

## ダイズ種子の可溶性多糖類とその構成糖に関する研究

誌名	日本作物學會紀事
ISSN	00111848
巻/号	661
掲載ページ	p. 62-66
発行年月	1997年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ダイズ種子の可溶性多糖類とその構成糖に関する研究

加藤 尚・高八 忠弘\*・笠井 忠\*\*

(香川大学農学部)

1996年5月14日受理

**要旨:**ダイズ多糖類の構造的特徴に関する報告は、現在迄のところ多くない。そこで、本報では、ダイズ種子より可溶性多糖類を抽出精製単離し、その多糖類の構造的特徴に関する研究を行った。可溶性多糖類 A1- $\beta$  はダイズ種子子葉より水抽出の後、Bio-Gel A150 m, DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーにより精製した。A1- $\beta$  は、濾紙電気泳動と超遠心分析で均一であり、平均分子量は約  $2 \times 10^6$  であった。また、A1- $\beta$  は、アラビノースとガラクトースを主構成糖とし(モル比 2:3)、ラムノース、フコース、キシロース、マンノース、グルコース、マンヌロン酸、ガラクトツロン酸、グルクロン酸から構成されている多糖であり、ダイズ多糖類としては新規であると考えられる。

**キーワード:**アラビノース, ガラクトース, ダイズ, 多糖類。

**A Soluble Polysaccharide from Soybean Seeds and its Components:** Hisashi KATO, Tadahiro TAKAHACHI and Tadashi KASAI (Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-07, Japan)

**Abstract:** Information on the characteristics of soybean polysaccharides is limited. This study was undertaken to purify and characterize a polysaccharide in mature soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Akishirome). A soluble polysaccharide, A1- $\beta$ , was extracted from the cotyledons of soybean seeds with water and purified by Bio-Gel A150m and DEAE-Sephacel column chromatography. The homogeneity of A1- $\beta$  was confirmed by ultracentrifugal and electrophoretic analyses, and its molecular weight was ca.  $2 \times 10^6$ . The major components of A1- $\beta$  were arabinose and galactose in the molar ratio of 2:3. Other components were rhamnose, fucose, xylose, mannose, glucose, mannuronic acid, galacturonic acid and glucuronic acid. These results indicate that A1- $\beta$  may be a polysaccharide that has never been reported in soybean seeds.

**Key words:** Arabinose, Galactose, *Glycine max* (L.) Merr., Soybean, Polysaccharide.

ダイズ種子は、他の植物種子と比較してタンパク質(40.6%)と脂質(16.5%)を多く含んでおり、食糧や食品原料として高く評価されてきた<sup>26,27</sup>。このため、タンパク質及び脂質の特性についての研究はよく行われたが、約 25% を占めている糖類に関する研究は比較的少ない。しかし、近年栄養生理学的見地よりダイズ多糖類の食物繊維としての利用が注目されている<sup>16,20</sup>。

他の多くの作物が種子にデンプンを蓄えるのとは異なり、ダイズの貯蔵炭水化物は複合多糖類、ガラクトシル少糖類と微量の単糖類である<sup>9,12,13,23</sup>。ダイズ種子の少糖、単糖類については、川村ら<sup>11</sup>は、シュクロース(4.6%)、ラフィノース(1.1%)、スタキオース(3.8%)を含み、グルコースとベルバスコースが痕跡量存在していると報告した。

ダイズ種子の多糖類については、種皮にはガラクトマンナン<sup>1,28</sup>、キシラン<sup>2,22</sup>、酸性多糖類<sup>4</sup>が含まれていること、胚には、リボース<sup>21</sup>を主成分とする多糖類が含まれていること、貯蔵組織の子葉には、アラビノガラクトタンとアラビナン<sup>18,19</sup>、酸性多糖類<sup>3,4</sup>、セルロースと微量のデンプン<sup>12,13</sup>が含ま

れていることが報告された。また、菊池ら<sup>14</sup>は、細胞壁の多糖類は、約 30% のペクチン質、50% のヘミセルロース、20% のセルロースよりなることを報告した。

しかし、現在のところ、これらのダイズ多糖類の構造的特徴が明らかになっているものは少ない。そこで、我々の研究の目的は、ダイズ種子の多糖類の成分・組成を明らかにすることであり、本研究ではダイズ種子子葉より可溶性多糖類を抽出精製単離し、その多糖類の構成糖の検討を行った。

### 材料と方法

#### 1. 植物材料と可溶性多糖類の抽出

ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)品種アキシロメの種子 120 g を蒸留水に 30 分間浸し、種皮と胚を除去した後、少量の 80% (v/v) エタノールを加え摩砕した。これに 10 倍量の 80% エタノールを加え、沸騰湯浴中で 1 時間の還流抽出を行い、少糖と単糖類を除去した。次に、残渣に n-ヘキサンを加え攪拌後、吸引濾過により脱脂した(3 回同様の操作を繰り返した)。残渣を風乾後、10 倍量の蒸留水を加え室温で 1 時間置き、遠心分離(10,000 × g, 10 分)後上清を回収した。この操作を 4 回繰り返した。

\* 現在:隆祥産業(株),香川県香川郡香南町池内。

\*\* 現在:香川短期大学,香川県綾歌郡宇多津町。

集めた上清は減圧濃縮後、水酸化バリウム-硫酸亜鉛法<sup>25)</sup>により除タンパクを行った。生じた沈澱は、遠心分離(7,500 × g, 15分)により除去した。上清は、脱イオン水に対して透析を行い、得られた透析内液はメンブランフィルター(pore size 0.45 μm)で濾過した。濾液は減圧濃縮後、凍結乾燥を行い、0.6 gの可溶性多糖類を得た。

## 2. 可溶性多糖類の精製

多糖類試料(50 mg)を3 mlの水に溶かした後、Bio-Gel A150 mカラム(φ 50×550 mm)に供し、水による溶出を行った。溶出液は7 mlずつ回収し、各々の回収液の糖量はフェノール-硫酸法<sup>7)</sup>により、タンパク質量は紫外吸収法<sup>8)</sup>により測定した。このカラム4本分の分画30から51の溶出液を合わせ減圧濃縮後、凍結乾燥した。得られた多糖類試料(100 mg)を3 mlの水に溶かし、DEAE-Sephacelカラム(φ 35×200 mm)に供した。溶出は、0, 100, 200, 300 mM塩化カリウムを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)による段階溶出(各500 ml)を行った。溶出液は5 mlずつ回収し、糖量を測定した。このカラム3本分の分画129から137(100 mM塩化カリウム溶出区)の溶出液を合わせ減圧濃縮、透析後、凍結乾燥した。得られた多糖類試料(100 mg)を3 mlの水に溶かし、DEAE-Sephacelカラム(φ 35×200 mm)に再度供した。溶出は、0, 50, 100 mM塩化カリウムを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)による段階溶出(各100 ml)を行った。溶出液は5 mlずつ回収し、同様に糖量を測定した。分画46から48(100 mM塩化カリウム溶出区)の溶出液を合わせ減圧濃縮、透析後、凍結乾燥し、可溶性多糖類試料(A1-β)を得た。

A1-βの平均分子量は、Sephacel CL-28カラム(φ 16×660 mm)に供し、Blue-Dextran 2000(分子量 $>2 \times 10^6$ ; Pharmacia)との溶出様式を比較し求めた。即ち、A1-β(1 mg)とBlue-Dextranを少量の水に溶解しカラムに供し、水による溶出(流速15 ml/h; 1 mlずつ回収)を行った。A1-βは、フェノール-硫酸法を用いて、Blue-Dextranは吸光度(620 nm)により検出した。

## 3. 構成糖の同定と定量

中性糖の同定と定量のため、窒素置換した密閉アンブル中で多糖類試料をトリフルオロ酢酸(2 M)によって加水分解<sup>9)</sup>した(100°C, 6時間)。加水分解後、減圧乾固し、トリフルオロ酢酸を除いたのち、水に溶かし、内部標準物質(myo-イノシトール)を加えた後、イオン交換樹脂カラム(アンバーライト CG-400, Acetate型)に供し、ウロン酸を除いた。減圧乾固後、Lehrfeld<sup>15)</sup>の方法により中性糖をアルジトールアセテート誘導体に変換した。誘導体は、クロロホルムに溶かし、ガスクロマトグラフィー(GLC; Shimadzu GC-4CM)に供した。GLCの分析は、FID検出器、カラム(190°C定温; φ 2.6 mm×2 m; 5% ECNSS-M, Uniport HP), キャリアガス(N<sub>2</sub>, 40 ml/min)の条件で行った。

ウロン酸の同定と定量のため、TaylorとConrad<sup>24)</sup>の方法で多糖類試料のカルボキシル還元を行った。還元後、上記の方法で加水分解し、内部標準物質を加え、アルジトールアセテート誘導体としてGLCに供した。なお、カルボキシル還元後ウロン酸含有量をm-ヒドロキシジフェニール-硫酸法<sup>5)</sup>により測定し、還元率が98%であることを確かめた。

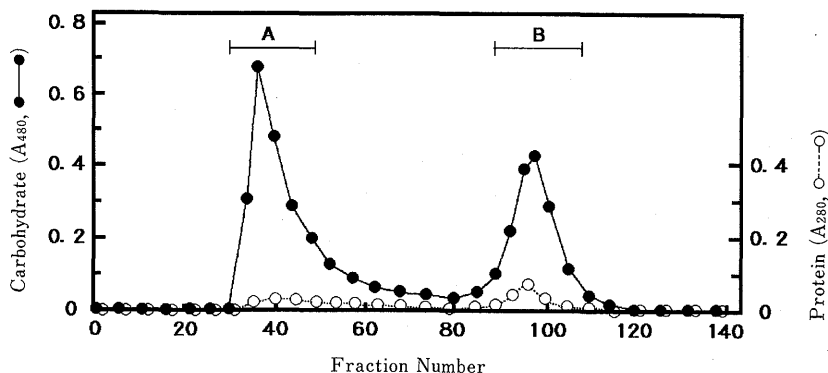


Fig. 1. Elution profile of soluble polysaccharides on Bio-Gel A150 m column. Carbohydrates were measured by phenol-sulfuric acid method at 480 nm and proteins were measured at 280 nm.

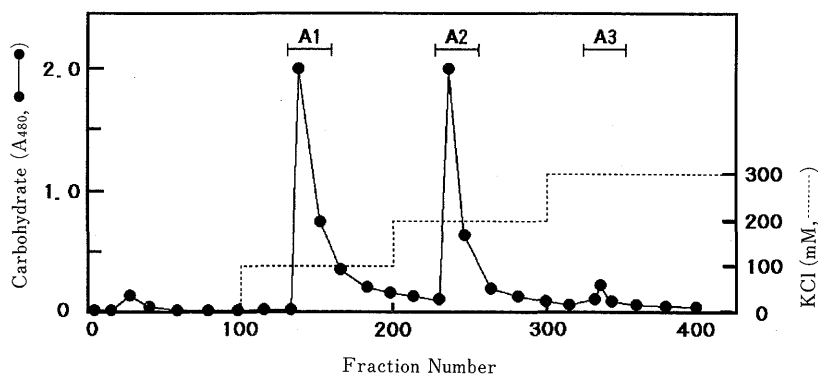


Fig. 2. Elution profile of A fraction on DEAE-Sephacel column.  
Carbohydrates were measured by phenol-sulfuric acid method at 480 nm.

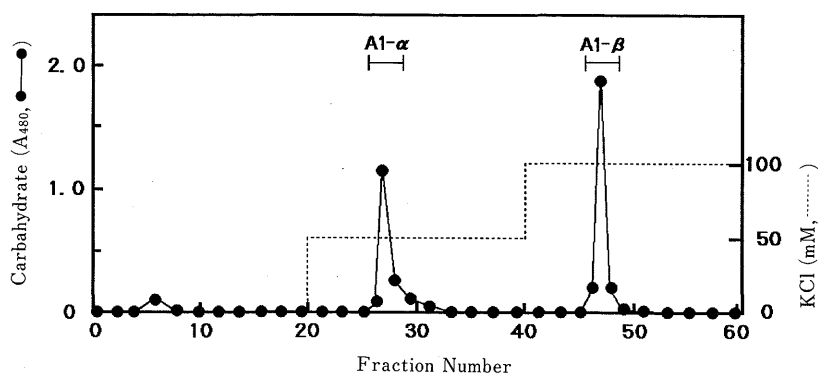


Fig. 3. Elution profile of A1 fraction on DEAE-Sephacel column.  
Carbohydrates were measured by phenol-sulfuric acid method at 480 nm.

糖の同定は、内部標準物質と標品の相対保持時間との比較から行った。糖の定量は内部標準法で行い、アラビノースに対する相対モル比で表した。

### 結果と考察

#### 1. 含有可溶性多糖類

種皮及び胚を除くダイズ種子子葉(120 g)より水抽出した可溶性多糖類(0.6 g)を、Bio-Gel A150 m カラムクロマトグラフィーに供し、フェノール-硫酸法<sup>7)</sup>により多糖類の溶出様式を調べた(第1図)。その結果、可溶性多糖類は、高分子側(A画分)と低分子側(B画分)の2つに分かれた。A画分の紫外部(280 nm)吸収がB画分のそれより少ないことにより、A画分のタンパク質含有量はB画分より少ないと考えられた<sup>8)</sup>。そこで、A画分(300 mg)をDEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、A1(100 mg)、A2(135 mg)、A3(15

mg)の3画分を得た(第2図)。収量の多いA1とA2を濾紙電気泳動(ガラス繊維濾紙)<sup>10)</sup>と超遠心分析法<sup>17)</sup>にかけ均一性を調べたところ、両画分とも均一でなかったが、A1はA2より均一性が高いと考えられた。そこで、A1を再度DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、2つの画分A1-α(35 mg)、A1-β(45 mg)を得た(第3図)。このうちA1-βは、濾紙電気泳動(結果は示さなかった)と超遠心分析法(第4図)により均一な多糖類であると考えられた。

#### 2. 可溶性多糖類の特徴

最初に、分子量を明らかにするため、A1-βをSephacel CL-2B カラムクロマトグラフィー(分画分子量範囲、 $10^5$ – $2 \times 10^7$ )を供し、フェノール-硫酸法によりA1-βの溶出位置を調べた(第5図)。その結果、A1-βは約49 mlのところに溶出ピークが、また、基準物質として用いたBlue-Dextranは

約 52 ml のところに溶出ピークが認められた。このことは、A1- $\beta$  の平均分子量は  $2 \times 10^6$  以上であることを示唆している。

次に、A1- $\beta$  の構成糖を明らかにするため、中性糖とウロン糖の同定と定量を行った。まず、A1- $\beta$  を加水分解後、アルジトールアセテート誘導体に変換し、GLC 分析にかけ、A1- $\beta$  を構成している中性糖の同定と定量を行った。その結果、A1- $\beta$  の主構成糖はアラビノースとガラクトースでありそれらのモル比は 2:3 であった。また、ラムノース、フコース、キシロース、マンノース、グルコースの中

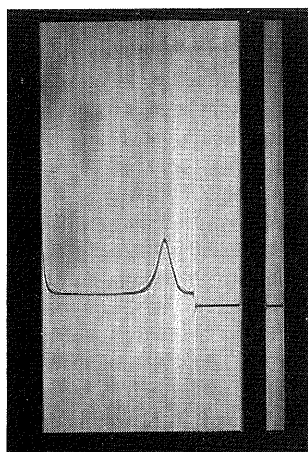


Fig. 4. The sedimentation pattern of A1- $\beta$ . The measurement was made in 0.1 M NaCl at 25°C. The photograph was taken 90 min after the maximum speed (60,000 rpm) attained. The direction of sedimentation was from right to left.

性糖が存在していることが示唆された(第1表)。さらに、A1- $\beta$  をカルボキシル還元した後、加水分解し、アルジトールアセテート誘導体に変換し、同様に GLC 分析にかけた。その結果、マンノース、ガラクトース、グルコースの割合がカルボキシル還元により増加したことから、マンヌロン酸、ガラクトツロン酸、グルクロン酸の3種類のウロン酸が A1- $\beta$  に存在していることが示唆された。

以上の結果よりダイズ種子子葉より抽出単離された可溶性多糖 A1- $\beta$  は、平均分子量は  $2 \times 10^6$  以上であり、アラビノースとガラクトースを主構成糖とし、ラムノース、フコース、キシロース、マンノース、グルコースの計7種類の中性糖とマンヌロン酸、ガラクトツロン酸、グルクロン酸の3種類のウロン酸から構成されている多糖であると考えられる。

A1- $\beta$  は、現在迄にダイズ種子より抽出され構造的特徴が明らかにされた多糖類と比べて、分子量や構成糖の組成及び組成比が異なっていた<sup>1,2,3,4,18,19,21,22</sup>。さらに、A1- $\beta$  は、ダイズタンパクの製

Table 1. Relative mole ratio of components in A1- $\beta$  and carboxyl-reduced A1- $\beta$ .

Sugar	A1- $\beta$	Carboxyl-reduced A1- $\beta$
Rhamnose	0.05	0.06
Fucose	0.02	0.02
Arabinose	1.00	1.00
Xylose	0.03	0.07
Mannose	0.01	0.07
Galactose	1.47	1.63
Glucose	0.04	0.15

The values as mole ratios to arabinose indicate the means of duplicate experiments.

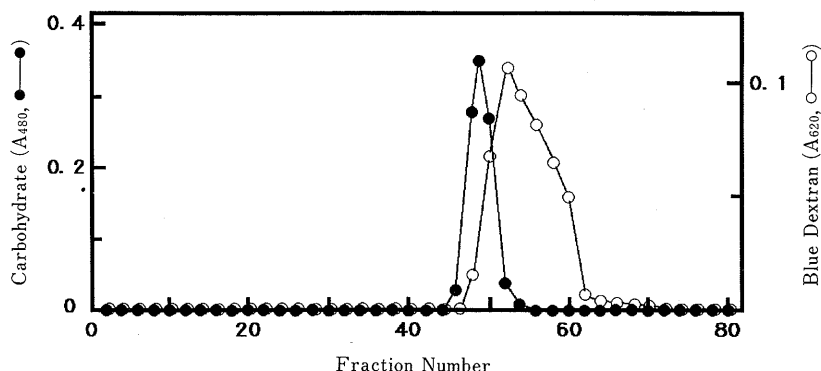


Fig. 5. Elution profile of A1- $\beta$  on Sepharose CL-2B column. A1- $\beta$  was measured by phenol-sulfuric acid method at 480 nm and Blue-Dextran was measured at 620 nm.

造の際得られるオカラから加熱抽出された可溶性多糖類ソヤファイブ-S<sup>16)</sup>と比べても構成糖及びその比率が異なっていた。以上のことより、A1- $\beta$ は少なくともダイズ種子では新規の可溶性多糖類であると考えられる。また、栄養生理学的見地よりダイズ多糖類の食物繊維としての利用が注目されているが<sup>16,20)</sup>、A1- $\beta$ も同様に食物繊維として栄養学的意義を持つと考えられる。今後は、A1- $\beta$ の構成糖の結合様式等について検討し、A1- $\beta$ の構造を明らかにしていく予定である。

### 引用文献

- Aspinall, G.O. and J.N.C. Whyte 1964. Polysaccharides of soybeans. part I. Galactomannans from the hulls. J. Chem. Soc. 5058—5063.
- Aspinall, G.O., K. Hunt and I.M. Morrison 1966. Polysaccharides of soy-beans. part II. Fractionation of full cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan. J. Chem. Soc. 1945—1949.
- Aspinall, G.O., I.W. Cottrell, S.V. Egan, I.M. Morrison and J.N.C. Whyte 1967. Polysaccharides of soy-beans. part IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal. J. Chem. Soc. 1071—1080.
- Aspinall, G.O., K. Hunt and I.M. Morrison 1967. Polysaccharides of soy-beans. part V. Acidic polysaccharides from the hulls. J. Chem. Soc. 1080—1086.
- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-hansen 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. Analyt. Biochem. 54: 484—489.
- Cifonelli, J.A. 1966. Acid hydrolysis of acidic mucopolysaccharides. Carbohydr. Res. 2: 150—161.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350—356.
- Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Analyt. Biochem. 48: 422—427.
- 笠井 忠 1978. 大豆の小糖類の加水分解に関する研究. 香川大学農学部紀要 51: 1—73.
- Kato, Y. and K. Matsuda 1976. Presence of a xyloglucan in the cell wall of *Phaseolus aureus* hypocotyls. Plant cell Physiol. 17: 1185—1198.
- 川村信一郎・多田 稔・檜崎丁市 1966. 大豆の種実, 種皮, 胚軸の糖類. 栄養と食糧 19: 268—275.
- 川村信一郎 1967. 大豆多糖類の化学. I. 日食工誌 14: 514—523.
- 川村信一郎 1967. 大豆多糖類の化学. II. 日食工誌 14: 553—562.
- 菊池志昭・石井茂孝・福島男児・横塚 保 1971. 大豆多糖類に関する食品化学的研究. I. 大豆細胞壁の性質とそれに対する蒸煮の及ぼす影響について. 農芸化学会誌 45: 228—234.
- Lehrfeld, J. 1981. Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acids in carbohydrate mixtures. Analyt. Biochem. 115: 410—418.
- 前田裕一 1994. 水溶性大豆多糖類「ソヤファイブ-S」の特性と利用. 食品工業 37: 71—76.
- Morita, M. 1965. Polysaccharides of soybean seeds. part I. Polysaccharide constituents of “hot-water-extract” fraction of soybean seeds and an arabinogalactan as its major component. Agr. Biol. Chem. 29: 564—573.
- Morita, M. 1965. Polysaccharides of soybean seeds. part II. A methylated arabinogalactan isolated from methylated product of “hot-water-extract” fraction of soybean seed polysaccharides. Agr. Biol. Chem. 29: 626—630.
- Morita, M., M. Okuhara, T. Kikuchi and Y. Sakurai 1967. Polysaccharides of soybean seeds. part III. 1, 4-Linked galacto-di- and trisaccharides from partial acid hydrolysate of the “hot-water-extract” fraction of soybean seed polysaccharides. Agr. Biol. Chem. 31: 314—318.
- 中尾行宏・矢田英雄 1984. 大豆多糖類加工品の機能性. 日食工誌 31: 299—305.
- Narasaki, T. and S. Kawamura 1967. Polysaccharides of soybean hypocotyls. Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. 18: 154—157.
- Sannella, J.L. and R.L. Whistler 1962. Isolation and characterization of soybean hull hemicellulose B. Arch. Biochem. Biophys. 98: 116—119.
- 田主澄三 1972. 完熟大豆の子葉・種皮・胚軸の炭水化物の組成. 栄養と食糧 25: 79—82.
- Taylor, R.L. and H.E. Conrad 1972. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiideactivated carboxyl groups. Biochem. 11: 1383—1388.
- 友田正司・古関正意・鶴見隆一 1976. オリゴ糖. 山科郁男・山川民夫・鈴木 旺編, 生物化学実験講座4 糖質の化学(上). 東京化学同人, 東京. 47—79.
- 山内文男・久久保一良 1992. 大豆の科学. 朝倉書店, 東京. 1—199.
- 渡辺篤二・海老根英雄・太田輝夫 1971. 大豆食品. 光琳書院, 東京. 1—270.
- Whistler, R.L. and J. Saarnio 1957. Galactomannan from soy bean hulls. J. Amer. Chem. Soc. 79: 6055—6057.