水、シュウ酸アンモニウム、4%および24%水酸化カリウムで順次抽出して得た多糖画分のうち、24%水酸化カリウムで抽出され、水に可溶性であるヘミセルロース-II B画分を使用した²⁾。

ヘミセルロース-II B画分を酢酸型のDEAE-Sephadex A-25のカラムクロマトグラフィー²⁾に供し、素通り画分(図1)を蒸留水に対し透析し、凍結乾燥させたものをゴボウキシログルカン(XG)とした。

特に断わらない限り、実験方法は既報に従った¹⁻⁴⁾。

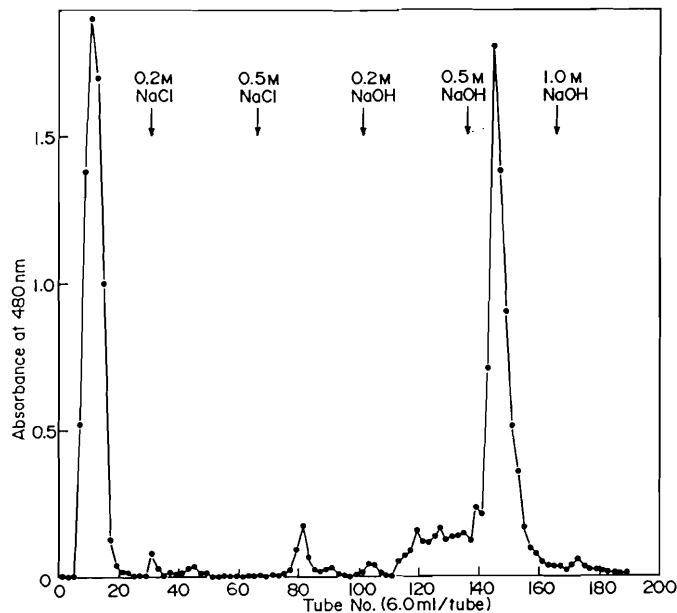


図1 ゴボウ細胞壁から得たヘミセルロース-II B画分のDEAE-Sephadex A-25による分画

3. 結 果

本多糖標品 (XG) の構成糖は、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、グルコースおよびガラクトースで、その構成モル比は2.5:9.1:trace:32.1: 34.6:21.7であった。

XGを *Aspergillus oryzae* 粗酵素標品であるサンザイム1000⁵⁾ で加水分解処理し、分解物をBio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに供し、二糖溶出画分を分離精製した。この二糖をペーパークロマトグラフィーに供したところ、キシログルカンの最小構成ユニットであるイソプリメベロース (6-O- α -D-xylopyranosyl-D-glucose) と同一の移動度 (R_{G1} 値: 0.76) を与えた。

XG-ヨード複合体の480~700nmでの吸収スペクトル (図2) は、キシログルカン特有の640 nmに極大吸収を与えた⁶⁾。また、本多糖をSephacryl CL-6B カラムを用いて分子量を測定したところ、 4.0×10^4 であった (図3)。

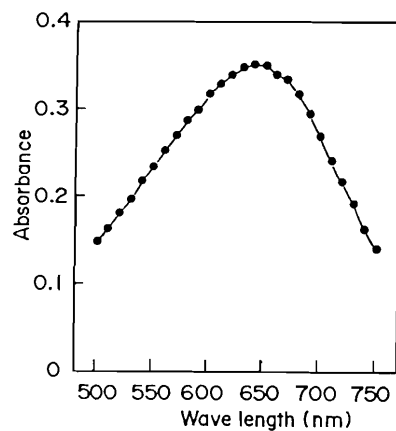


図2 ゴボウキシログルカン-ヨード複合体吸収スペクトル

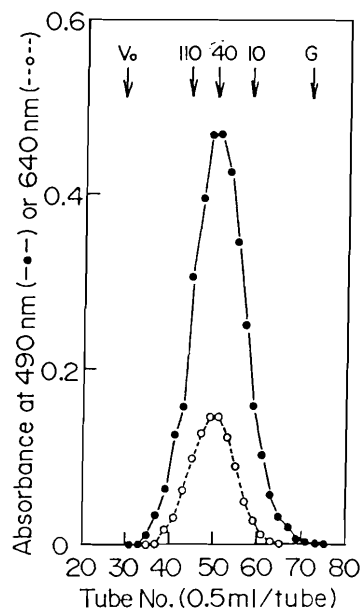


図3 ゴボウキシログルカンの分子量分布

また、箱守法⁷⁾にてメチル化を行い、得られたメチル化多糖を加水分解後、アルジトールアセテート²⁾とし、ガスクロマトグラフィーにて糖結合様式を調べた(表1)。結果は、XGは(1→4)-β-D-グルカンを主鎖とし、グルコース残基の約75%が0-6位でα-D-キシロピラノース残基、β-D-ガラクトピラノシル-(1→2)-α-D-キシロピラノース残基、およびα-L-フコピラノシル(1→2)-β-D-ガラクトピラノシル-(1→2)-α-D-キシロピラノース残基により置換されていることを示している。

表1 ゴボウキシログルカン構成糖の結合様式

メチル化糖	結合様式	%
2,3,4-tri-O-methyl-D-xylose	(非還元末端キシロース残基)	26.1
2,3,4-tri-O-methyl-L-Fucose	(非還元末端フコース残基)	3.0
2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose and 3,4-di-O-methyl-xylose	(非還元末端ガラクトース残基 及び2-結合キシロース残基)	16.1
3,4,6-tri-O-methyl-D-galactose	(2-結合ガラクトース残基)	4.7
2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose	(4-結合グルコース残基)	13.4
2,3-di-O-methyl-D-glucose	(4,6-結合グルコース残基)	36.8

ゴボウキシログルカンの微細構造を調べるために、XGの屑片分析を酵素を用いて行った。XGを*T. viride*由来のセルラーゼで加水分解し、分解物をBio-Gel P-4のカラムクロマトグラフィー(図4)に供した。主要オリゴ糖A、BおよびCを再クロマトグラフィーにて精製した。

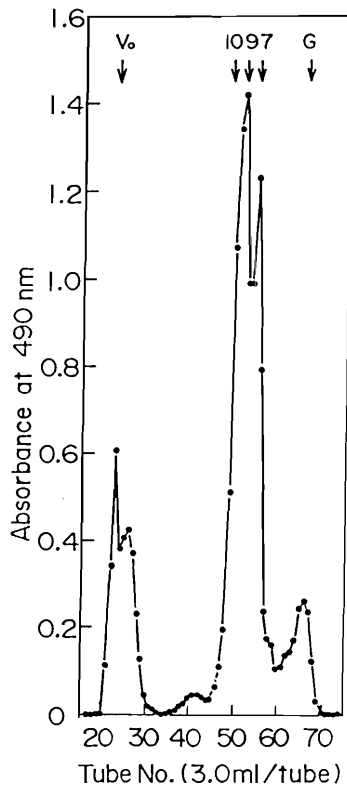


図4 ゴボウキシログルカンのセルラーゼ加水分解物のBio-Gel P-4溶出パターン A(試験管番号46~50)、B(51-53)、C(54-57)

オリゴ糖A、BおよびCの構成糖と *A. oryzae* のイソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素^{4, 8, 9)} 処理生成物分析の結果を表2に示す。

表2 ゴボウキシログルカンをセルラーゼで加水分解して得られたオリゴ糖A、BおよびCを *A. oryzae* のイソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素で処理したときの生成物

オリゴ糖	生成物 (モル比)
A	IP:八糖 (Glc:Xyl:Gal:Fuc=3.0:1.9:2.1:1.0) = 1.0:0.8
B	IP:五糖(Glc:Xyl:Gal:Fuc=2.0:1.3:1.3:1.2) = 2.0:0.9
C	IP:Glc = 3.0:1.1

オリゴ糖A (356 μ g)、B (755 μ g) およびC (676 μ g) それぞれをイソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素で処理した。加水分解物を Bio-Gel P-2のカラムクロマトグラフィーに供し分画後得られたオリゴ糖を分析した。IPはイソプリメベロースである。

以上の結果より、ゴボウキシログルカンを構成している主要オリゴ糖の構造は図5に示すような構造を有すると考えた。また、これら七糖、九糖および十糖のモル比は14:12:5であった。

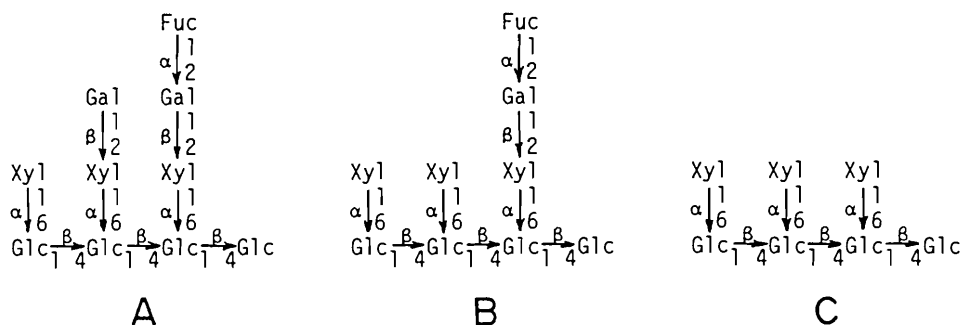


図5 オリゴ糖A、BおよびCの推定構造

4. 考 察

一般に、キシログルカンの化学構造は植物種により異なり、双子葉植物のキシログルカンは、単子葉のそれに比べ複雑な構造を持つことが明らかにされている¹⁰⁾。

今回の実験結果より、ゴボウキシログルカンは、豆科植物のキシログルカンの構造に非常に類似していることがわかった。ゴボウの細胞壁強度維持にキシログルカンがどれほど関わりを有するか、調理科学の観点から興味もたれる。

5. 引用文献

- 1) Kato, Y., Kanari, T. and Watanabe, T.: J. Home Econ. Jpn., 42, 241 (1991)
- 2) Watanabe, T., Kato, Y., Kanari, T. and Okazaki, T.: Agric. Biol. Chem., 55, 1139 (1991)
- 3) Kato, Y., Ito, S., Iki, K. and Matsuda, K.: Plant Cell Physiol., 23, 351 (1982)
- 4) Kato, Y. and Matsuda, K.: Agric. Biol. Chem., 44, 1759 (1980)
- 5) Kato, Y. and Matsuda, K.: Plant Cell Physiol., 18, 1089 (1977)
- 6) Kato, Y. and Matsuda, K.: Agric. Biol. Chem., 44, 1751 (1980)
- 7) Hakomori, S.: J. Biochem., 55, 205 (1964)
- 8) Kato, Y., Matsushita, J., Kubodera, T. and Matsuda, K.: J. Biochem., 97, 801 (1985)
- 9) Matsushita, J., Kato, Y. and Matsuda, K.: Agric. Biol. Chem., 49, 1533 (1985)
- 10) 桜井直樹、山本良一、加藤陽治、植物細胞壁と多糖類、培風館、東京、138-142頁 (1991)

第3章 葉菜類キシログルカンの構造比較

1. 研究目的

各種葉菜類（キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタス）に含まれるキシログルカンの微細構造を比較検討することを目的とした。

2. 材料と方法

【材料】

第1章で調製したキャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスの24%水酸化カリウム抽出多糖画分（HC-II）を用いた。

【HC-IIの分画】

それぞれの試料を50mM酢酸緩衝液(pH 5.5)に溶解し、遠心操作により不溶物を除いた。可溶性画分を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(1.8 × 8 cm)にのせ同じ緩衝液、1Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液、0.5M水酸化ナトリウムで順次溶出した。溶出液は、3.0mlずつ集め、フェノール・硫酸法にて糖量を求めた。得られた各画分は透析後、凍結乾燥し、溶出順にHC-II-1、HC-II-2、HC-II-3とした。

【一般分析法】

構成糖分析、構成糖結合様式分析およびヨード複合体の吸収スペクトル測定等は前述の方法もしくは、前述の文献に従って行った。

3. 結果と考察

キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、チンゲンサイおよびレタスから調製したHC-IIのDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーの結果を図1に示す。いずれも3画分得られ、それぞれのHC-II-1、HC-II-2、HC-II-3の収量と構成糖比を調べまとめたものが表2である。中性多糖画分である素通り画分HC-II-1に明らかにキシログルカンが含まれている。

それぞれのHC-II-1のヨード複合体の吸収スペクトルを比較すると、いずれもキシログルカン特有の色調と極大吸収を640 nmにもっていた(図2)。

また、それぞれのHC-II-1をメチル化分析に供し、糖結合様式を調べた結果が表2である。豆科植物のキシログルカンは非還元末端フコース(T-Fuc)、4-結合と4,6-結合グルコース(4-Glcと4,6-Glc)、非還元末端と2-結合キシロース(T-Xylと2-Xyl)、非還元末端と2-結合ガラクトース(T-Galと2-Gal)を構成糖単位としている¹⁾。

使用したガスクロマトグラフィーのカラムでは、これら部分メチル化アルジトールアセテートが十分分離されないが、糖組成分析結果をも考慮すると、いずれもフコースを有するいわゆる双子葉植物に典型的なキシログルカンであると考えられる。しかも、その平均構造には大きな差異はないと考えられる。しかし、詳細な微細構造の比較には酵素による屑片分析等が必要である。

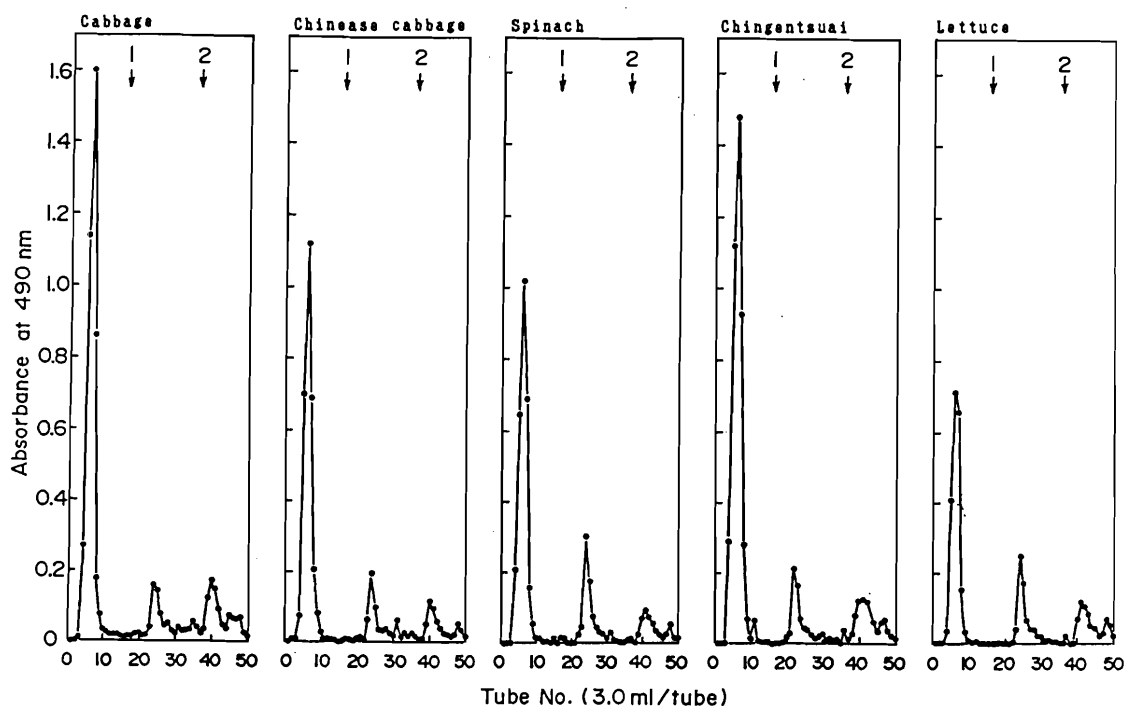


図1 各種葉菜類水不溶性画分から得たヘミセルローズ-IIの分画

表1 DEAE-Sephadex A-25クロマトにより得られた各画分の収量および構成糖

Subfraction (Tube No. in Fig. 7)	Yield		Sugar composition (wt%)							
	μg	(%)	U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
<Cabbage>										
HC-II-1 (4-10)	12465	(74.9)	0	0	6.0	2.0	21.0	5.7	43.8	21.6
HC-II-2 (23-26)	1260	(7.6)	32.2	13.2	2.0	11.2	13.7	1.0	8.1	18.6
HC-II-3 (38-50)	2922	(17.6)					N.D. ^{a)}			
<Chinese cabbage>										
HC-II-1 (4-10)	8697	(75.0)	0	0	5.5	1.7	19.5	3.4	44.9	25.0
HC-II-2 (23-26)	1188	(10.2)	36.0	11.0	2.4	8.3	18.1	1.0	10.3	12.9
HC-II-3 (38-50)	1710	(14.7)					N.D. ^{a)}			
<Spinach>										
HC-II-1 (4-10)	8373	(70.7)	0	0	4.4	3.1	21.9	4.8	40.8	25.0
HC-II-2 (22-26)	1890	(16.0)	30.8	10.6	1.9	15.8	13.4	0.5	9.2	17.8
HC-II-3 (38-50)	1578	(13.3)					N.D. ^{a)}			
<Chingentsuai>										
HC-II-1 (4-10)	12561	(74.3)	3.5	0	4.4	1.9	21.1	3.8	45.4	19.9
HC-II-2 (21-25)	1563	(9.2)	33.9	9.4	2.5	8.1	19.6	0.6	11.8	14.1
HC-II-3 (38-50)	2787	(16.5)					N.D. ^{a)}			
<Lettuce>										
HC-II-1 (4-10)	6039	(61.1)	1.3	0	5.1	1.9	18.5	1.9	40.8	30.6
HC-II-2 (22-27)	1734	(17.5)	41.1	12.2	2.2	4.5	18.0	0.3	7.4	14.3
HC-II-3 (39-50)	2115	(21.4)					N.D. ^{a)}			

a) Not determined.

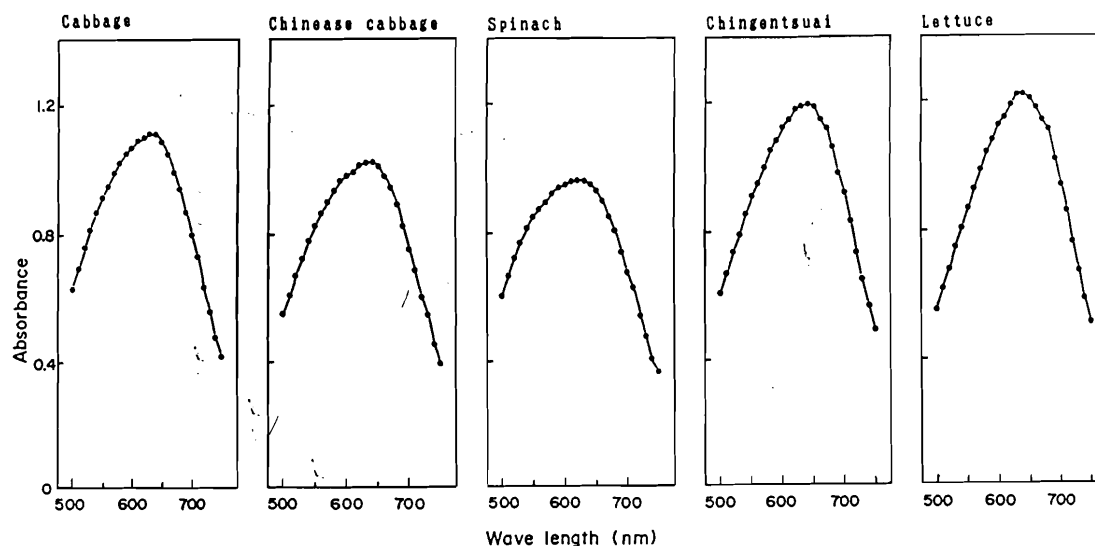


図2 各種葉菜類キシログルカン・ヨード複合体吸収スペクトル

表2 各種葉菜類HC-II-1構成多糖類の糖結合様式

Peak No.	Methylated sugar	Deduced glycosidic linkage	Amount (%)				
			Cabbage	Chinese cabbage	Spinach	Chingentsuai	Lettuce
1	2,3,4-Me ₃ -Xyl	T-Xyl	2.1	4.2	9.3	6.5	6.6
2	2,3,4-Me ₃ -Fuc	T-Fuc	3.3	3.8	5.2	5.6	4.4
3	2,3,4,6-Me ₄ -Gal, 2,3-Me ₂ -Xyl and/or 3,4-Me ₂ -Xyl	T-Gal, 4-Xyl and/or 2-Xyl	14.5	18.0	29.3	21.4	25.7
4	2,3,6-Me ₃ -Gal, 3,4,6-Me ₃ -Gal and/or 2,3,4-Me ₃ -Glc	4-Gal, 2-Gal and/or 6-Glc	8.6	6.7	3.6	8.6	7.1
5	2,3,6-Me ₃ -Glc	4-Glc	18.4	18.7	18.1	21.2	19.3
6	2,3-Me ₂ -Glc	4,6-Glc	53.1	48.6	34.6	36.6	36.8

4. 引用文献

- 1) 桜井直樹、山本良一、加藤陽治、植物細胞壁と多糖類、培風館、東京、138-142頁 (1991)

第4章 水溶性食物繊維（イヌリン）の貯蔵および加熱処理による変化

1. 研究目的

植物性食品に含まれる炭水化物とその加水分解酵素の関係について貯蔵や調理の観点から数多くの研究がなされている。そのなかの一つにイモ類のデンプンとアミラーゼをあげるができる。例えば、電子レンジで加熱したサツマイモは、蒸したり焼いたりしたものよりも甘味がうすい。これは、電子レンジ処理ではサツマイモ中のアミラーゼがデンプンに対する作用時間がきわめて短いため、甘味成分であるグルコースやマルトースなどの生成が少ないためである¹⁾。

一方、ゴボウやキクイモなどには、甘味成分の代表であるフラクトース（果糖）の縮重合体であるイヌリンがデンプンにかわる貯蔵多糖として存在する²⁾。また、ショ糖分子にフラクトースが少数個結合したフラクトオリゴ糖は、ショ糖と極めて似た甘味を持つにもかかわらず、腸内有用細菌であるビフィズス菌増殖促進作用、コレステロール低下作用、難う蝕原性などショ糖とは異なる有効な生理作用を有する³⁾。そのため、近年、さまざまな形で食品の中に添加（例えば乳酸飲料や食物繊維飲料）利用されている。

このようなフラクトオリゴ糖は、天然界の高等植物（アスパラガス、タマネギやニンニクなど）⁴⁾にも含まれている。日常の食生活において摂取機会の比較的多く、かつ不溶性食物繊維量とともに可溶性食物繊維でもあるイヌリン含有量の高いゴボウ⁵⁾に注目して、貯蔵や加熱処理によりイヌリンがどのように変化するかを明らかにすることを本研究の目的とした。

2. 材料と方法

【材料】

ゴボウは弘前市内のスーパーマーケットより購入した。

【イヌリン（フラクトオリゴ糖）の抽出・定量】

ゴボウの皮を除き薄く輪切りにし、よく混ぜた。これより100 g（生重量）を測りとり、100 mlの蒸留水とともに、ホモゲナイザーあるいは乳鉢で磨砕した。磨砕物を三枚重ねのガーゼで濾過し、濾液をさらに遠心分離（3000 rpm、30分）した。遠心上清中の糖量をフェノール・硫酸法⁶⁾により求め、フラクトース相当量で示した。これは、植物に含まれているイヌリン（フラクトオリゴ糖を含む）のほとんどは、冷水あるいは温水で抽出され⁷⁾、および冷水抽出画分への夾雑多糖類の混入はわずかであること⁸⁾に基づいている。

【分子量分布】

ゲル濾過剤Bio-Gel P-2（分画分子量範囲 100~1800）をガラスカラム（1.8 x 44 cm）に詰め、蒸留水で平衡化し、試料（糖約5 mg/0.5~1.0 ml）をのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は2.0 mlずつフラクションコレクター（ADVANTEC SF-100）で集め、そのなかから適量とりフェノール・硫酸法⁶⁾にて糖量を測定した。

【ペーパークロマトグラフィー】

東洋濾紙No.50（20 x 20 cm）の下端1.5 cmのところをスポットし、65% n-プロパノールで展開、風乾後、アルカリ性硝酸銀試薬⁹⁾、あるいはレゾルシノール試薬（フラクトース、ショ糖、フラクトオリゴ糖用）⁹⁾で糖を発色した。

3. 結 果

(1) 市販ゴボウのイヌリン含有量とその分子量分布

市販ゴボウに含まれるイヌリン（フラクトオリゴ糖も含む）の量を調べた結果をまとめたのが表1である。

表1 ゴボウのイヌリン（フラクトオリゴ糖）含有量とその分子量分布

試 料 (購入時期)	イヌリン（フラクトオリゴ糖） (mg / 10 g可食部生重量)	高分子（分子量1800以上） 低分子（分子量1800以下）
1991年 3月	713	35/65
11月	975	61/39
1992年 5月	540	15/85
8月	948	56/44
11月	960	56/44

また、それぞれのイヌリン標品（水磨砕物可溶性画分）の分子量分布をBio-Gel P-2 のゲル濾過クロマトグラフィーにより調べた。典型的な例として、1992年5月および8月に購入したゴボウ中のイヌリンの分子量分布を、それぞれ図1-Aと1-Bに示す。5月購入ゴボウでは高分子状（分子量1800以上、図中試験管番号15~25）のものと低分子状（分子量 180~1800、図中試験管番号26~55）のものの比が約15:85であるが、8月購入のもののは約56:44であった。

即ち、購入時期の違いにより、ゴボウ中のイヌリンはその量のみならず、分子の大きさも異なることが示された（表1）。

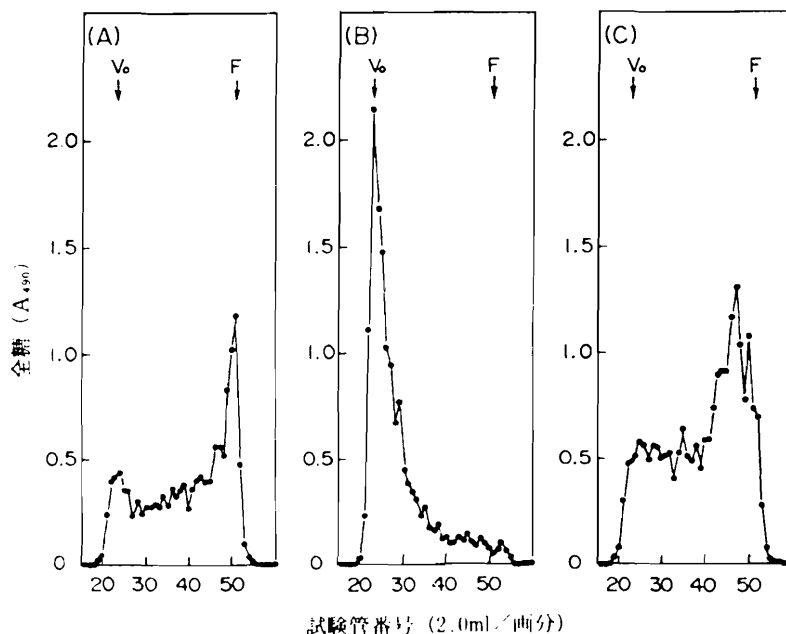


図1 ゴボウ中のイヌリン（フラクトオリゴ糖）の分子量分布

ゴボウを水とともに磨砕、可溶性画分をBio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。(A) 1992年5月購入ゴボウ。(B) 1992年8月購入ゴボウ。(C) 8月購入ゴボウを4°Cに三カ月間貯蔵したもの。図中のVoおよびFはそれぞれ分子量1800以上の糖およびフラクトース（分子量180）の溶出位置を示す。

(2) 貯蔵に伴うイヌリン分子量の変化

8月購入ゴボウを冷蔵庫(4°C)にて三カ月間貯蔵後、イヌリンを抽出し分子量分布を調べた結果が図1-Cである。高分子状のものと低分子状のものの割合は、11:89であった。このことは、貯蔵前のものの分子量分布(図1-Bのゲル濾過パターン)と比較すると明らかなように、貯蔵中にゴボウに含まれる高分子イヌリンの約80%が低分子化(オリゴ糖化)したことを示している。

また、1992年11月購入ゴボウについて、購入時および一週間室温放置後のもののイヌリンの分子量分布(図2-A、高分子:低分子=56:44、図2-B、高分子:低分子=45:55)を比較すると、高分子画分の約20%が明らかに低分子化していることが示された。

(3) ゴボウ中のイヌリン加水分解酵素

ゴボウの磨砕物遠心上清を、室温に24時間および96時間放置したものの分子量分布を、磨砕直後のものと比較した(図3)。高分子と低分子の比率は放置0時間、24時間 および96時間でそれぞれ61:39、54:46、28:72であった。また、図3-Cの溶出パターンから得られた画分1~8についてペーパークロマトグラフィーで糖組成を調べると、いずれの画分もレゾルシン試薬で発色し、フラクトースから成るオリゴ糖(フラクトオリゴ糖)の存在が確認された。これらの結果より、イヌリンの低分子化はゴボウ中のイヌリン加水分解酵素によって引き起こされることが明確となった。

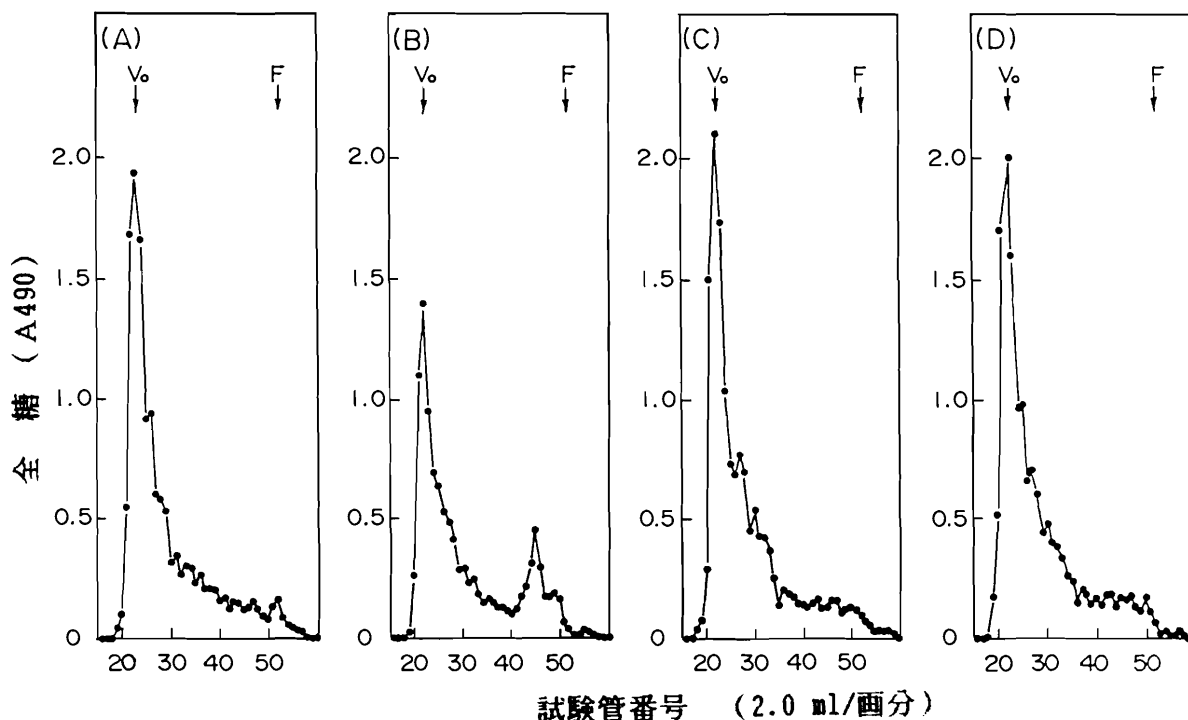


図2 貯蔵および温水前処理によるゴボウ中のイヌリン(フラクトオリゴ糖)分子量の変化

ゴボウ(1992年11月購入)(A)、およびこれを室温に一週間放置したもの(B)をそれぞれ水とともに磨砕、可溶性画分をBio-Gel P-2ゲル濾過クロマトグラフィーに供した。また、同ゴボウを薄く輪切りにしたものを、はじめ40°Cの水中で10分(C)あるいは60分(D)処理し、引続き10分沸騰させたものを磨砕、可溶性画分を同クロマトグラフィーに供した。

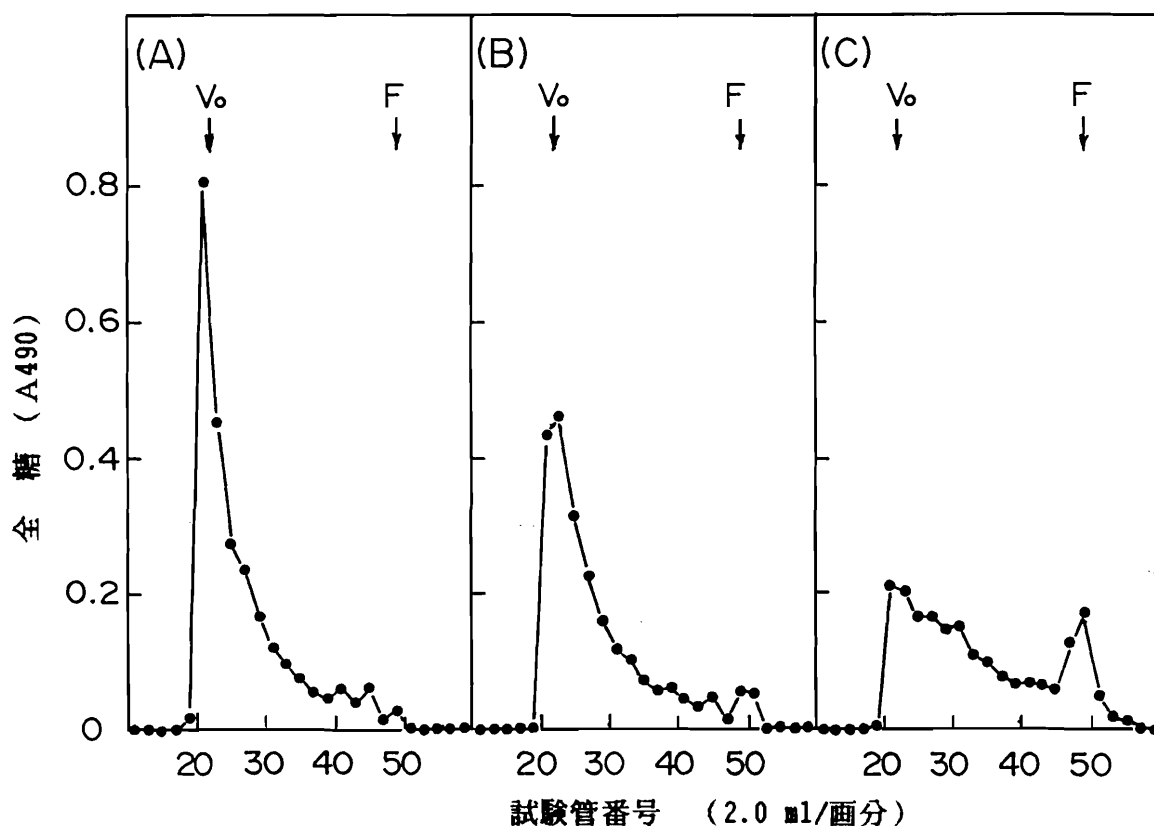


図3 ゴボウ水可溶性画分の放置時間に伴う分子量変化

ゴボウ（1991年8月購入）の冷水磨砕物の遠心上清に防腐剤としてトルエンを数滴加え室温に24時間(B)あるいは120時間(C)放置後、Bio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。(A)は磨砕直後のもののクロマトグラムを示す。図Cの試験管番号 20~24、25~28、29~32、33~35、36~39、40~42、43~45 および46~51を、それぞれ一緒にし濃縮後、画分1~8としてペーパークロマトグラフィーに供した。

(4) 温水前処理に伴うイヌリン分子量の変化

ゴボウ（1992年11月購入）を薄く輪切りにし、蒸留水とともにビーカーに入れ、はじめ40°Cで10分あるいは60分処理後、10分沸騰させ、磨砕可溶性画分（イヌリン）の分子量分布を調べた（図2-Cと2-D）。高分子：低分子の割合は、10分処理および60分処理のいずれでも50：50であった。これを未処理のもの（図2-A）と比較すると高分子イヌリンの約10%が低分子化したことがわかる。これは、40°Cでの前処理中にイヌリンにイヌリン分解酵素が作用したためと考えられる。

(5) 加熱処理に伴うイヌリン分子量の変化

ゴボウ（1992年8月購入）を沸騰水中で0分、10分、30分および60分処理した時の分子量変化を調べた。しかし、いずれの場合も、高分子：低分子の比率は約50：50で、顕著な違いが見られなかった。単なる加熱（100°C）処理では、イヌリンの低分子化はほとんど起こらないと考えられる。

4. 考 察

今回の実験結果から、低温における長期貯蔵は明らかにイヌリンの低分子化を引き起こすことがわかった。市販ゴボウ中のイヌリン量とその分子量分布に購入時期による顕著な差が見られたことは、品種や鮮度（産地から消費者に届くまでの貯蔵、保存状態）などに起因すると考えられる。

また、ゴボウを加熱する時、はじめから 100°C で加熱した場合は、イヌリンの低分子化は起こらないが、温水（40°C）による前処理で低分子化が起こる可能性があることがわかった。日常の食生活で、われわれがゴボウを利用する際、生食することではなく、なんらかの形で必ず加熱操作が入る。ゴボウ中のイヌリンとその分解酵素の最適反応条件を設定でき、甘味の付与が可能になれば、調理の際の糖甘味料（砂糖）添加量を減らすこともできる。ゴボウのアク抜きとの組合せでこの点を詳細に検討することは興味のあるところである。

5. 引用文献

- 1) 杉田浩一：「こつ」の科学、柴田書店、東京、154（1987）
- 2) 原田篤也、三崎 旭編：総合多糖類科学(下)、講談社、東京、285（1974）
- 3) 日高秀昌、栄田利章、足立堯、斎藤安弘：農化、61, 915（1987）
- 4) 日高秀昌：治療学、14, 635（1985）
- 5) Kato, Y., Kanari, T. and Watanabe, T.: J. Home Econ. Jpn., 42, 241（1991）
- 6) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Anal. Chem., 28, 350（1956）
- 7) 松田和雄編：多糖の分離・精製法、学会出版センター、東京、132（1987）
- 8) Robyt, J. and French, D.: Arch. Biochem. Biophys., 100, 451（1963）
- 9) 別冊 蛋白質核酸酵素、共立出版、東京、34（1968）

第5章 水不溶性食物繊維のグルコースの in vitroにおける拡散速度に与える影響

1. 研究目的

先に、われわれは、大根水不溶性食物繊維が分子量2千~50万の範囲で弱いながらも分子ふるい能を有すること、および、分子量2千以下の糖を繊維内奥部に完全に抱え込めるだけの空間を有することを明らかにした¹⁾。さらに、それらの結果を基に、「消化管における低分子糖の吸収は、多量食物繊維が共存すれば、低分子糖のみが存在するときに比べ緩慢になる」という仮説を提出した。

そこで、今回は、大根水不溶性食物繊維で見られた「低分子糖を一時的に抱え込む性質」が、すべての種類の水不溶性食物繊維に普遍的な性質であるか否か、そして、この性質が低分子糖の拡散速度に影響を与えるか否か、の二点を明らかにすることを研究目的とした。

2. 材料と方法

【材料】

キャベツは、弘前市内のスーパーマーケットより購入した。筍（モウソウチク）は仙台市郊外で採取した。

【水不溶性食物繊維の調製】

キャベツ可食部（生重量：511g）および筍可食部（生重量：290g）の水不溶性食物繊維の調製は、前報¹⁾に従って行い、それぞれ8.15gおよび9.12gを得た。大根水不溶性食物繊維は、前報¹⁾で調製したものを用いた。

【水不溶性食物繊維の多糖類組成】

キャベツ水不溶性食物繊維（1,344mg）およびタケノコ水不溶性食物繊維（1,276mg）を、加藤らの方法²⁾に従って、0.25%シュウ酸アンモニウム、4%および24%水酸化カリウムで順次抽出分画し、それぞれ、ペクチン様物質画分、ヘミセルロース-I画分、ヘミセルロース-II画分とし、抽出残さをセルロース画分とした。各画分の中性糖組成は、酸で加水分解後、アルジトールトリフルオロアセテートとしてガスクロマトグラフィーで定量した³⁾。酸性糖量の測定はカルバゾール・硫酸法⁴⁾に依った。

【ゲル濾過】

キャベツおよびタケノコ水不溶性食物繊維を0.1Mの塩化ナトリウムを含む50mM酢酸緩衝液（pH 5.5）に懸濁し、これをガラスカラム（半径0.5cm×長さ46cm）に詰め、同緩衝液で平衡化した。標準糖として、グルコース、デキストランT-10（平均分子量1万）、T-110（平均分子量10万）、T-500（平均分子量50万）、マルトデキストリン（分子量2千以下のマルトオリゴ糖混合物）およびブルーデキストラン（分子量200万）を用いた。溶出した糖の測定はフェノール・硫酸法⁵⁾（490 nmでの吸光度）にて行った。また、グルコースの溶出の確認にはネルソン・ソモギー法^{6,7)}（500 nmでの吸光度）を、ブルーデキストランの溶出の確認には360 nmでの吸光度を測定した。クロマトグラフィーは室温にて行った。

【グルコースの拡散速度に与える影響】

水不溶性食物繊維（0g、0.5g、1.0g、1.5gまたは2.0g）を50mlの1.5%グルコース溶液に加え、

マグネチックスターラーで30分間攪拌し、試料を均一にした後、透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, Size:36/32, 三光純薬株式会社) に詰め、500mlの蒸留水に対して透析した。経時的 (0、30、60、90 および120分後) に、透析外液の一部 (50 μ l) を採り、そのなかのグルコース量をフェノール・硫酸法⁵⁾にて求めた。

3. 結 果

(1) 水不溶性食物繊維の多糖類組成

キャベツおよびタケノコの水不溶性食物繊維を構成している多糖類を調べるために、各試料を0.25%シュウ酸アンモニウム、4%および24%水酸化カリウムで順次抽出分画し、ペクチン様物質画分 (PS)、ヘミセルロース-I画分 (HC-I)、ヘミセルロース-II画分 (HC-II) およびセルロース画分 (CL) を得た。得られた各画分の収量 (全糖量) と糖組成をまとめたものが、Table 1である。

キャベツ水不溶性食物繊維は、ペクチン様物質 (主にガラクトツロン酸からなるガラクトツロナン)、ヘミセルロース性多糖類 (アラビナンとガラクトナンもしくはアラビノガラクトナンあるいはこれらのすべて、およびキシログルカン) とセルロースから構成されており、その比は約46:13:41である。これは、先に報告した大根水不溶性食物繊維の値 (約51:11:38)¹⁾ と類似しており、多糖類組成は、ほとんど同じであると思われる。しかし、キャベツと大根の値を、筍のそれと比較すると明らかに、多糖類組成が異なることがわかる。即ち、筍水不溶性食物繊維は、ペクチン様多糖類が11.7%と少なく、ヘミセルロース性多糖類が41.4%と多い。後者は(1 \rightarrow 3)、(1 \rightarrow 4)- β -D-グルカン、グルクロノアラビノキシランおよびキシログルカンが主要多糖類である⁸⁾。

Table 1. Total sugar contents and sugar composition of fractions obtained from water-insoluble dietary fibers of cabbage and bamboo shoots.

Fraction ^{a)}	Total sugar ^{b)}		Sugar composition ^{c)} (wt%)							
	mg	(%)	U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
Cabbage										
PS	369.4	(46.1)	76.6	4.9	2.4	5.0	2.9	2.2	1.8	4.3
HC-I	35.4	(4.4)	28.7	6.1	5.2	13.1	19.6	3.9	17.6	5.8
HC-II	68.6	(8.6)	12.9	2.5	3.9	4.3	35.4	5.8	21.0	14.3
CL	327.6	(40.9)	—	0.1	2.7	1.7	1.0	5.0	89.2	0.4
Total	801.0	(100)								
Bamboo shoots										
PS	79.3	(11.7)	75.6	0.6	0.1	2.7	1.3	—	13.8	6.0
HC-I	121.0	(17.8)	28.7	1.6	0.2	19.2	20.7	1.2	22.5	5.9
HC-II	160.4	(23.6)	22.0	4.4	0.2	15.6	24.8	1.9	21.7	9.4
CL	319.2	(46.9)	—	0.2	—	4.5	4.2	6.0	85.0	0.2
Total	679.9	(100)								

^{a)} PS : pectic substance fraction (ammonium oxalate extract). HC-I : hemicellulose I fraction (4% KOH extract). HC-II : hemicellulose II fraction (24% KOH extract). CL : cellulose fraction. ^{b)} From 1.344 g and 1.276 g dry wt water-insoluble dietary fiber of cabbage and bamboo shoots, respectively. ^{c)} U.A. : uronic acid (as galacturonic acid equivalent). Rha : rhamnose. Fuc : fucose. Ara : arabinose. Xyl : xylose. Man : mannose. Glc : glucose. Gal : galactose.

(2) 水不溶性食物繊維のゲル濾過

キャベツ水不溶性食物繊維をゲル濾過剤として、カラムに詰め、種々の標準糖の溶出を調べた (Fig. 1)。この際、標準糖と食物繊維構成多糖類との相互作用を出来るだけ排除するために、0.1 M の塩化ナトリウムを含む50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いた。明らかに平均分子量の大きい [ブルーデキストラン (分子量200万)、デキストランT-500 (平均分子量50万)、T-110 (平均分子量10万)、T-10 (平均分子量1万)、マルトオリゴ糖混合物 (分子量180~2千) そしてグルコース] 順に溶出していることが判る。グルコースの溶出パターンと分子量2千以下のマルトデキストリンの溶出パターンがほぼ同じなので、分子量2千以下のものは分画できないと考えられる。

また、筍水不溶性食物繊維をゲル濾過剤として、同実験を行った結果をまとめたものがFig. 2である。キャベツの場合と同様に分子量2千以下のものは分画できないと思われる。

前回の大根水不溶性食物繊維を用いた実験結果と今回のキャベツと筍を用いた実験結果より、植物性食品由来の水不溶性食物繊維は、それを構成している多糖の種類に関わりなく、分子量約2千以下のものを繊維内に完全にに取り込めるだけの空間をもっており、そして、分子量50万以上のものは完全に排除するが、分子量約2千~50万のものについてはある程度分子ふるいを行える能力を有していると考えられる。

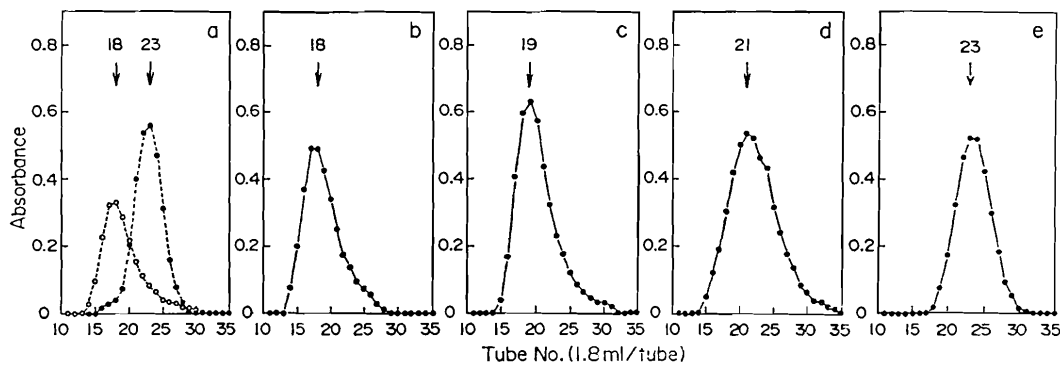


Fig. 1. Chromatography of Blue Dextran, Dextran T-500, T-110 and T-10, and maltodextrins on a column of water-insoluble dietary fiber from cabbage.

A mixture of Blue Dextran and glucose (10 mg each/0.1 ml water) (a), Dextran T-500 (10 mg/0.1 ml water) (b), Dextran T-110 (10 mg/0.1 ml water) (c), Dextran T-10 (10 mg/0.1 ml water) (d) and a mixture of maltodextrins (10 mg/0.1 ml water) (e) were separately subjected to chromatography. The column (1.0×46 cm) was chromatographed in 50 mM Na-acetate buffer pH 5.5 containing 0.1 M NaCl. Carbohydrates were determined by the phenol-sulfuric acid method⁵⁾ (absorbance at 490 nm, —●—). Reducing power (glucose) was measured by the Nelson-Somogyi method^{6,7)} (absorbance at 500 nm, --●--). Absorbance at 360 nm was read for Blue Dextran (--○--). Arrows in figures indicate the elution positions of individual sample.

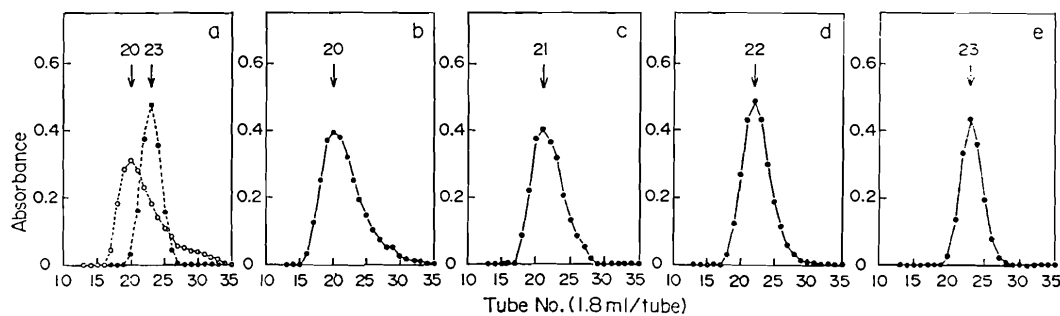


Fig. 2. Chromatography of Blue Dextran, Dextran T-500, T-110 and T-10, and maltodextrins on a column of water-insoluble dietary fiber from bamboo shoots.

A mixture of Blue Dextran and glucose (a), Dextran T-500 (b), Dextran T-110 (c), Dextran T-10 (d) and a mixture of maltodextrins (e) were separately subjected to chromatography in the same manner as described in the legend of Fig. 1.

(3) 水不溶性食物繊維のグルコースの拡散速度に与える影響

水不溶性食物繊維のグルコースの拡散速度に及ぼす影響を調べるため、Fig. 3に示すような装置を用いて、種々の濃度の水不溶性食物繊維存在下でグルコースの透析速度を測定した。透析開始0、30、60、90および120分後における透析膜外溶液中のグルコース量を測定した結果をまとめたものがFig. 4である。大根および筍の両者とも、繊維添加量の増加に伴い外液のグルコース量が少なくなっていることがわかる。即ち、グルコースの拡散速度は繊維量が多くなるほど遅くなることが示された。

構成多糖類が顕著に異なる大根および筍水不溶性食物繊維において、ほぼ同様な結果が得られたことより、この現象は、吸着作用等ではなく、明らかに前述の水不溶性食物繊維の低分子糖（分子量2千以下）を一時的に抱え込む性質に由来すると考えられる。

Fig. 3. An apparatus for determination of glucose diffusion speed under the presence of water-insoluble dietary fiber.

A mixture of glucose and water-insoluble dietary fiber (S) in a seamless cellulose tubing (CT) is dialyzed against 500 ml of distilled water (W) in a beaker (B) under a stirring by a magnetic stirrer (MS). At interval, the outer solution is assayed for glucose content.

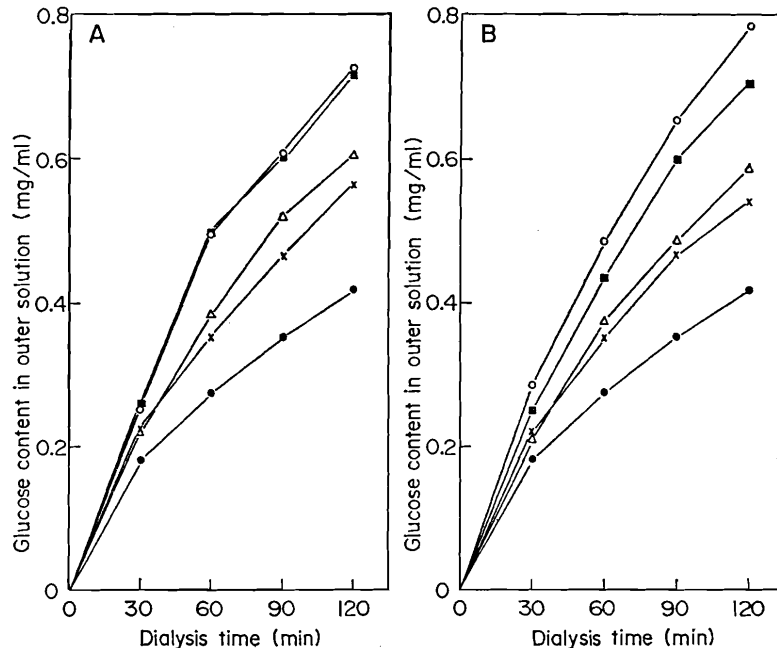
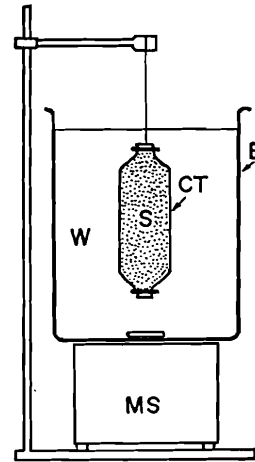


Fig. 4. Influence of water-insoluble dietary fiber on glucose diffusion.

An influence of water-insoluble dietary fiber on glucose diffusion was investigated using an apparatus as shown in Fig. 3. Water-insoluble dietary fiber [0 g (○), 0.5 g (■), 1.0 g (△), 1.5 g (×) and 2.0 g (●)] in 50 ml of 1.5% glucose solution was dialyzed against 500-ml distilled water. At intervals (0, 30, 60, 90 and 120 min), a portion of the outer solution was assayed for glucose content by the phenol-sulfuric acid method.⁵⁾ A: Japanese radish water-insoluble dietary fiber. B: bamboo-shoot water-insoluble dietary fiber.

4. 考 察

今回の実験結果は、われわれが、先に提出した仮説「グルコースやマルトースが多量の水不溶性食物繊維と共存する場合、それら糖の一部は食物繊維の網目の奥深くに入り込み、それだけ消化管との接触が遅れるため、糖単独で存在するときよりもその吸収が緩慢になると推定される。これまで、食物繊維の耐糖性改善効果は、水溶性食物繊維の拡散阻害作用により説明されてきたが、多量の水不溶性食物繊維も、同様な効果を有するものと推定される」¹⁾を、さらに支持するものである。

5. 引用文献

- 1) Kato, Y. and Akiyama, M. : Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi 46, 161 (1993)
- 2) Kato, Y. and Matsuda, K. : Plant Cell Physiol., 17, 1185 (1976)
- 3) Kato, Y., Ito, S. Iki, K. and Matsuda, K. : Plant Cell Physiol., 23, 351 (1982)
- 4) Bitter, T. and Muir, H.M. : Anal. Biochem., 4, 330 (1962)
- 5) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Anal. Chem., 28, 350 (1956)
- 6) Nelson, N.J. : J. Biol. Chem., 153, 375 (1944)
- 7) Somogyi, M. : J. Biol. Chem., 195, 19 (1952)
- 8) Kato, Y., Shiozawa, R., Takeda, S., Ito, S. and Matsuda, K. : Carbohydr. Res., 109, 233 (1982)

第6章 ホホバキシランの構造解析

Isolation and characterization of a glucuronoxylan from jojoba

(*Simmondsia chinensis*) hull

TOSHIYUKI WATANABE (Laboratory of Food Science, Faculty of Education, Fukushima University) and YOJI KATO (Laboratory of Food Science, Faculty of Education, Hirosaki University)

Due to the high content of liquid wax and its industrial utilization, jojoba has drawn much chemical attention. Because of the reason, most research of jojoba has been limited to the area of lipid chemistry except simmondsin. We have been interested in carbohydrate components of jojoba seeds and hulls from the standpoint of utilization as raw material in the exploitation of biomass conversion. In the previous papers^{1,2}, we reported the chemical structure of xyloglucan isolated from jojoba seeds. We have recently found an acidic xylan in jojoba hulls and report its chemical structure in this note.

Polysaccharides were extracted from the defatted hull powder of jojoba successively with hot water, 0.5% ammonium oxalate, 4% potassium hydroxide, and 24% potassium hydroxide³. After dialysis, seven non-cellulosic polysaccharide fractions (PS-I, PS-IIA, PS-IIB, HC-IA, HC-IB, HC-IIA and HC-IIB) were obtained. Neutral sugar composition analysis showed that xylan-like polysaccharides were present in fraction HC-IIA (Table I). Fraction HC-IIA was purified by dissolving it in alkali followed by neutralization with acetic acid. Purified fraction HC-IIA accounts for about 4.1% of the total defatted hull powder of jojoba. Chromatography of purified HC-IIA on a calibrated Sepharose CL-6B column indicated a molecular weight of over 1.0

x 10⁶ by comparison to standard dextrans.

Table 1. Yields and neutral sugar composition of the non-cellulosic polysaccharide fractions obtained from jojoba hulls.

Fraction	Yield* (g)	Neutral sugar composition (mol%)							
		Rha	Fuc	UI*	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-I	51.9	8.0	0.2	4.7	41.6	12.1	2.7	7.0	23.7
PS-IIA	0.5	4.5	1.2	-	32.0	36.0	0.5	8.9	16.9
PS-IIB	2.9	6.2	0.5	-	38.3	41.4	-	2.7	10.9
HC-IA	14.6	1.3	0.3	-	20.3	61.4	-	9.8	6.9
HC-IB	16.3	1.6	-	-	26.5	48.3	2.5	9.8	11.3
HC-IIA	9.3	0.8	-	-	1.8	95.4	-	1.5	0.5
HC-IIB	2.5	6.2	-	-	2.9	36.2	-	37.1	17.6
Total	98.0								

*From 151.0g defatted hull powder. *UI:Unidentified sugar.

Acid hydrolysis of purified HC-IIA and subsequent chromatography on Bio-Gel P-2 of the hydrolyzate yielded neutral (98%) and acidic (2%) sugar fractions. The former was composed of only xylose. The latter was shown by p.c. (method B) to be composed mainly a sugar having $R_{x_{v1}}$ 0.68. The sugar having $R_{x_{v1}}$ 0.68 was considered to be 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose (ref. 4, $R_{x_{v1}}$ 0.69).

Purified HC-IIA was hydrolyzed with 50 mM sulfuric acid, and the hydrolyzate was analyzed by p.c. (method A). The $\log R_f/(1 - R_f)$ of major spots detected on the chromatogram, when plotted against the degree of polymerization, gave a linear regression, suggesting that these sugars belong to a homologous series. The R_f and $R_{x,0}$ values of disaccharide (0.53 and 0.73), trisaccharide (0.29 and 0.40) and tetrasaccharide (0.10 and 0.14) were identical with those of authentic β -(1 \rightarrow 4)-linked xylobiose, xylotriose and xylotetraose.

Purified HC-IIA was hydrolyzed with purified endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylanase from mesophilic fungus strain Y-94^{5,6}. Chromatography on Bio-Gel P-2 of the soluble fraction of the hydrolyzate gave two carbohydrate fractions, EH-I and EH-II in the ratio of 15:85 (Fig. 1). P.c. analysis (method A) of EH-II showed that EH-II consisted of xylose and β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose in the approximate molar ratio of 1.0:2.5 (Fig. 2-A). P.c. analysis (method B) of EH-I showed that EH-I consisted of three kinds of sugars, A, B and C (Fig. 2-B). On acid hydrolysis all of them gave xylose and a sugar having $R_{x,0}$ 0.68 {2-O-(4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose} (Fig. 3).

Purified HC-IIA was methylated⁷ and hydrolyzed and the sugar linkage composition was analyzed by g.l.c. analysis of the resulting alditol acetates⁸. 2,3-Di-O-methyl-xylose (87%) and 2- and/or 3-mono-O-methyl-xylose(13%) were structural units in the methylated, purified HC-IIA.

From above results, we conclude that an acidic xylan obtained from jojoba hulls (purified HC-IIA) has a linear chain of (1 \rightarrow 4)-D-xylosyl residues in the backbone, about 13% of which are branched at O-2 position, with 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid residues.

Most of the xylose residues in HC-IIB are derived from xyloglucan (unpublished data). It is interesting to elucidate whether or not xylose-containing polysaccharides in HC-IA and -IB, which are extracted with 4% potassium hydroxide, are arabinoxylan and/or arabinoglucuronoxylan.

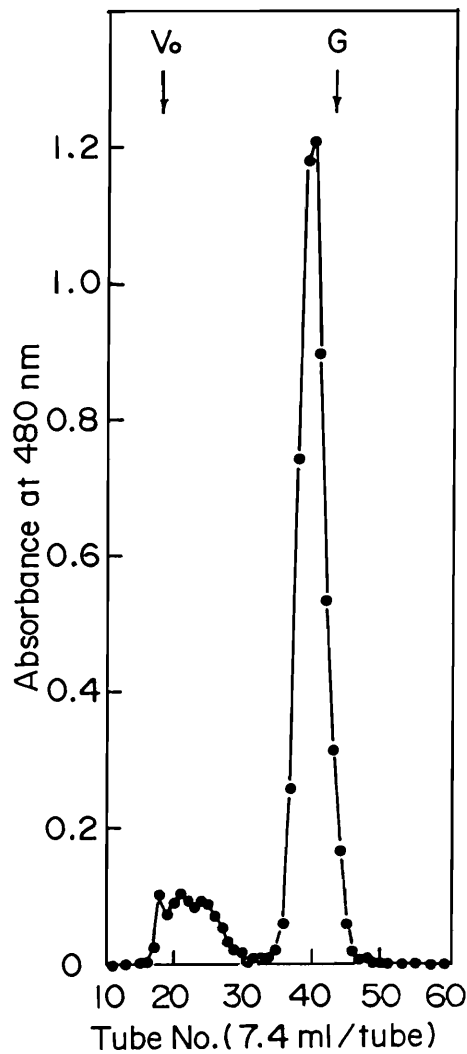


Fig. 1. Resolution of the xylanase hydrolyzate of purified HC-IIA. The enzymic hydrolyzate was chromatographed on Bio-Gel P-2 and two fractions, EH-1 (Tubes 17-30) and EH-2 (35-46) were obtained. Details are described in the text.

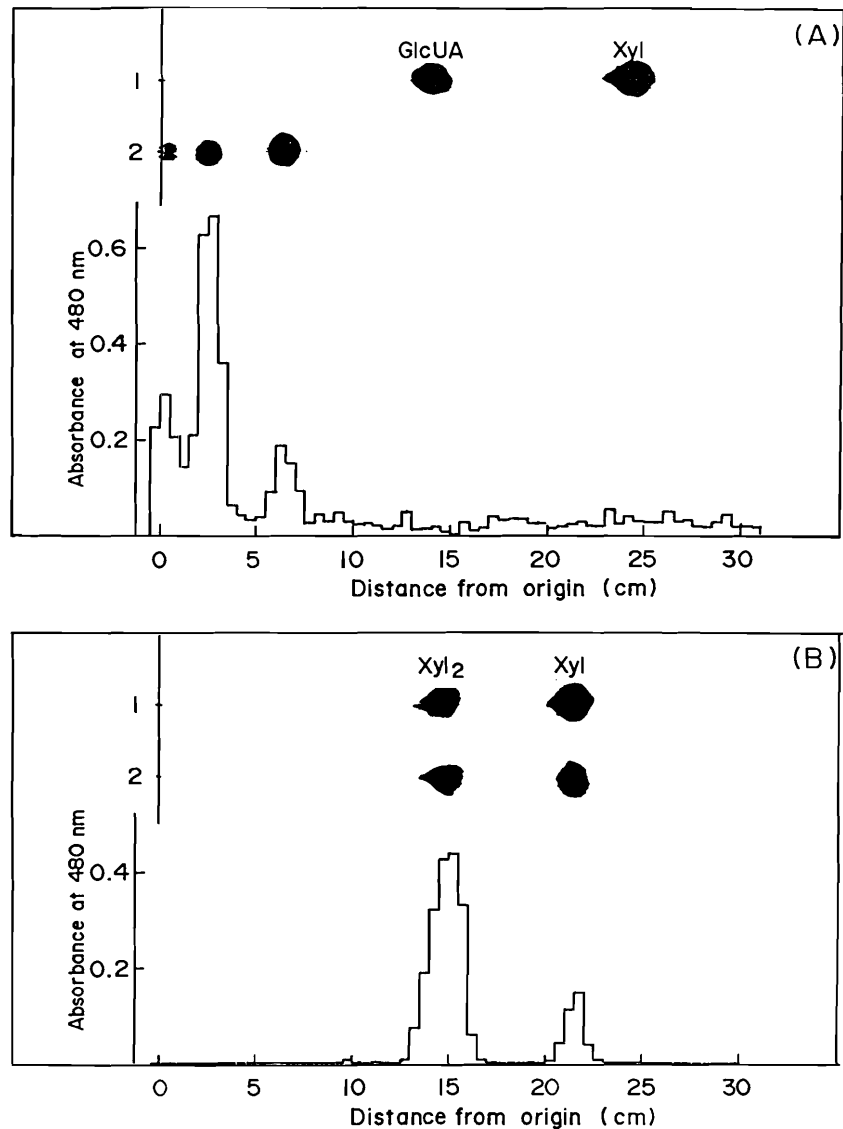


Fig. 2. Paper chromatographic analysis of EH-I (A) and EH-II (B). EH-II (42.4 mg as Xyl equiv.) was subjected to p.c. (method A) and EH-I (7.4 mg as Xyl equiv.) to p.c. (method B). Each filter paper was cut into strips, carbohydrates on the strips were extracted with water, and the carbohydrate content in each solution was determined by the phenol-sulfuric acid method. A guide strip was treated with alkaline silver nitrate: 1, authentic sugars (Xyl: D-xylose, Xyl₂: xylobiose, GlcUA: D-glucuronic acid); 2, samples. Tubes 1-3, 5-8 and 13-16 in Fig. B were separately combined to concentrated to give fractions EH-I-A (475 μ g as Xyl equiv.), -B (1075 μ g) and -C (390 μ g).

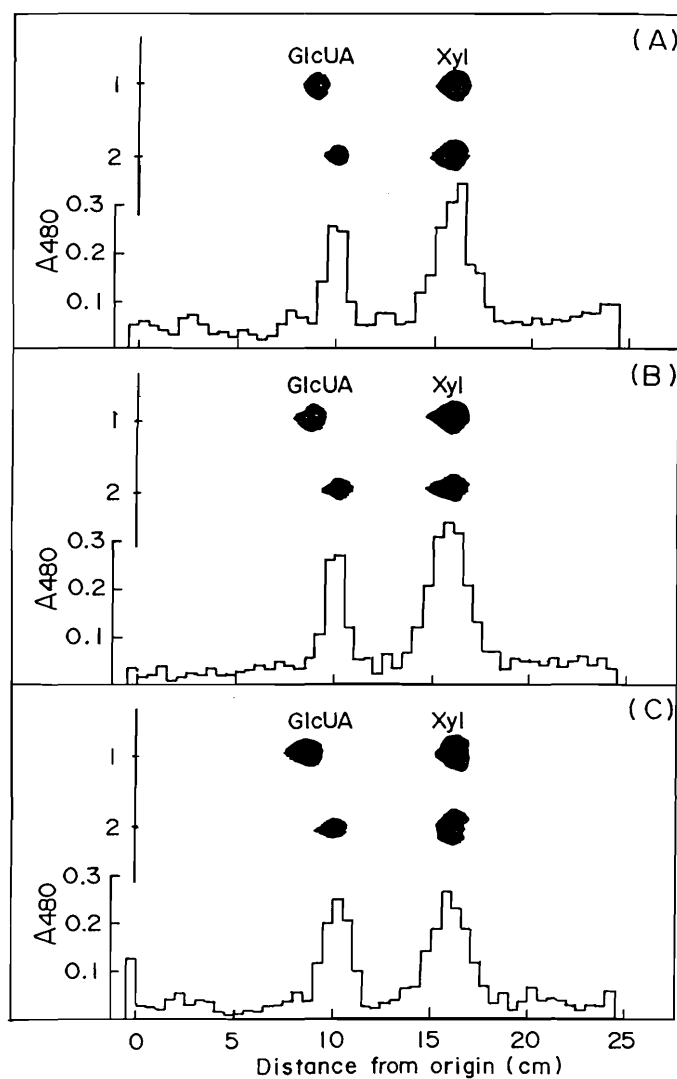


Fig. 3. Paper chromatographic analysis of the acid hydrolyzates of EH-I-A (A), EH-I-B (B) and EH-I-C (C). EH-I-A (200 μ g), -B (200 μ g) and -C (200 μ g) obtained in Fig. 2 were separately hydrolyzed with 1 M TFA at 100° for 2 h, and the hydrolyzates were subjected to p.c. (method B) in the same manner as described in the legend of Fig. 2.

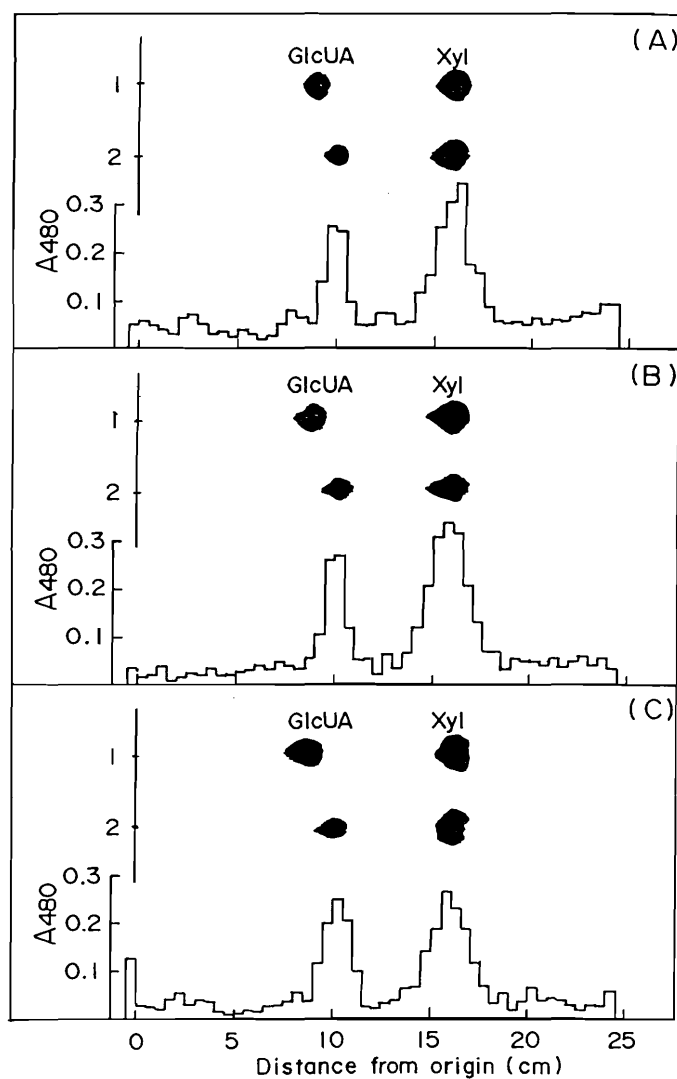


Fig. 3. Paper chromatographic analysis of the acid hydrolyzates of EH-I-A (A), EH-I-B (B) and EH-I-C (C). EH-I-A (200 μ g), -B (200 μ g) and -C (200 μ g) obtained in Fig. 2 were separately hydrolyzed with 1 M TFA at 100° for 2 h, and the hydrolyzates were subjected to p.c. (method B) in the same manner as described in the legend of Fig. 2.

EXPERIMENTAL

General methods. --- Concentration of carbohydrate solutions was performed under reduced pressure at 35-40°. P.c. was performed on Toyo No. 50 filter paper by the multiple ascending method using butanol:pyridine:water (6:4:3,v/v) (method A), or by the descending method using ethyl acetate:water:acetic acid:formic acid (18:4:3:1, v/v) (method B). Sugars on the chromatogram were detected with alkaline silver nitrate⁹. Total carbohydrate and uronic acid were determined by the phenol-H₂SO₄ method¹⁰ and the carbazole-H₂SO₄ method¹¹, respectively. G.l.c. was conducted with a Hitachi G-500 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and operated at a helium flow of 15 ml per min.

Analysis of neutral sugar composition of poly- and oligo-saccharides. --- Polysaccharide (10-50 μ g) were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 5-6 h at 100°. Oligosaccharides (5-10 μ g) were hydrolyzed with 1 M TFA for 4-5 h at 100°. In each case the hydrolyzate was evaporated to dryness. Alditol trifluoroacetates derived from sugars were analyzed by g.l.c. on a column (0.4 x 200 cm) packed with 1.5% QF-1 on Chromosorb W at 140°¹².

Preparation of cell-wall material from jojoba hulls. --- A fruting body of jojoba is composed of a few seeds coated with one layer of outer tissues which is called a hull. It is green during maturation and becomes brown when matured. The brown hulls in a naturally dried state were ground to powder with a ball mill. The hull powder (166.3 g) was extracted with 900 ml benzene-ethanol (2:1) mixture for 8 h at 80-90° to remove lipids. The residual hull powder (water content 4.71%) was used.

Fractionation of the cell-wall polysaccharides. --- The defatted hull powder (151.0 g) was extracted sequentially 8 times with 2 L of water, 10 times with 2 L of 0.5% ammonium oxalate, 8 times with 2 L of 4% potassium hydroxide, and 12 times with 2 L of 24% potassium hydroxide. Water and ammonium oxalate extractions were conducted for 1 h at 120° and alkali extraction for 18-20 h at room temperature under nitrogen. After each extraction, the residue was separated from the supernatant solution by centrifugation. Hot water extract (pectic substances-I fraction, fraction PS-I), ammonium oxalate extract (fraction PS-II), 4% potassium hydroxide extract (hemicellulose-I fraction, fraction HC-I), and 24% potassium hydroxide extract (fraction HC-II) were separately dialyzed and centrifuged. Each soluble product (fraction B) in the supernatant solution was recovered by freeze-drying. Each insoluble product (fraction A) obtained as a precipitate was washed successively with water, ethanol, and acetone, and dried in vacuo.

Purification of fraction HC-IIA. --- Fraction HC-IIA (855.5 mg) was dissolved in 1 M potassium hydroxide (85 ml) and centrifuged to remove insoluble materials. The supernatant was neutralized with acetic acid and the precipitate was recovered by centrifugation. This procedure was repeated four more times. The final precipitate was washed successively with methanol and ether, and dried in vacuo (yield: 570.1 mg).

Chromatography of purified HC-IIA on Sepharose CL-6B. --- Purified HC-IIA (2.2 mg) was dissolved in 0.5 mL of 1 M sodium hydroxide and centrifuged. The supernatant was applied to a column (1.0 x 46 cm) of Sepharose CL-6B equilibrated with 0.1 M sodium hydroxide followed by elution with 0.1 M sodium hydroxide. Fractions of 0.5 mL each were collected and assayed for

carbohydrate.

Acid hydrolysis of purified HC-IIA and analysis of the hydrolyzate.

--- Purified HC-IIA (100.6 mg) was hydrolyzed with 2 mL of TFA for 5 h at 100°. After hydrolysis, TFA was removed by evaporation. The hydrolyzate was dissolved in 1 mL of water and applied to a column (1.8 x 46 cm) of Bio-Gel P-2 equilibrated with water followed by elution with water. Fractions of 2.0 mL each were collected and assayed for carbohydrate. Tubes 21-32 (AH-I) and 44-56 (AH-II) were separately combined and freeze-dried. AH-I was dissolved in 2 mL of water and applied to a column (1.1 x 16 cm) of Amberlite CG-400 (acetate form). The column was first eluted with 20 mL of water and then with a linear gradient produced by mixing 50 mL each of water and 1 M acetic acid, followed by elution with 30 mL of 1 M acetic acid. Fractions of 2 mL each were collected and assayed for carbohydrate. Tubes 44-51 were combined and concentrated. The concentrate was analyzed by p.c. (method B). AH-II was analyzed by p.c. (method A).

Partial hydrolysis of purified HC-IIA and analysis of the hydrolyzate.

--- Purified HC-IIA (10 mg) was hydrolyzed with 1 mL of 50 mM sulfuric acid for 6 h at 100°. The hydrolyzate was made neutral with barium carbonate, filtered, the filtrate treated with Amberlite IR-120 (H⁺) resin to remove barium ions, and then concentrated. Sugars were analyzed by p.c. (method A). β -(1→4)-Linked xylobiose, xylotriose and xylo-tetraose, prepared from the partial hydrolyzate of rice hull¹³ or rice straw xylan were used as the standard sugars.

Xylanase hydrolysis of purified HC-IIA and analysis of the hydrolyzate

--- A xylanase purified from mesophilic fungus strain Y-94^{5,6} was used. Purified HC-IIA (107.5 mg) was dissolved in 20 mL of 1 M sodium hydroxide.

The pH of the solution was adjusted to 4.5 with acetic acid. The resulting solution was incubated with 0.8 mg of the enzyme preparation for 48 h at 40° in the presence of a few drops of toluene. After incubation, the reaction mixture was heated in a boiling water bath for 15 min and centrifuged. The supernatant was applied to a column (4.5 x 22.0 cm) of Bio-Gel P-2 equilibrated with water followed by elution with water. Fractions of 7.4 ml each were collected and assayed for carbohydrate (Fig. 1). Tubes 17-30 and 35-46 were separately combined and concentrated to give fractions EH-I and EH-II. Fractions EH-I and -II were subjected to p.c. analysis (method B for EH-I and method A for EH-II, Fig. 2).

Glycosidic linkage analysis of purified HC-IIA. --- Purified HC-IIA (8.4 mg) in dimethylsulfoxide (0.5 ml) was methylated with methylsulfinyl carbanion (0.2 ml) and methyl iodide (0.4 ml) by the method of Hakomori⁷. After methylating, the reaction mixture was dialyzed against tap water, and the non-dialyzable materials were concentrated to dryness. The methylated HC-IIA was hydrolyzed with 90% formic acid at 100° for 2 h, the acid removed by evaporating, and the residue treated with 1 M TFA at 100° for 4 h. The aqueous TFA was removed by evaporation. The methylated sugars were converted into their corresponding alditol acetates⁸ and then analyzed by g.l.c on a glass capillary column (15 m x 0.25 mm) of DB-225. The column oven temperature was raised linearly from 140° to 200° at a rate of 2°/min.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Y. Mitsuishi of National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology for supplying xylanase.

REFERENCES

- 1 T. Watanabe, K. Takahashi and K. Matsuda, Proceedings of the Third International Conference on Jojoba, Riverside, Calif., 1978, pp. 83-105.
- 2 T. Watanabe, K. Takahashi and K. Matsuda, Agric. Biol. Chem., 44 (1980) 791-797.
- 3 Y. Kato and K. Matsuda, Plant Cell Physiol., 17 (1976) 1185-1198.
- 4 G.O. Aspinall and J.E. McKay, J. Chem. Soc., (1958) 1059-1066.
- 5 Y. Mitsuishi, T. Yamanobe, M. Yagisawa, and Y. Takasaki, Agric. Biol. Chem., 51 (1987) 3207-3213.
- 6 Y. Mitsuishi, T. Yamanobe, and M. Yagisawa, Agric. Biol. Chem., 52 (1988) 921-927.
- 7 S. Hakomori, J. Biochem. (Tokyo), 55 (1964) 205-208.
- 8 B. Lindberg, Methods Enzymol., 28 (1972) 178-195.
- 9 J. Robyt and D. French, Arch. Biochem. Biophys., 100 (1963) 451-467.
- 10 M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, Anal. Chem., 28 (1956) 350-356.
- 11 T. Bitter and H.M. Muir, Anal. Biochem., 4 (1962) 330-334.
- 12 Y. Kato, S. Ito, K. Iki, and K. Matsuda, Plant Cell Physiol., 23 (1982) 351-364.
- 13 T. Watanabe, M. Shida, Y. Furuyama, K. Tsukamoto, T. Nakajima, K. Matsuda, and K. Kainuma, Carbohydr. Res., 123 (1983) 83-95.