

ダイコンの多糖抽出条件の検討

梅谷 華奈, 井上 竜一

Examination of Methods for the Extraction of Polysaccharides from Japanese Radish

Kana Umetani and Ryuichi Inoue

Texture is an important factor in food palatability. Cellulose, hemicellulose, and pectin contribute to the texture of fruits and vegetables. These complex compounds are bound to each other, and several unknown factors are responsible for the hardness of fruits and vegetables. Japanese radish, a root vegetable, is softened by polygalacturonase treatment, thus implying that pectin contributes to the hardness of this vegetable. Our attempts to extract polysaccharides from Japanese radish by procedures that are similar to those utilized for other root vegetables resulted in incomplete extraction of the total polysaccharide content. Consequently, extraction by conventional methods was followed by endo-Polygalacturonase (PGase) treatment, which suggested the non-extraction of rhamnogalacturonan-II when using the conventional methods. The polysaccharide content of Japanese radish therefore can be extracted in a stepwise manner with water, chelating agents, hydrochloric acid, PGase, sodium carbonate, and potassium hydroxide.

Keywords: vegetables, root vegetables, Japanese radish, extraction, pectin

I 目的

テクスチャーは食品のおいしさを決定する要素の1つである。そのため、古くからテクスチャーに関する多くの研究・開発がなされてきた。近年、外観はそのままに「舌でつぶせる」相当まで軟化させた介護食品が開発され、今後も介護食品市場の拡大が見込まれることから、テクスチャー制御技術に対するニーズが高まっている。

肉や魚のテクスチャーに関与する成分は主にタンパク質であり、比較的単純であるが、野菜や果実のテクスチャーに関与するとされているセルロース、ヘミセルロース、ペクチンは互いに結合しているため、複雑な構造となり、未知な部分が多い。

本報告では根菜類であるダイコンの硬さへのペクチンの関与を調べるための前段階として、ダイコンのペクチン抽出方法について検討した。

II 実験材料および方法

1 実験材料

食材は市販の青首ダイコンを用いた。ダイコンは剥皮後、1cm角にカットし、凍結乾燥粉末化したものを用いた。

未抽出多糖の調査用酵素として、各種多糖を単糖化するPectinex Ultra 酵素液 (Novozymes 製)、ペクチンの主鎖であるホモガラクトツロナン (HG) を分解する endo-

Polygalacturonanase M2 (*A. aculeatus* 由来, PGase, Megazyme 製) を用いた。抽出した画分中の含有多糖調査用酵素として、ペクチンの側鎖であるガラクトンを分解する endo-1,4- β -Galactanase (*C. thermocellum* 由来, GNase, Megazyme 製)、末端のガラクトースを分解する β -Galactosidase (*A. niger* 由来, GDase, Megazyme 製) を用いた。

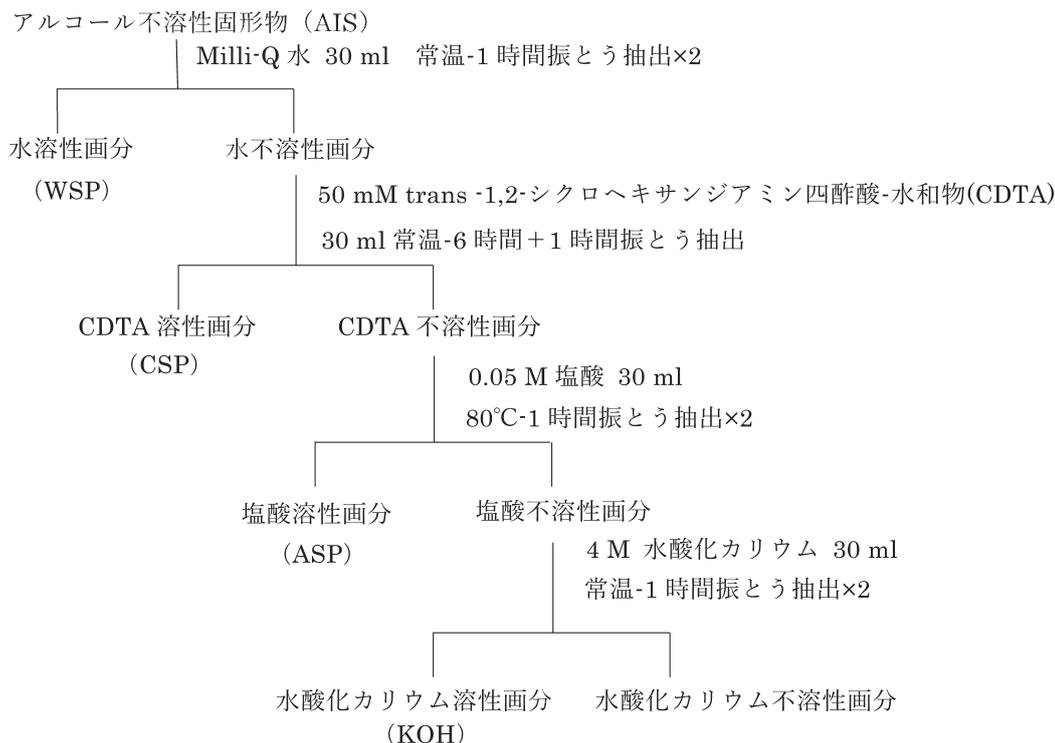
2 アルコール不溶性固形物 (AIS) 調製

凍結乾燥粉末 0.3 g にエタノール 30 ml を添加し、常温で 1 時間振とう後、残渣を回収した。この操作を 2 回繰り返し、残渣を室温で乾燥させ、AIS を得た。

3 多糖の抽出

AIS からの多糖の抽出は既報の根菜類からの多糖抽出方法¹⁾を参考に、以下の Scheme 1 を基本条件として用い、一部変更して行った。KOH 溶性画分は抽出後にクエン酸で中和した。水溶性画分は透析を行わずに、他の溶性画分は超純水 (Milli-Q 水) で透析を行った後、減圧濃縮した。濃縮物は Milli-Q 水で 5 ml にメスアップを行った。

残存多糖の有無の調査として、塩酸不溶性画分に 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 30 ml, 2 倍希釈した Pectinex Ultra 酵素液 1 ml を添加し、40 °C -24 時間静置抽出を行った。



Scheme 1. 多糖の分画

未抽出多糖の調査として、塩酸不溶性画分に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 100 ml, PGase 200 U を添加し、40 °C -24 時間静置抽出を行った。PGase 抽出後の残存多糖の調査として、PGase 不溶性画分に 0.05 M 炭酸ナトリウム 30 ml を添加し、常温 -2 時間振とう抽出した。この操作を 2 回行い、炭酸ナトリウム溶性画分を回収した。その後、炭酸ナトリウム不溶性画分に Scheme1. と同様に水酸化カリウム抽出を行った。得られた Pectinex Ultra 画分と PGase 画分は透析を行わずに、炭酸ナトリウム溶性画分は Milli-Q 水で透析を行った後、減圧濃縮した。濃縮物は Milli-Q 水で 5 ml にメスアップを行った。

4 酵素を用いたガラクトース含有多糖の構造調査

PGase 抽出画分 150 μ l に 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 50 μ l, GNase または GDase 50 μ l を添加し、40 °C -24 時間反応を行った。併用処理の場合、酵素をそれぞれ 50 μ l ずつ添加した。反応後のサンプルは糖組成分析に供した。

5 多糖の糖組成分析

5-1 前処理

5-1-1 単糖化処理

分画した多糖溶液 150 μ l に 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 50 μ l, 2 倍希釈した Pectinex Ultra 酵素液 50 μ l を混合し、40 °C -24 時間反応させて単糖化した。沸騰水中で 3 分間加熱することで酵素反応を停止させ、糖組成分析用サンプルとした。

5-1-2 誘導体化

サンプルに内部標準として 1 μ g の 2-デオキシグルコースを添加した後、GlyScope ABEE Labeling Kit (J-オイルミルズ製) を用いて 4-アミノ安息香酸エチルエステル (ABEE) 誘導体化した。

5-2 HPLC 分析

蛍光検出器 Agilent 1260 infinity FLD spectra (Agilent Technologies 製) が接続された Agilent 1260 infinity (Agilent Technologies 製) で分析を行った。カラムは Xbridge C18 (4.6 \times 150 mm, ϕ 5 μ m, Waters 製) を用い、0.2 M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.9) とアセトニトリルを 93 : 7 で混合した移動層を流速 1 ml/min で送液した。オープン温度は 40 °C, 注入量は 5 μ l とし、蛍光検出 (励起波長 305 nm, 検出波長 360 nm) により、各種糖濃度を測定した。

Ⅲ 結果と考察

1 既存法で抽出した残渣における残存多糖の調査

ペクチンはホモガラクトツロナン (HG) とラムノガラクトツロナンI, II (RG-I, II) から構成され, HG が大半を占める. HG はガラクトツロン酸 (GalA) を主とした直鎖状多糖である. 一部のカルボキシル基がメチルエステル化しており, メチルエステル化していないカルボキシル基間をカルシウムイオンなどの金属イオンが架橋している. RG-I はラムノース (Rha) とガラクトツロン酸 (GalA) が交互に結合した主鎖にアラビノース (Ara) からなるアラビナン, ガラクトース (Gal) からなるガラクトナンなどの側鎖が結合している. RG-II はガラクトツロン酸オリゴ糖主鎖に4つの側鎖が結合しており, 複雑な構造領域をもつ.

従来の根菜類の多糖抽出方法¹⁾では塩酸まででペクチンを, 水酸化カリウムでヘミセルロースを抽出できると考えられるため, 水酸化カリウムまで段階的に抽出した. また, 塩酸まで段階的に抽出を行った後, 残存しているペクチンの有無を調べるため, 各種多糖を単糖化する酵素である Pectinex Ultra 酵素液で抽出し, 糖組成を調べた (表1). Pectinex Ultra で抽出された糖のうち, 水酸化カリウム抽出由来の糖を差し引いても, Ara 以外のペクチンを構成する糖が抽出されたことから, 塩酸抽出後も HG, ガラクトナンを側鎖にもつ RG-I や RG-II が残存していることが考えられた. 水酸化カリウムまで抽出を行ったサンプルの CSP の Rha 量が多いが, 複数回測定を行った中でも同様の結果は得られなかったため, 夾雑物が検出されてしまった可能性がある.

表1 Pectinex Ultra 抽出された多糖の構成糖

単位: mg/g DW

	水酸化カリウム抽出				Pectinex Ultra 抽出			
	GalA	Gal	Ara	Rha	GalA	Gal	Ara	Rha
WSP	1.09	4.21	0.61	-	0.91	2.78	0.49	tr
CSP	19.41	1.20	0.49	3.47	21.37	2.06	0.72	0.09
ASP	3.94	2.27	1.40	0.22	2.55	2.09	0.64	0.34
KOH	0.78	-	tr	-				
Pectinex Ultra					11.15	8.38	tr	0.43
Total	25.22	7.68	2.50	3.69	35.98	15.31	1.86	0.87

WSP:水溶性画分 CSP:キレート剤溶性画分 ASP:塩酸溶性画分

KOH:水酸化カリウム溶性画分

2 未抽出多糖の調査

未抽出多糖の存在が示唆されたため, 多糖分解酵素を用い, 抽出できていない多糖の種類を調べた. RG-II の抽出工程で PGase 処理が行われることもある²⁾ことから, 酸まで段階的に抽出を行った後, PGase で抽出し, 各画

分の糖組成を調べた結果 (表2), PGase 処理で GalA, Gal, Rha が抽出された. GalA や Gal, Rha を構成糖とするペクチンとして RG-I や RG-II があり, HG を分解することでこれら多糖が抽出されたと考えられた.

表2 PGase 抽出された多糖の構成糖

単位: mg/g DW

	GalA	Gal	Ara	Rha
WSP	1.12	2.97	0.51	tr
CSP	21.17	2.12	0.42	0.01
ASP	3.77	1.89	0.79	0.16
PGase	5.93	1.91	tr	0.28
Total	31.99	8.89	1.72	0.45

WSP:水溶性画分 CSP:キレート剤溶性画分 ASP:塩酸溶性画分

PGase には側鎖をもつホモガラクトツロナン部が立体構造的に分解できないものも存在する. その場合, PGase 画分には未分解の RG-II が含まれている可能性が考えられた. そこで, 同様に抽出した PGase 画分で糖組成分析時の単糖化処理の有無で糖組成が変化するかを調べた (表3). つまり, 単糖化して検出された糖量から, 単糖化せず PGase のみで分解された糖量を引くことで, PGase では分解でき

ない多糖の糖量が分かるということになる. 測定の結果, 単糖化処理を行った場合は, GalA や Gal, Rha が検出されたが, 単糖化処理を行わなかった場合は, GalA 以外の単糖は検出されなかった. 少量の RG-I が含まれている可能性はあるが, 単糖化処理した糖量から未処理の糖量を引いた未分解多糖の GalA 量に対して Rha の検出量が少ないため, 大部分は RG-II であることが示唆された.

表3 単糖化処理の有無による PGase 画分の各種糖量
単位: mg/g DW

単糖化	GalA	Gal	Ara	Rha
なし	4.03	tr	tr	-
あり	7.05	1.89	tr	0.39

次に、側鎖として Gal が含まれている可能性があることから、PGase 画分にガラクトース含有多糖分解酵素 (GNase, GDase) を添加し、どのような Gal 含有多糖が含まれているかを調べた (図1)。Gal は GNase 単体では検出されず、GDase 単体・併用処理した場合でも

PGase 画分中の全 Gal の 1/3 程度しか検出されなかった。このことから、PGase 画分内には β -1,4 結合をもつガラクトタンはほとんど含まれておらず、 β -1,3 結合をもつガラクトタンや末端の Gal, その他単糖と結合している Gal が存在していることが推定された。

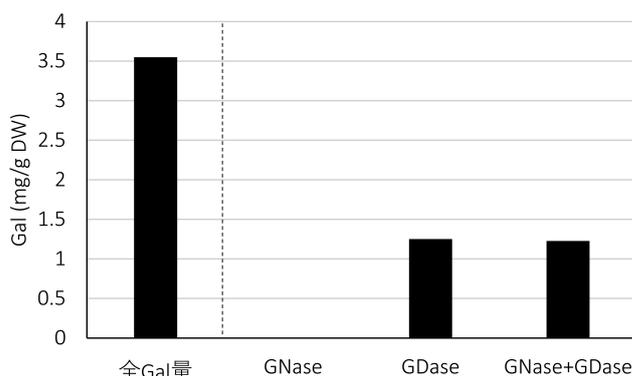


図1 PGase 画分に対する Gal 含有多糖分解酵素処理で遊離した Gal 量

3 PGase 抽出後の残存多糖の調査

抽出できていない多糖は RG-II と推定し、PGase 抽出残渣中の RG-II の残存を調査するため、Chormova らの方法²⁾を参考に、酸まで段階的に抽出を行った残渣に対し、PGase, 炭酸ナトリウム, KOH で段階的に抽出し、各画分の糖組成を調べた (表4)。現時点では、炭酸ナトリウム, KOH によって抽出された多糖の推定は困難であるが、3種の抽出工程のうち、大半の糖が PGase 画分で抽出さ

れていることから、PGase 抽出によって未抽出多糖の大部分が抽出可能であると考えられた。ロットが異なるため、比較は難しいが、表1の Pectinex Ultra で抽出される多糖のペクチンの大部分を抽出できたと考えている。以上をふまえ、ダイコンの多糖については水, CDTA, 塩酸, PGase, 炭酸ナトリウム, 水酸化カリウムでの段階的抽出が適切であると分かった。

表4 PGase および炭酸ナトリウム抽出された多糖の構成糖
単位: mg/g DW

	GalA	Gal	Ara	Rha
WSP	1.16	3.91	0.61	-
CSP	34.85	1.88	0.56	0.46
ASP	6.04	2.12	1.21	0.56
PGase	10.21	2.14	tr	0.27
Na ₂ CO ₃	0.77	2.04	tr	tr
KOH	0.72	1.03	tr	tr
Total	53.76	13.14	2.38	1.29

WSP:水溶性画分 CSP:キレート剤溶性画分 ASP:塩酸溶性画分
KOH:水酸化カリウム溶性画分

IV まとめ

ダイコンからのペクチンの抽出を検討し、従来の抽出方法では多糖を全量抽出できないことが分かった。酵素を用いて残存多糖について調査した結果、未抽出多糖はRG-IIであると推定した。そこで、RG-IIの抽出に関する文献を参考に、酸抽出後に、PGase、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムと段階的に抽出することで、多糖の大部分を抽出できると考えられた。

参考文献

- 1) 井上竜一 野菜の加熱軟化特性とデンプンの関係, 東洋食品研究所 研究報告書, **33**, 89-94 (2020)
- 2) Dimitra Chormova, Stephen C. Fry Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted *in vitro* by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins, *New Phytologist*, **209**, 241-251 (2016)