

機能性オリゴ糖の開発及びオリゴ糖による黄色ブドウ状球菌の抑制と乳酸菌の増殖効果

蓮井 裕二*・西山 邦隆*

Development of functional Oligosaccharides and Effects of growth inhibition of *staphylococcus aureus* and proliferation of *bifidobacterium longum*

Yuji HASUI*・Kunitaka NISHIYAMA*

Key words : functional Oligosaccharides	機能性オリゴ糖
<i>staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ状球菌
growth inhibition	増殖抑制
<i>bifidobacterium longum</i>	ビフィドバクテリウム ロンガム
Proliferation	増殖

はじめに

これまで知られている主な機能性オリゴ糖には、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラクトビオン、キトサンオリゴ糖などあり、生理的機能性として抗う蝕性、乳酸菌の増殖等^{1)、2)、3)、4)、5)}がある。その中で、牛ミルクオリゴ糖(ラクトビオン)などはグルクナック(GlcNAc)を構成糖とする糖鎖構造に類似した構造を有し、複雑な結合を持ち、極めて多くの構造がある。おそらく、これまでのオリゴ糖とは異なった複雑な生理的機能⁶⁾を持つことが推定される。これ等のオリゴ糖は蛋白に結合した場合は糖鎖ということになるであろうし、単独の場合は機能性オリゴ糖として扱われるであろう。いずれにしても、従来のような糖鎖と機能性オリゴ糖の区分がなくなるのではないかと考えられる。さて、キトサンを除くこれらの糖鎖、オリゴ糖はもともと低分子であり、高分子の切断によるものではない。これまで、高分子の切断によるオリゴ糖の生成はわずかにある⁷⁾のみである。本研究ではこれまで知られていない塩酸処理、超音波処理という2段階処理法により、極めて効率的に多糖類のペクチンからのオリゴ糖を開

発した。オリゴ糖は、黄色ブドウ状球菌の増殖を抑制し、同時に、乳酸菌の増殖を促進した。また、別に開発したジュンサイオリゴ糖は黄色ブドウ状球菌及び乳酸菌の増殖を抑制するという、超音波処理ペクチンオリゴ糖とは異なった生理機能を示した。これ等のオリゴ糖の製造方法及び機能性について報告する。

試験方法

1. ペクチンの塩酸処理及び超音波処理二段処理法によるオリゴ糖の開発⁸⁾

ペクチン0.5%溶液200mlに濃塩酸を加えて0.25%塩酸溶液とし、これをオートクレーブにて121℃、20分間加圧、加熱した。これにアルコールを加えて約70%アルコール沈澱を行い、遠心分離によって得られたオリゴ糖を塩酸処理オリゴ糖とした。この方法は弘前大学農学部宮入らの方⁸⁾に従った。次にこの塩酸処理ペクチンオリゴ糖を国際電気株式会社の超音波処理器25KHzで10時間処理し、その間、経時的に5mlずつサンプリングし、フェノール硫酸法¹⁰⁾、ソモギーネルソン法¹¹⁾によって、全糖量、還元末端糖量を測定し、オリゴ糖の重合度を求めた。オリゴ糖の調製法は図1のとおりである。この超音波処理したオリゴ糖を超音波処理オリゴ糖と呼ぶこと

*東北女子大学

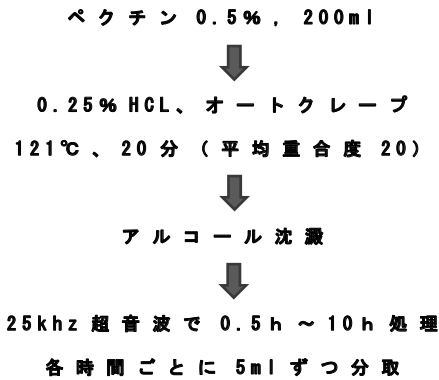


図1 機能性ペクチンオリゴ糖の調製

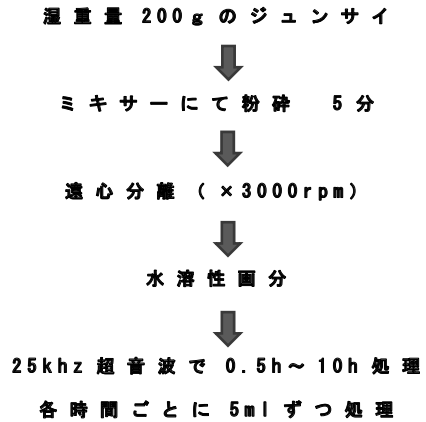


図2 機能性ジュンサイオリゴ糖の調製

にした。

2. ジュンサイ多糖の超音波処理によるオリゴ糖の開発

湿重量 200g のジュンサイを 200ml の蒸留水に加え、ミキサーにて 5 分間粉碎し、3000rpm で 10 分間遠心分離後、上澄み液を超音波処理器 25Khz で 10 時間処理した。その間、経時的に 5ml ずつサンプリングし、同じく全糖量、還元末端量を測定しオリゴ糖の重合度を求めた。オリゴ糖の調製法は図 2 の通りである。

3. 多糖類の超音波処理

多糖類はアラビアガム（白樺の樹液）、アルギン酸 Na（海草類の粘液）、ペクチン（リンゴ、かんきつ類の水溶性食物繊維）、難消化性デキストリン（人工食物繊維）の 0.5% 水溶液について、10 時間超音波処理を行い、経時的に 5ml サンプリングし、還元糖量を測定し、多糖構造の低分子化の試験を行った。

4. 全糖及び還元糖の定量⁹⁾

a. フェノール硫酸法による全糖量の定量

i. 超音波処理で経時的にサンプリングしたペクチンオリゴ糖 0.5% 溶液を 2 倍希釈し、これより、0.1ml とり、1.9ml の水に加えた。これ

に 80% フェノールを 0.05ml 加え、濃硫酸を定法に従って添加し、OD₄₉₀ で測定して検量線より値を求めた。

ii. ジュンサイオリゴ糖は超音波処理により経時的にサンプリングしたオリゴ糖 0.5% 溶液を 2 倍希釈し、ペクチンオリゴ糖の定量と同様に全糖量を求めた。

b. ソモギーネルソン法による還元糖の定量⁹⁾

i. ペクチンオリゴ糖の還元末端の定量

超音波処理により経時的にサンプリングしたペクチンオリゴ糖 0.5% 溶液を 2 倍希釈し、1ml を試料溶液とし、定法に従い、還元糖と銅試薬を沸騰水中で 10 分間反応させ、ネルソン試薬添加してから OD₅₀₀ で吸光度を測定し、検量線より値を求めた。

ii. ジュンサイオリゴ糖の還元末端の定量

超音波処理で経時的にサンプリングしたジュンサイオリゴ糖 0.5% 溶液を 2 倍希釈し、1ml を試料溶液とし、ペクチンオリゴ糖の場合と同様に定法に従って還元糖量を求めた。

5. 超音波処理多糖のエタノール沈澱におけるゲルの形状

多糖溶液は 0.5% の溶液 5ml にエタノールを加えて 70% として沈澱ゲルの形状を観察した。

表1 超音波処理ペクチンオリゴ糖の全糖、還元糖の変化

時間	0	1	2	4	6	8
OD ₄₈₀	1.32	1.32	1.31	1.34	1.32	1.33
全糖(mg)	5130	-	-	-	5130	-
OD ₅₀₀	0.13	0.13	0.14	0.16	0.40	0.35
還元糖(mg)	183.2	183.2	-	-	523.5	-
平均重合度	28	-	-	-	9.8	-

6. 超音波処理ペクチンオリゴ糖の黄色ブドウ球菌増殖抑制

黄色ブドウ球菌 (*staphylococcus aureus*) 培地は 7.5% 食塩添加した卵黄加マンニット食塩寒天培地 (栄研化学株式会社) を使用した。培地には、0.5% 超音波処理ペクチンオリゴ糖の殺菌溶液を用いて、各希釈溶液 ($\times 10$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^5$) を作成し、それぞれ 1ml ずつ 20ml の培地に加えて冷却し、雑菌が生えないことを確認してからこれ等に黄色ブドウ球菌 (*staphylococcus aureus*) をコンラージ棒で塗布した。38℃で 48 時間培養し、黄色いコロニーの量及び培地中のフェノールレッド指示薬の赤色から黄色への変化により、黄色ブドウ球菌の増殖を確認した。

7. 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の黄色ブドウ球菌の増殖抑制

湿重量 200g のジュンサイを 200ml の蒸留水に加え、ミキサーにて 5 分間粉碎し、3000rpm で 10 分間遠心分離後、上澄み液を超音波処理器 25Khz で 10 時間処理した。これを 100℃で 20 分間加熱殺菌して原液とした。これを用いてジュンサイオリゴ糖の各希釈溶液 ($\times 10$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^5$) を作成した。それぞれ 1ml ずつ 20ml の培地に加えて冷却し、雑菌が生えてこないことを確認してから黄色ブドウ球菌 (*staphylococcus aureus*) をコンラージ棒で塗布した。38℃で 48 時間培養し、超音波処理ペクチンオリゴ糖の場合と同じようにシャーレの観察をおこなって判定した。

8. 超音波処理ペクチンオリゴ糖の乳酸菌増殖効果

乳酸菌は明治フードマテリア製のビフィドバクテリウム ロンガムを使用し、培地はビフィドバクテリウム ロンガムに選択性のある LBS 培地を使用した。培地はオートクレーブにより 121℃で 15 分間加圧滅菌し、これに超音波処理、殺菌ペクチンオリゴ糖溶液を用いて作成した、各希釈溶液 ($\times 10$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^5$) を 1ml ずつ 20ml の培地に添加し、50℃に冷却してから、ビフィドバクテリウム ロンガム (0.2g/100ml 滅菌水) を 2ml 加え、38℃で 48 時間培養した。培地が乳酸菌代謝物により、紫色から黄色に変化すること及びコロニーの量でオリゴ糖無添加培地と比較して乳酸菌の増加の有無を判定した。

9. 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の乳酸菌抑制

培養方法は超音波処理ペクチンオリゴ糖の場合と同じ方法で行った。オリゴ糖は超音波処理ジュンサイオリゴ糖を使用し、乳酸菌はビフィドバクテリウム ロンガムを使用して乳酸菌の増殖について試験した。

結 果

1. ペクチンの塩酸処理及び超音波処理二段処理法によるオリゴ糖の開発

結果は表 1、図 3 のようである。1 時間の超音波処理から徐々に低分子化が進み、6 時間から 8 時間で低分子化は急速に進んだ。しかし、8 時間後それ以上の低分子化は進まなかった。塩酸処理

表2 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の全糖、還元糖の変化

時間	0	1	2	4	6	8
OD ₄₈₀	0.91	0.93	0.91	0.91	0.90	0.91
全糖 (mg)	3208	-	-	3208	-	-
OD ₅₀₀	0.07	0.13	0.14	0.15	0.15	0.15
還元糖 (mg)	58	-	-	180	-	-
平均 重合度	55.3	-	-	18	-	-

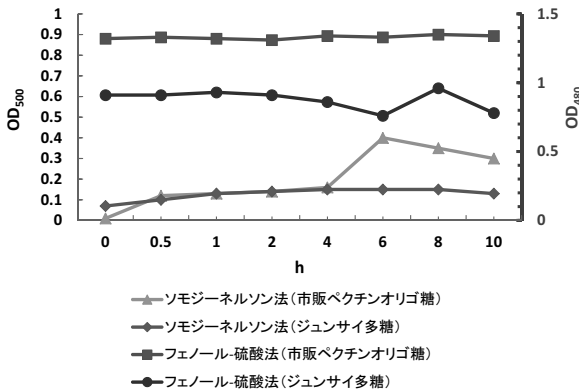


図3 ペクチンオリゴ糖及びジュンサイオリゴ糖の超音波処理における全糖、還元糖の変化

左縦軸はソモギーネルソン法による還元糖の測定
右縦軸はフェノール硫酸法による全糖量の測定

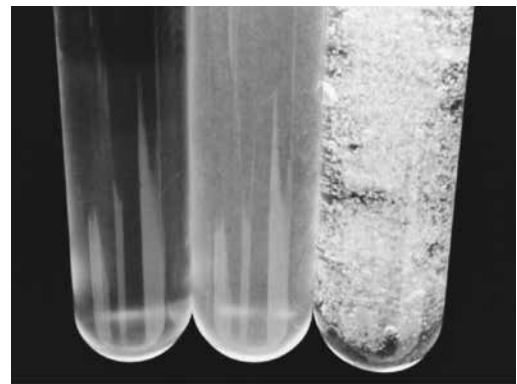


図4 ペクチンの塩酸処理、超音波処理による低分子化（アルコール沈澱法）

ペクチンオリゴ糖の平均重合度は29であることが明らかになった。また、超音波処理6時間後の平均重合度は9.8になり、塩酸処理オリゴ糖に比べ超音波処理オリゴ糖は初めの約1/3に低分子化した。ペクチン、塩酸処理ペクチンオリゴ糖、塩酸処理超音波処理二段処理ペクチンオリゴ糖のアルコール沈澱の形状は図4のようである。ペクチンからオリゴ糖の低分子化が進むにつれて、アルコールの透明性が大きくなった。すなわち、低分子化が可視化できた。

2. ジュンサイ多糖の超音波処理によるオリゴ糖の開発

ジュンサイ多糖は塩酸処理を行わず、直接超音波処理を試みた。ジュンサイ多糖は塩酸処理ペク

チンオリゴ糖とは異なり、超音波処理を始めた直後から低分子化が進み、4時間後で、吸光度は最大になり、以降は更なる低分子化は起こらなかった。結果は表2、図3のようになった。超音波処理前の平均重合度55.3となり、処理4時間後の平均重合度は18となった。ペクチンオリゴ糖の場合と同じように、処理前と処理後では分子量は1/3に低分子化していた。

3. 多糖類の超音波処理

アラビアガム、アルギン酸Na、ペクチン、難消化性デキストリンの0.5%水溶液について、10時間超音波処理を行い、経時的に5mlサンプリングし、全糖量、還元末端量を測定し、直接超音波処理により多糖の低分子化が起こりえるかにつ

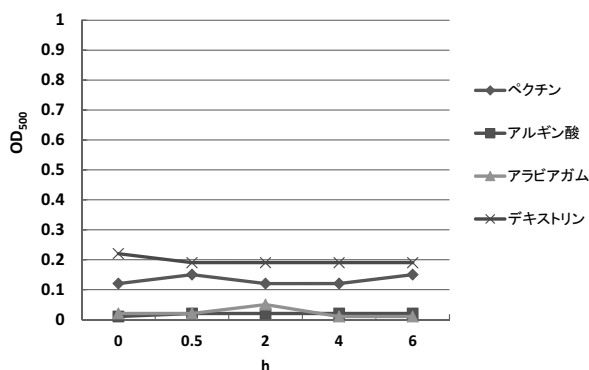


図5 多糖類の超音波処理のみにおける還元糖の変化
左縦軸はソモギーネルソン法による還元糖の測定

多糖類	エタノール沈殿	超音波処理
アラビアガム	-	-
ペクチン	+++	++
アルギン酸	+++	++
デキストリン	-	-
ペクチンオリゴ糖	++	-
ジュンサイ多糖	+++	-

図6 多糖類の超音波処理前と処理後のアルコール沈殿の変化

各多糖は0.5%、3mlにアルコールを加えて70%として観察

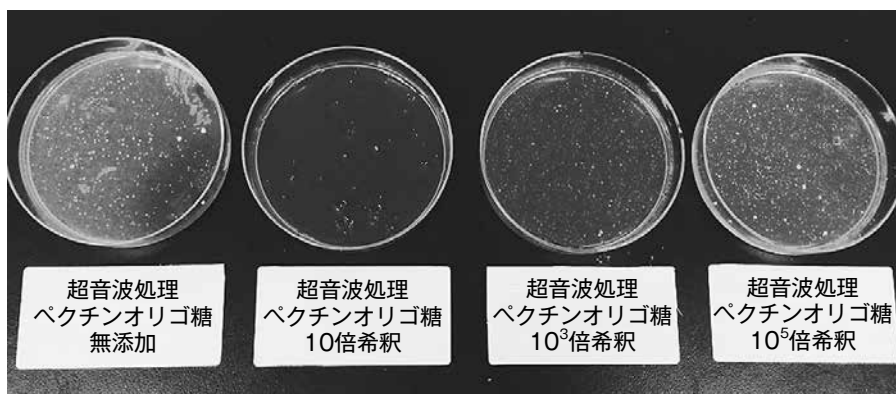


図7 超音波処理ペクチンオリゴ糖の黄色ブドウ状球菌の増殖抑制
培地はMSEY培地を使用し、シャーレに20ml添加し、オリゴ糖は各濃度を1ml添加

いて試験を行った。結果は図5のようにOD₅₀₀は0.01から0.02の値を示し、還元末端の増加はおこらなかった。塩酸処理ペクチンオリゴ糖及びジュンサイ多糖の超音波処理の図3の結果と比較して、ジュンサイ多糖を除く多糖は塩酸処理等の全処理を実施しなければ超音波処理のみでは多糖の低分子化は起こらないことが明らかになった。各多糖の全糖量はオリゴ糖と同じ区約5000mgの値を示した。

4. 超音波処理多糖のエタノール沈殿におけるゲルの形状

ペクチン、アルギン酸の経時的サンプリング溶

液における還元糖の増加は見られなかったが、超音波処理前と後ではエタノール沈殿形状に変化が見られた。ペクチン、アルギン酸の内部の水素結合、疎水結合等が切れていることが推定された。図6のようである。多糖類の中で唯一、超音波処理のみで低分子化が起こったのはジュンサイオリゴ糖である。このオリゴ糖は粘性においてアラビアガムと類似性を示すが、三次元の構造が全く異なっていることが推定された。

5. 超音波処理ペクチンオリゴ糖の黄色ブドウ状球菌増殖抑制

黄色ブドウ状球菌 (*staphylococcus aureus*) は

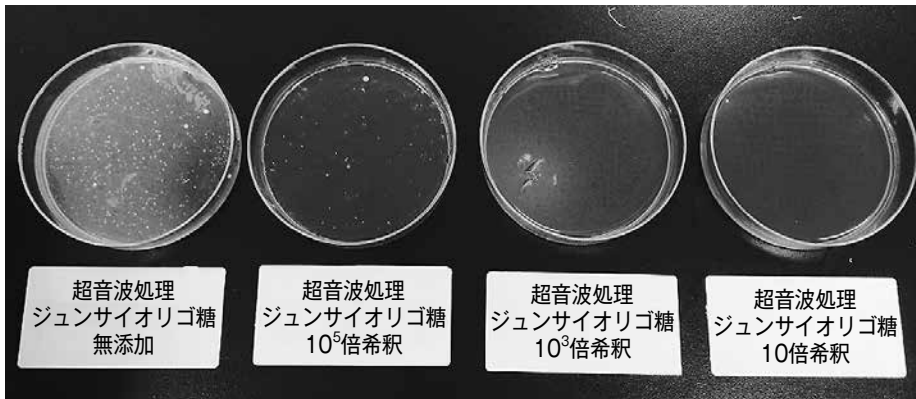


図8 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の黄色ブドウ球菌の増殖抑制

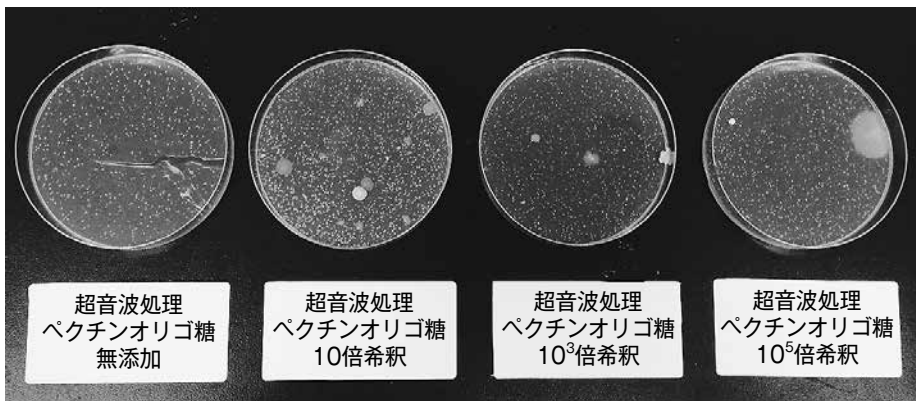


図9 超音波処理ペクチンオリゴ糖の乳酸菌の増殖効果

乳酸菌はビフィドバクテリウム ロンガムを使用し、培地はLBS培地を使用。38℃で48時間培養。

図7のように、培地に二段処理ペクチンオリゴ糖を添加することで菌の増殖を抑制できたが、カビ等の真菌に対して効果はあまりないようが見られた。オリゴ糖を $\times 10^3$ から $\times 10^5$ 倍と希釈してシャーレに添加することで、培地の指示薬フェノールレッドは赤色からややオレンジがかり、黄色ブドウ球菌がわずかに増殖するのが観察された。また、塩酸処理オリゴ糖と二段処理オリゴ糖とでは黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制作用は、二段処理オリゴ糖のほうが抑制作用は強かった。これは二段処理オリゴ糖の重合度が10前後であることが抗菌作用を強くしていることと関係があることが推定される。

6. 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の黄色ブドウ球菌の増殖抑制

超音波処理ペクチンオリゴ糖の場合と同じようにシャーレの観察をおこなって判定した。ペクチンオリゴ糖のように希釈してもシャーレには黄色ブドウ球菌は生えてこなかった。ペクチンオリゴ糖とジュンサイオリゴ糖とでは菌に対する作用の違いがあるように見えるが、現段階では不明である。図8の通りである。

7. 超音波処理ペクチンオリゴ糖の乳酸菌増殖効果

図9ように10倍希釈ではオリゴ糖無添加培地に比べて乳酸菌の増殖効果は2倍程度増殖してい

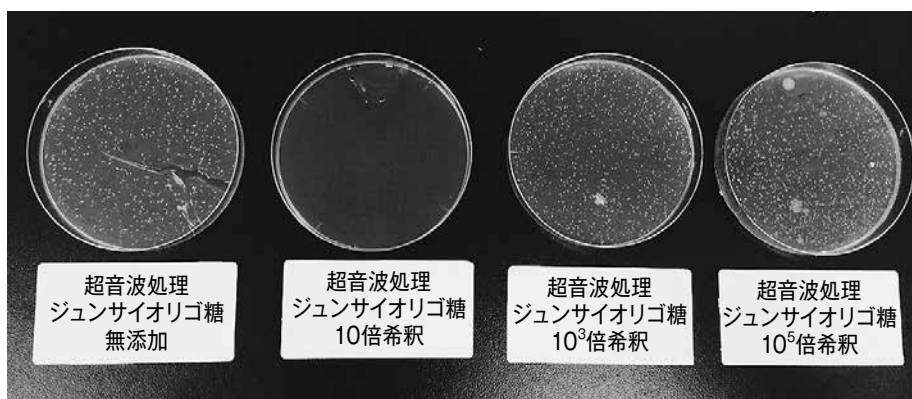


図10 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の乳酸菌の増殖抑制

た。希釈倍率を $\times 10^3$ から $\times 10^5$ にして添加するとだんだんオリゴ糖無添加培地と同じような状態になった。

8. 超音波処理ジュンサイオリゴ糖の乳酸菌抑制

図10のように $\times 10$ 倍希釈ジュンサイオリゴ糖添加シャーレでは乳酸菌は全く生えてこなかった。

希釈倍率を $\times 10^3$ から $\times 10^5$ にして添加するとだんだんオリゴ糖無添加培地と同じような状態になった。このことは、ペクチンオリゴ糖と比較して、構成糖が異なることに起因していることが推定される。したがって機能性オリゴ糖は構成糖及び糖の重合度、結合様式によって様々な機能性を持つことが示唆される。

考 察

これまで、多糖類からのオリゴ糖の生成に関する論文はほとんど報告されていない。酵素法による高分子の低分子化では分子が2から3程度の重合度のオリゴ糖が生成され、これらは全く機能性を持たない。今回、多くの多糖類は塩酸処理等の前処理を行わなければ、超音波処理を行っても多糖の低分子化は起こらないことが明らかになった。塩酸処理、超音波処理により、オリゴ糖の重合度は28から約10へと低分子化し、8時間以降はこれ以上の低分子化は起こらなかった。超音波処理ジュンサイオリゴ糖は1時間後から低分子化

が進み、4時間後には重合度は55.3から18へと低分子化が進み、還元糖の増加量は最大に達し、それ以降、変化はなかった。ペクチンオリゴ糖の低分子化が始まるまでに2時間要し、ジュンサイオリゴ糖の場合は超音波処理30分より低分子化は進んだ。このような変化の違いはペクチンとジュンサイ多糖の内部構造の水素結合数の違い等によることが推測される。つまり、高分子の低分子化は最初に分子構造の内部の弱い部分から切断が行われ、最後に低分子化につながるグリコシッド結合の切断が行われたのではないだろうか。この二段処理法はさまざまな機能性を持つオリゴ糖をデザインするうえで重要なことと考える。これ等のオリゴ糖は黄色ブドウ状球菌の増殖を抑制するという点では共通していたが、乳酸菌の増殖については全く異なる生理作用を示した。超音波処理ペクチンオリゴ糖はビフィドバクテリウム ロンガムというヒト腸内乳酸菌の働きを極めて強く活性化した。腸内環境を整えるうえでプロバイオテックスとしての応用が可能である。一方、ジュンサイオリゴ糖は黄色ブドウ状球菌や乳酸菌を死滅させているように観察されることから、超音波処理ペクチンオリゴ糖とは異なる殺菌作用を有することが考えられる。また、今回の実験で、超音波処理ペクチンオリゴ糖はカビに対する殺菌作用及び増殖抑制作用は見られなかった。このことから、真核生物と原核生物の構造的違いが推定され

る。真核生物（カビを含む）は核膜が存在し、原核生物（細菌類を含む）には存在していない。真核生物は今回の機能性オリゴ糖に対して核膜によって、機能性オリゴ糖の作用から保護されている可能性が推定される。70% 消毒用アルコールにこの機能性オリゴ糖を 05% 添加してシャーレに培養したカビ（*Aspergillus*）に 2ml 添加したところカビは死滅した。今後消毒用アルコールに機能性オリゴ糖混合することにより、新たな手指の除菌剤が開発されることが想定される。

文 献

1. 藤巻正生（1988）食品機能. 学会出版センター p290~293
2. 清水俊雄. 志村二三夫. 篠塚和正（2004）機能性食品素材便覧. 薬事日報社 p208~213
3. 伊藤弘一. 藤田博. 他（2000）天然保存料ペクチン分解物に関する衛生科学的研究. 東京衛研年報 51. 197-202
4. 小田達也. 上野幹憲（2014）海藻類由来多糖体の多彩な生物活性. 化学と生物 p202~204
5. 炎症性腸疾患の治療－プロバイオテックスとプレバイオテックス. 臨床消化器内科 VOL.18(1). 101-109
6. 村上洋. 桐生高明. 木曾太郎. 中野博文（2011）高水溶性カルシウム塩「ラクトビオン酸カルシウム」5. 光山慶一. 松本敏（2003）腸内細菌を標的とした開発. 化学と生物. VOL.49 NO6
7. 宮入一夫（2005）リンゴ搾汁残渣からのペクチンオリゴ糖の簡易製造法とその性状. 第6回八戸高専と弘前大学とのシーズ提案会
8. 市田淳治. 山口信哉. 花松憲光. 松江一（1990）微生物酵素による生理活性オリゴ糖の調製. 日本食品工業学会第37回講演要旨集 p73
9. 福井作蔵（1990）還元糖の定量法（第二版）学会出版センター