

## オリゴ糖の機能を生かした商品開発の支援研究(1)

誌名	研究報告
ISSN	13465236
著者	木村, 功
巻/号	9号
掲載ページ	p. 87-89
発行年月	2009年6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



# オリゴ糖の機能を生かした商品開発の支援研究 (第1報)

## —オリゴ糖の重合度分析と分取—

木村 功

多糖類を加水分解することによって調製したオリゴ糖の重合度(D.P.)を分析するとともに分取する方法を検討した。オリゴ糖は希酸で多糖類を加水分解した後、イオン交換樹脂カラムによって部分精製することで調製した。各オリゴ糖の重合度は、高性能ゲル濾過カラムを備えた高速液体クロマトグラフによって分析した。また中圧ゲルろ過担体を充填したカラムを用いることによって、オリゴ糖をD.P.に基づいて分離できた。

### 1 緒言

オリゴ糖は保湿性やビフィズス菌の増殖作用を有することから、プレバイオティクス、化粧品や健康増進作用などで注目される素材である<sup>1)</sup>。

現在までに市場流通しているオリゴ糖の大半は、糖質を加水分解する酵素によって、糖質が分解あるいは転移作用(糖転移反応)を受けることで製造されている。この反応は、使用する酵素、あるいは糖質を選択することによって、様々なオリゴ糖が生産できることから、新たなオリゴ糖の機能性を見出すために、多くの研究機関で新規なオリゴ糖の合成法が探索されている。

オリゴ糖の機能を解析したり、その事業化を考えた場合、対象となるオリゴ糖の結合様式を含めた立体構造を明らかにすることが求められる。かかる構造の解析には高度に精製された単一のオリゴ糖が必要となる。

当研究所ではオリゴ糖の機能を生かした食品開発を支援するため、様々なオリゴ糖の生産方法及び分析法並びに分取法を検討してきた。今回は、オリゴ糖の重合度(D.P.)分析及び分取方法について検討したので報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 オリゴ糖の調製

オリゴ糖はMitsuishi らの方法<sup>2)</sup>に基づいて調製した。すなわち20gの多糖類を1リットルの0.1N塩酸に懸濁し、沸騰湯浴中に30分間保持した。冷却後7.3gの炭酸ナトリウムを添加し、遠心分離(10,000 x g, 10分)によって沈殿物を除去し、オリゴ糖試料とした。

さらにオリゴ糖を精製する場合は、回収した上澄液に10gの活性炭を添加後、GF75ガラスフィルターで活性炭をろ取した。100mlの蒸留水で洗浄後、60%エタノールで活性炭を洗浄し、ろ液を回収した。ろ液は40℃で減圧乾燥した後、AG1 x 8イオン交換樹脂を充填したカラム(5 x 10 cm)に負荷した後、蒸留水で溶出した画分を凍結乾燥した。

#### 2-2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)による分析

オリゴ糖の重合度(以下D.P.と略す)及び純度は、TSK gel G-Oligo-PWカラム(東ソー株式会社)を用いて分析した。HPLCシステムとして日立製作所 LaChrom L-7000 シリーズ(ポンプL-7100, RI検出器L-7490,オ

ートサンプラーL-7200)を用いた。溶離液は蒸留水を用い、流速0.8 ml/分、カラム温度60℃で分析をおこなった。

#### 2-3 クロマトグラフによる分取

オリゴ糖はToyopearl HW40S(東ソー株式会社)を充填したカラム(2.5 x 95 cm)で分取した。0.2gのオリゴ糖試料を2mlの蒸留水に溶解し、上記カラムに負荷した。溶離液は蒸留水を用い、HPLCポンプ(島津LC-10A)によって流速1 ml/分、カラム温度40℃で分離した。溶出液は5mlずつ試験管に分取し、オリゴ糖の画分を回収した。

### 3 結果及び考察

#### 3-1 TSK gel G-Oligo-PWカラムを用いたD.P.分析

2-2の方法に基づきオリゴ糖標準物質(グルコースオリゴマーG1-20;生化学工業株式会社)を用いて校正曲線を作成した。

図1に示すように、オリゴ糖標準物質はD.P.の高いものから溶出され、D.P.9(9糖に相当)まで分離できた。D.P.9より重合度が大きいオリゴ糖は、排除限界に溶出した。各オリゴ糖の保持時間、流速及びカラム容量から各オリゴ糖の溶出液量を算出した。

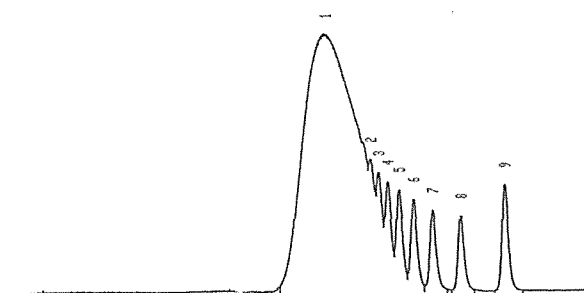


図1 TSK gel G-Oligo-PWカラムによるオリゴ糖標準物質のクロマトグラム

試料, 100µg オリゴ糖標準物質 (D.P. G1-20); 2-2の方法に従って分析した。

次に2-1の方法に従って調製したオリゴ糖を当該カラムで分離した結果を図2に示した。D.P.9より大きなオリゴ糖は排除限界に溶出した。塩酸加水分解において、生成するオリゴ糖のD.P.は加水分解時間あるい

は加水分解温度に影響され、加水分解温度は高く、加水分解時間は長くなるに伴い、D.P.は低分子側にシフトすることがわかった（結果未掲載）。

多糖類を加水分解してオリゴ糖を調製する場合には、目的とするオリゴ糖の生成量が最大となる反応条件を見出すことが必要になる。本分析法は加水分解に伴うオリゴ糖の量的な変化を追跡することができ、最適生産条件を決定する際の有用な手法になることが考えられた。

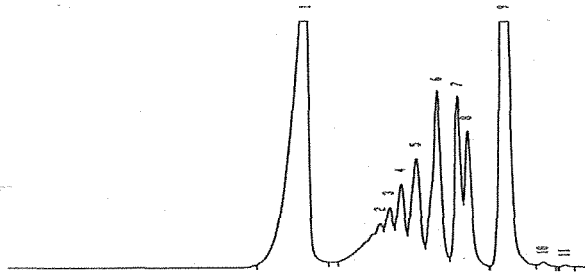


図2 TSK gel G-Oligo-PW カラムによる調製オリゴ糖のクロマトグラム

試料, 500 $\mu$ g 多糖類加水分解物; 2-2 の方法に従って分析した。

上記のクロマトグラムにおけるオリゴ糖標準物質の分子量と保持時間から、オリゴ糖の D.P. に係わる校正曲線を作成した(図3)。

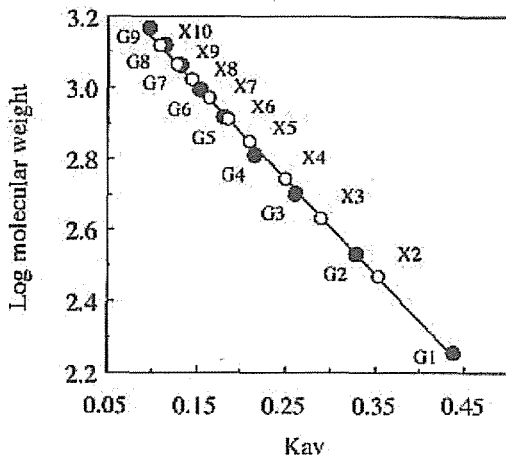


図3 TSK gel G-Oligo-PW カラムによるオリゴ糖の D.P. と溶出液量の校正曲線

●,オリゴ糖標準物質 D.P.G1-20; ○,調製キシロオリゴ糖 X2-X10; Kav,カラム保持容量; Log molecular weight, 分子量の常用対数

オリゴ糖標準物質は当該カラムにおいて G1(D.P.1) から G9 (D.P.9) まで直線的に溶出された。またヘミセルロース由来のオリゴ糖も校正曲線の D.P. に一致し、X2 (D.P.2) から X10 (D.P.10) まで直線的に分離できた。

### 3-2 Toyopearl HW-40S カラムクロマトグラフィー

2-3 の方法に基づいて、多糖類から調製したオリゴ糖を分離した。各 D.P. のオリゴ糖は HPLC で分析したクロマトグラムとほぼ同様な溶出パターンを示した

(図4)。

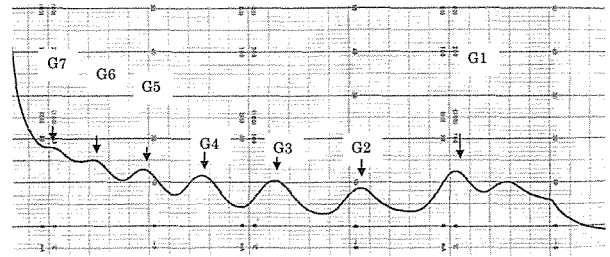


図4 Toyopearl HW-40S カラムによる調製オリゴ糖のクロマトグラム

試料, 20 mg 多糖類加水分解物; 2-3 の方法に従って分離した。

G1-G7, オリゴ糖標準物質の D.P. から算出した。

各オリゴ糖は、それぞれ単独のピークとして分離され、再度クロマトグラフィーを行うことにより、95%以上の純度で回収できた。当該カラムにおけるオリゴ糖の分離時間は7時間程度であり、10% (w/v) の試料を負荷しても良好な分離が認められた。

オリゴ糖は単糖が2~10 数個程度結合した糖質の総称であり、構成糖や結合様式の違いによって、それぞれの理化学性がまったく異なる糖質である。そこで目的とするオリゴ糖の性質を解析するためには、まず単一に精製することが必要になる。特異的な側鎖(カルボキシル基、アミノ基及びスルホキシル基など)を持たないオリゴ糖の精製は、特異的な側鎖を有するオリゴ糖に比較して困難となっている。そこで精製の第一ステップとして分子量、つまり D.P. に基づく分離法が検討されてきた。近年、薄層クロマトグラフィーによる分離や軟質系のゲルを用いたゲルろ過法<sup>3-5)</sup>が報告されてきたが、糖質処理量が少ないことに難点があった。本報告では米国食品医薬品局(FDA)の Drug Master File(DMF)へ登録している親水性の高分子クロマト担体(Toyopearl)<sup>6)</sup>を用いてオリゴ糖の分離を検討し、試料負荷量や再現性について良好な結果を得た。

### 4 結言

高性能ゲルろ過 HPLC カラムを用いて、多糖類から調製したオリゴ糖の D.P. を分析した。また中圧ゲルろ過クロマトグラフィーによって、オリゴ糖を D.P. ごとに分取することができた。

### 参考文献

- 1) 北畑寿美雄:微生物酵素による有用オリゴ糖の合成, 澱粉科学, **37**, 59-67 (1990).
- 2) Y.,Mitsuishi, T.Yamanobe, and M.,Yagisawa: The modes of action of three xylanases from mesophilic fungus strain Y-94 on xylooligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 921-927, (1988).
- 3) L.W. Doner: High-performance thin-layer chromatography of starch, cellulose,xylan and chitin hydrolyzates. p176-180. In W.A., Wood and S.T.,Kellogg (ed).Biomass, Methods in Enzymology volume 160, Academic press Inc.,New York (1988).

- 4) **J. H. Pazur**: Neutral polysaccharides, p.73-81. In Chaplin, M. F. and Kennedy, J.F. (ed.), Carbohydrate Analysis, A Practical Approach 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo (1994).
- 5) 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治 共著:植物細胞壁と多糖類 p82, 株式会社 培風館 (1991).
- 6) 東ソー株式会社:TSK-GEL/TOYOPERAL 総合カタログ,2008-2009, p138 (2008)

#### 付記

本研究は、平成 20 年度香川県糖質バイオ技術実用化支援研究事業のサブテーマ、オリゴ糖の機能を生かした商品開発の支援研究と題して実施したものである。