

[研究報告]

おからへミセルロースからのオリゴ糖の生産

山本 忠*、高橋 亨**、大谷 民子**
岩手県醸造食品試験場 発酵食品部

Preparation of Arabinoxylooligosaccharide from Okara (Tofu residua) Hemicellulose

YAMAMOTO Tadashi, TAKAHASHI Tooru, OHOTANI Tamiko

おからを亜塩素酸ナトリウム・アルカリ処理後、エタノール沈殿させ、収率4.2%でへミセルロースを得た。この成分は、アラビノースとガラクトースが1:2構成されていた。へミセルロースに、市販細胞壁溶解酵素を作用させることにより、オリゴ糖ミクスチャーを得ることができた。マウス小腸アセトンパウダーを作用させた結果から、おから由来オリゴ糖ミクスチャーは、ビフィダス菌栄養因子となる可能性が強く示唆された。

キーワード：おから へミセルロース オリゴ糖 へミセルラーゼ ビフィダス菌

1. 緒言

豆腐製造時の副産物として出るおからは、国内で年間80万トンにも達する⁽¹⁾。かつては貴重な食料源でもあったおからは、食生活の変化で、また、家畜飼料としても、安価な飼料の輸入などにより、現在はその用途がなくなり、逆に処理費が掛かり、手数は増大する一方である。おからは、水分が80%前後と高水分で、蛋白質が5%も残存しているなど栄養豊富⁽²⁾で有ることが災いして、短時間で変質しやすいことから、本県のような地方都市の豆腐製造業者にとってもその処理が深刻な問題となっている。

おからの有効利用については、種々の研究開発が行われており、「大豆副産物利用開発研究報告書」⁽¹⁾にまとめられている。しかし、有効に利用する決定打はない。

おからの糖質についての研究は、固形分の約20%はへミセルロースが占めており、その成分はアラビノガラクトタンやキシランなどであり、稲等のセルロースを主とする単子葉植物の種皮とは異なっていることが知られている程度である。最近、おからの溶解性を中心にした分解菌のスクリーニングに関する研究が、河原ら⁽²⁾によって報告された。なお、水溶性のオリゴ糖についての研究は進んでおり、市販されている大豆オリゴ糖は、こうした成分からなる商品である。

今回、私たちは、おからの難溶性画分に着目し、そのへミセルロース成分の利用について検討を進めたので、その結果について報告する。

2. 実験方法

2-1 供試原料

試験に用いたおからは、岩手県盛岡市の(株)平川食品から提供していただいた。おからは、データの汎用性を考慮して、オハイオ産の大豆を原料として、豆腐・油揚げの一般的な製造工程により豆腐成分を抽出した後、スクリュープレスで圧搾し、おからとなってホッパーに滞留している時点でサンプリングした。製造後約3時間以内に1kg毎にポリ袋詰めをして、-20℃で貯蔵し、必要なときに室温で溶解して用いた。

2-2 細胞壁溶解酵素

市販の細胞壁溶解酵素の中から、8種類の酵素を使用し、表-1にまとめて示した。このうち、ヤクルト

表-1 市販酵素の種類

商 品 名	販 売 者 名	由来微生物名
マセロチームA	ヤクルト薬品工業株式会社	<i>Rhizopus</i> sp.
セルラーゼ オノズカ3S	ヤクルト薬品工業株式会社	<i>Trichoderma viride</i>
セルラーゼ Y-NC	ヤクルト薬品工業株式会社	<i>Aspergillus niger</i>
明治セルラーゼ TP	明治製菓株式会社	<i>Trichoderma viride</i>
セルラーゼ	MERCK社	<i>Trichoderma viride</i>
セルラーゼ TC	SERVA FEINBIOCHEMICA	<i>Trichoderma reesi</i>
マセロチーム R-10	SERVA FEINBIOCHEMICA	<i>Rhizopus</i> sp.
セルラーゼ	NAGASE BIOCHEMICALS. LTD	<i>Aspergillus niger</i>

現在 * 岩手県工業技術センター 企画情報部 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2
** 岩手県工業技術センター 応用生物部 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2

薬品工業株式会社の3つの酵素と明治製菓株式会社の1つの酵素は、市販品を分譲していただいたものを使用した。そのほかの4つの酵素は、市販品を購入して使用した。

2-3 市販酵素の前処理

市販酵素剤のほとんどに大量の糖が含まれており、そのままの状態に添加して酵素反応を行った場合、生成したオリゴ糖の還元糖を測定するのが困難であった。そこで、酵素剤を3倍量の冷アセトンで30分処理したのち、2,000×gで10分間遠心分離して夾雑物を取り除き、酵素反応に用いた。酵素の蛋白質の定量は、クマシーブリリアントブルー法により行った。

2-4 ヘミセルラーゼ活性測定

活性測定に用いた条件は、各酵素のpH特性などにかかわらず、すべて酵素を1ml(タンパク質濃度を0.5mlとして)、基質に分離したヘミセルロース画分H-Bを5ml、緩衝液は100mM酢酸緩衝液5mlで、40℃、120rpmで行った。沸騰水浴中、10分間で反応を停止させた。650×g、10分間遠心分離した上澄みを、ネルソンソモギー法で測定した。生成される還元糖の量で、ヘミセルラーゼ分解力を判定した。

2-5 おからの一般成分の分析

基本的には、4訂版食品成分分析法⁽²⁾に準じて行った。各項目の具体的な測定は次の方法で行った。水分は常圧105℃乾燥法、蛋白質はミクロケルダール法、粗脂肪はクロロホルム・メタノール抽出法、灰分は550℃灰化法、糖質は差し引き法で測定した。

2-6 おからの食物繊維の測定法

プロテアーゼとグルコアミラーゼによる酵素分解を中心とした Prosky-AOAC法⁽⁴⁾によって行った。この分析法で使用した酵素・器具は次の通りである。プロテアーゼは、シグマのプロテアーゼ、グルコアミラーゼは、ノボのTermamyl、アミログルコシダーゼは、ベーリンガーマンハイム製を、また、グラスフィルタはシバタG3を用いた。

2-7 ヘミセルロースの完全分解法

ヘミセルロース構成糖質を調べるために、トリフルオロ酢酸法による完全分解を行った。ヘミセルロース画分1mlに、2Nトリフルオロ酢酸1ml加え、100℃で12時間反応させ、50℃のロータリーエバポレーターで乾燥した。これをHPLC法で測定した。

2-8 炭水化物の測定法

全糖は、フェノール硫酸法で、D-キシロースを標準物質として用いて測定した。還元糖は、ネルソンソモギー変法により、同じく、D-キシロースを標準物質として用いて測定した。

2-9 高速液体クロマトグラフによる糖類の分析

オリゴ糖の測定は、糖分析専用の高速液体クロマト

グラフ(ダイオネクス社Bio-LC)で、パルス型電気化学検出器を検出器として、CarboPAC PA100カラム(φ18mm、L30cm)を用い、溶媒を100mMNaOH、CH₃COONaグラディエントで、流速を1ml/minで、室温で測定した。

単糖類・2糖類は、同じシステムで、カラムをCarboPAC PA1(φ18mm、L30cm)に変え、溶媒を10mMNaOHで、流速を1ml/minで、室温で測定した。

2-10 酵素蛋白質のSDS-PAGE電気泳動

酵素の電気泳動は、Laminaliの方法により行った。酵素液に、サンプル緩衝液を添加処理して電気泳動を行った。第一化学株式会社の垂直式カセット電気泳動システム(DPE-2210)を用い、SDS-PAGEプレート10/20グラジエントゲル、トリス・グリシンSDSバッファーで、ゲル1枚あたり60mAの定電流で、90分間行った。タンパク質の染色は、クマシーブリリアントブルーR-250で行った。

2-11 ヘミセルロースの抽出法

おからからのヘミセルロース成分の抽出は、熱水処理による水溶性成分の除去・亜塩素酸ナトリウムによる脱リグニン・アルカリによる除タンパクを基本とするYamadaらの方法⁽⁵⁾に準じて行った。1回のおからの処理量が50gの時の操作概要を図-1に示した。

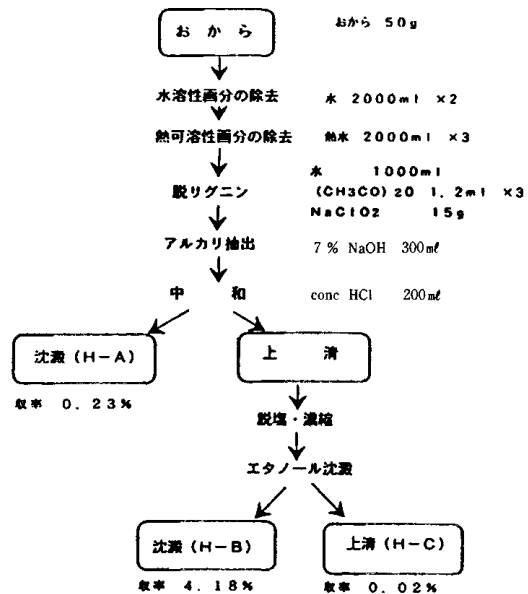


図-1 おからヘミセルロースの抽出法

2-12 オリゴ糖の生理活性

生成したオリゴ糖の生理活性を調べるために、マウスとラットの小腸のアセトンパウダー(シグマ)を用いて消化試験を行った。基質は、長時間酵素反応によって生成されたオリゴ糖混合物を、1N NaOHでpH7.5に調整したものを用いた。この溶液のトリフルオロ酢

酸による完全分解後の還元糖濃度は、1.0%であった。15mlのファルコンチューブに基質を10ml入れて、アセトンパウダー濃度を0.1%で、37℃、120rpmで酵素反応を行った。100℃で10分間の加熱によって、酵素を失活させ、650g×5分間遠心分離後、上澄み液の還元糖を測定した。

3. 結果

3-1 おからの一般成分及び繊維質成分の含有量

食物繊維を測定する際に、四訂食品成分分析法で用いている従来の酸・アルカリ法をベースとしたヘンネベルグストーマン改良法に比べ、食物繊維の実体に近い値を得るのに有効な酵素・重量法の一つである Prosky-A O A C法で測定した結果を表-2に示した。併せて、一般成分の分析結果と参考値として四訂版のおからと豆腐の一般成分値をまとめて掲げた。

なお、本研究で使用したおからの水分が、四訂版の値より低いのは、豆腐製造用の圧搾機がローラープレスという新しいタイプのものであり、従来のものより圧搾効率が良いためである。

表-2 おからの一般成分組成

試料	成分 (%)					
	水分	たんぱく	脂質	糖質	繊維	灰分
おから (本研究実験値)	75.0	5.5	3.4	2.4	13.0	0.7
おから (食品成分分析表)	81.1	4.8	3.6	6.4	3.3	0.8
豆腐 (本誌 成分分析表)	86.8	6.8	5.0	0.8	0	0.6

3-2 ヘミセルロースの収量・純度

おからを処理して得られた3つのヘミセルロース画分の収量を表-7に示した。また、純度に関する成分である全糖、還元糖、蛋白質の分析結果を図-2に示した。

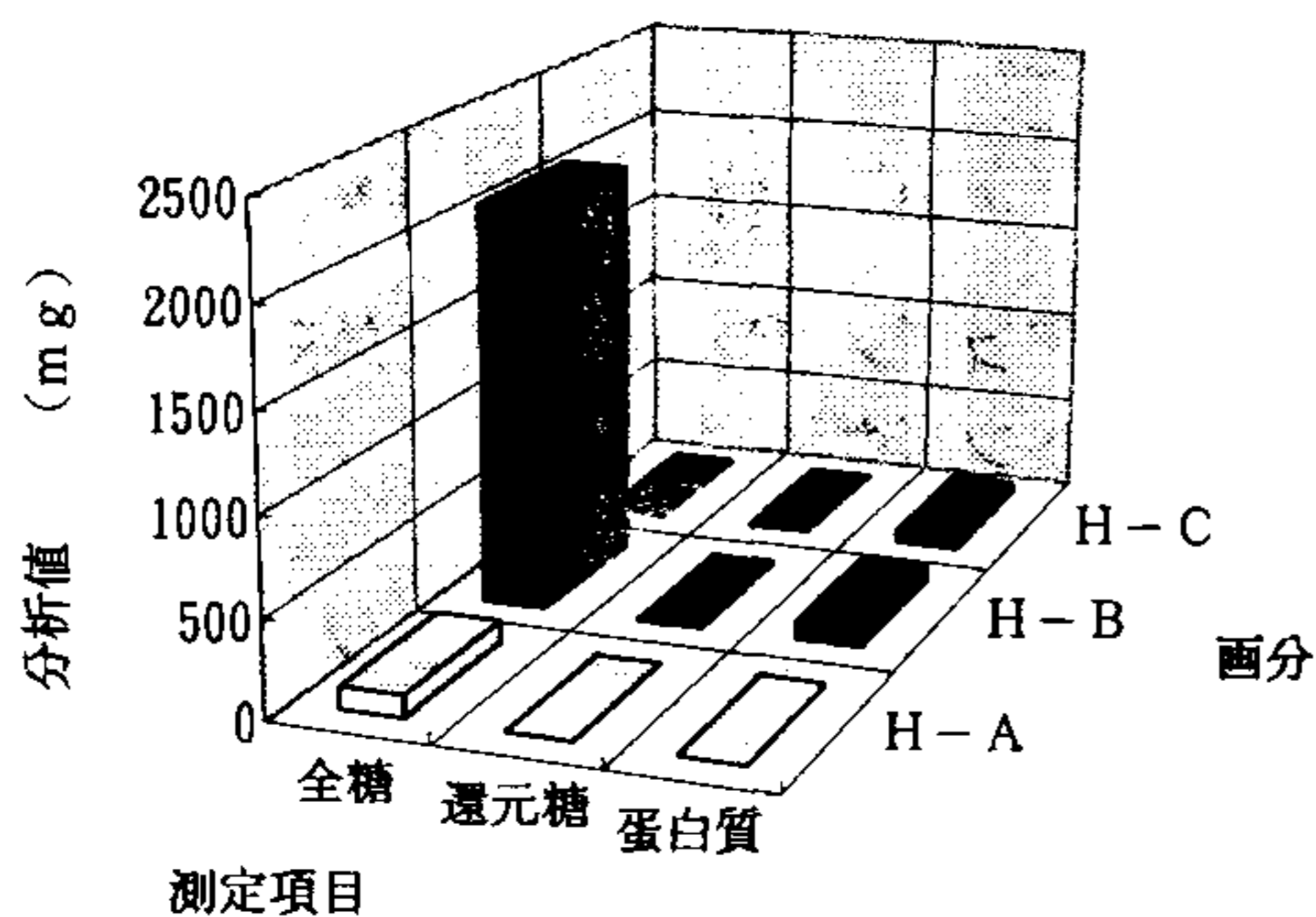


図-2 ヘミセルロースの純度に関する成分値

3-3 ヘミセルロース画分の糖組成

このヘミセルロース抽出方法で得られたおからの3つのヘミセルロースを、トリフルオロ酢酸で完全分解し、トリフルオロ酢酸を吸引して除去した試料を、糖分析用高速液体クロマトグラフで測定した。その結果を構成糖成分としてまとめ図-3に示した。

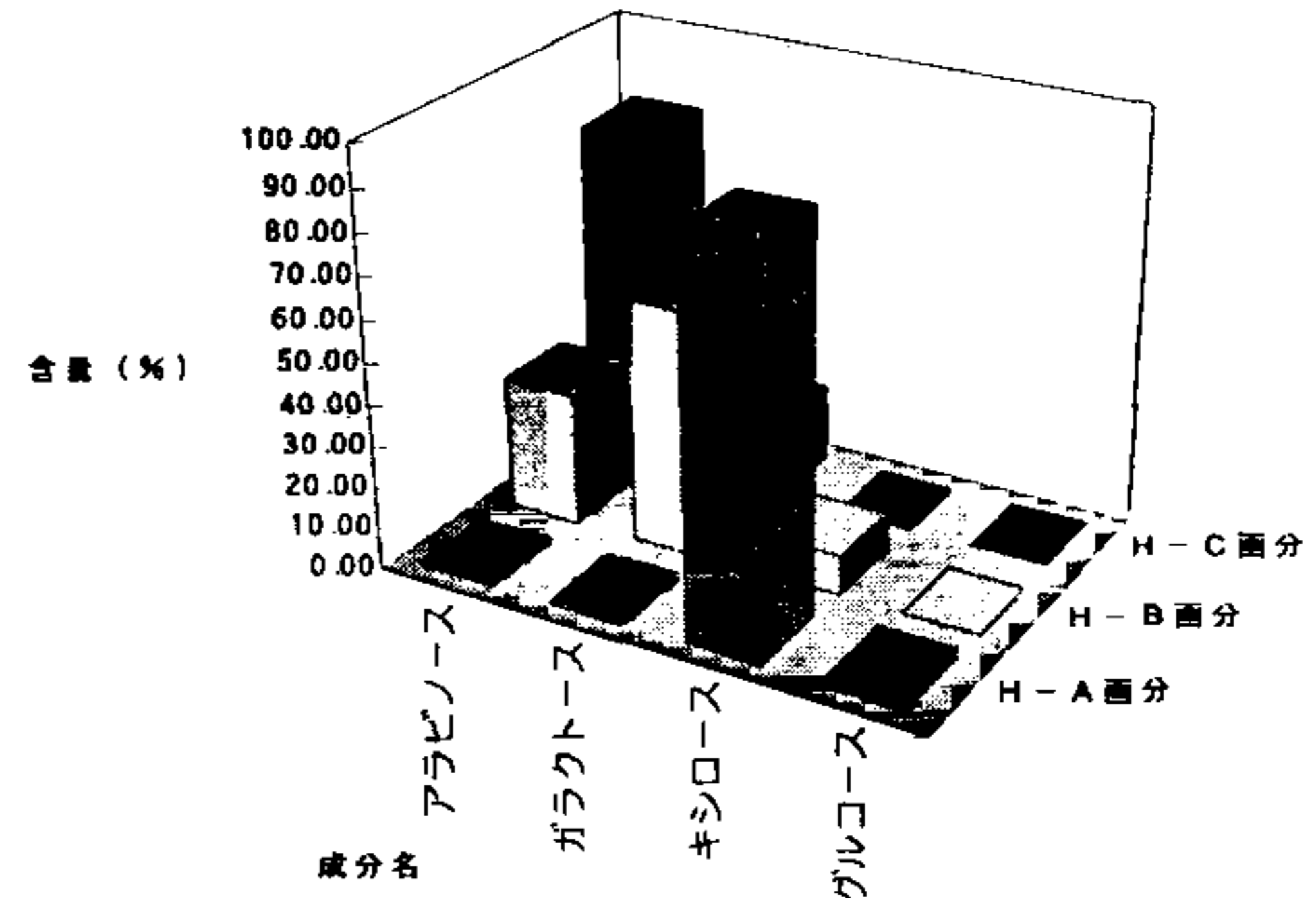


図-3 ヘミセルロース画分の糖組成

おからから抽出した3つのヘミセルロース画分を、トリフルオロ酢酸で完全分解したものを、高速液体クロマトグラフ (DIONEX BIO-LC) で分析した糖質の構成割合を3次元で示した。

3-4 市販酵素のおからへミセルロース分解力の比較

アセトン抽出処理後の8つの市販酵素を用い、酵素活性測定の基質としてはH-B画分を用い、時間毎の反応液の還元糖の経時変化でその分解力を測定した。その結果を、図-4に示した。なお、基質として市販キシランを用いた場合、市販酵素アセトン処理の1回目と2回目の酵素活性は、大きな差が見られなかった。

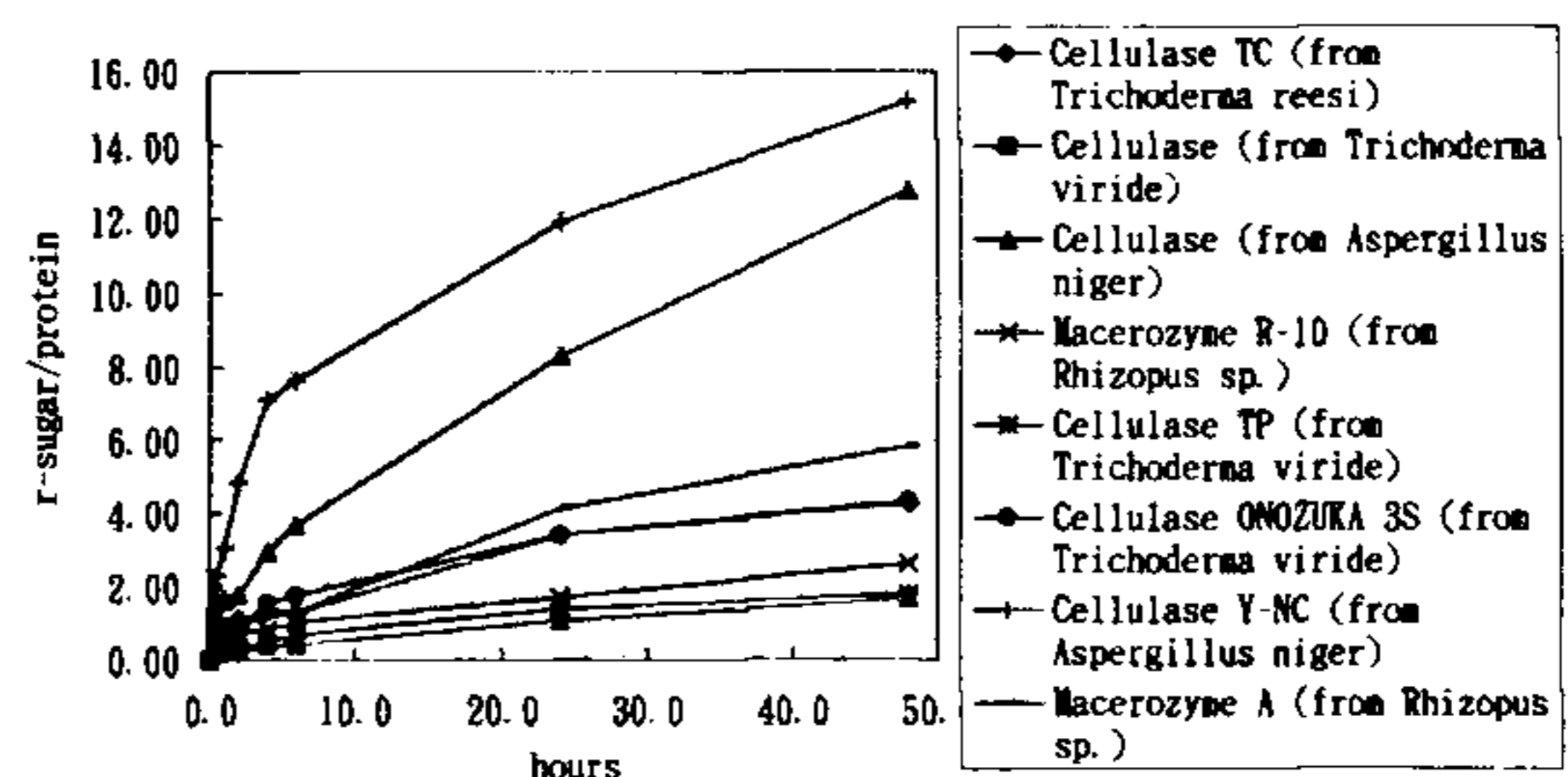


図-4 市販酵素のヘミセルロース (H-B) 分解力比較試験

市販の細胞壁溶解酵素やセルラーゼ系の酵素を、アセトン抽出で簡易精製した。反応条件は、各酵素の蛋白質濃度を0.5%にそろえて、基質はおからから抽出したヘミセルロース画分 (H-B) を0.25%で、100mM酢酸バッファー (pH5.0)、40℃で振とうさせた。沸騰水中で反応を停止させ、ソモギー・ネルソン法で還元糖を測定した。

3-6 小腸アセトンパウダーを用いた消化性試験

おからからのオリゴ糖ミクスチャーがほ乳類の消化酵素で分解されるかどうかで、ビフィダス菌の栄養因子になるかを判定するために、市販の小腸アセトンパウダーで消化試験を行った。

ヘミセルロース画分酵素分解物であるオリゴ糖ミクスチャーのサンプルについて、小腸アセトンパウダーによる消化性試験を行った。オリゴ糖ミクスチャーに小腸アセトンパウダー (Rat, Mouse) を加え、37℃、120rpmで反応させた。一定時間毎にサンプリングし、100℃で10分加熱で酵素を失活後、遠心分離し、上清の還元糖量の変化を測定した結果を図-5に示した。対照として行ったデンプンは時間とともに還元糖が増加していったが、おからオリゴ糖ミクスチャーは、あまり増加しなかった。また、消化酵素で分解されないブナとカラマツのヘミセルロースの還元糖は、ほとんど増加しなかった。

また、全体的な様子を見るため高速液体クロマトグラフで測定した経時的なパターン変化を図-6に示した。

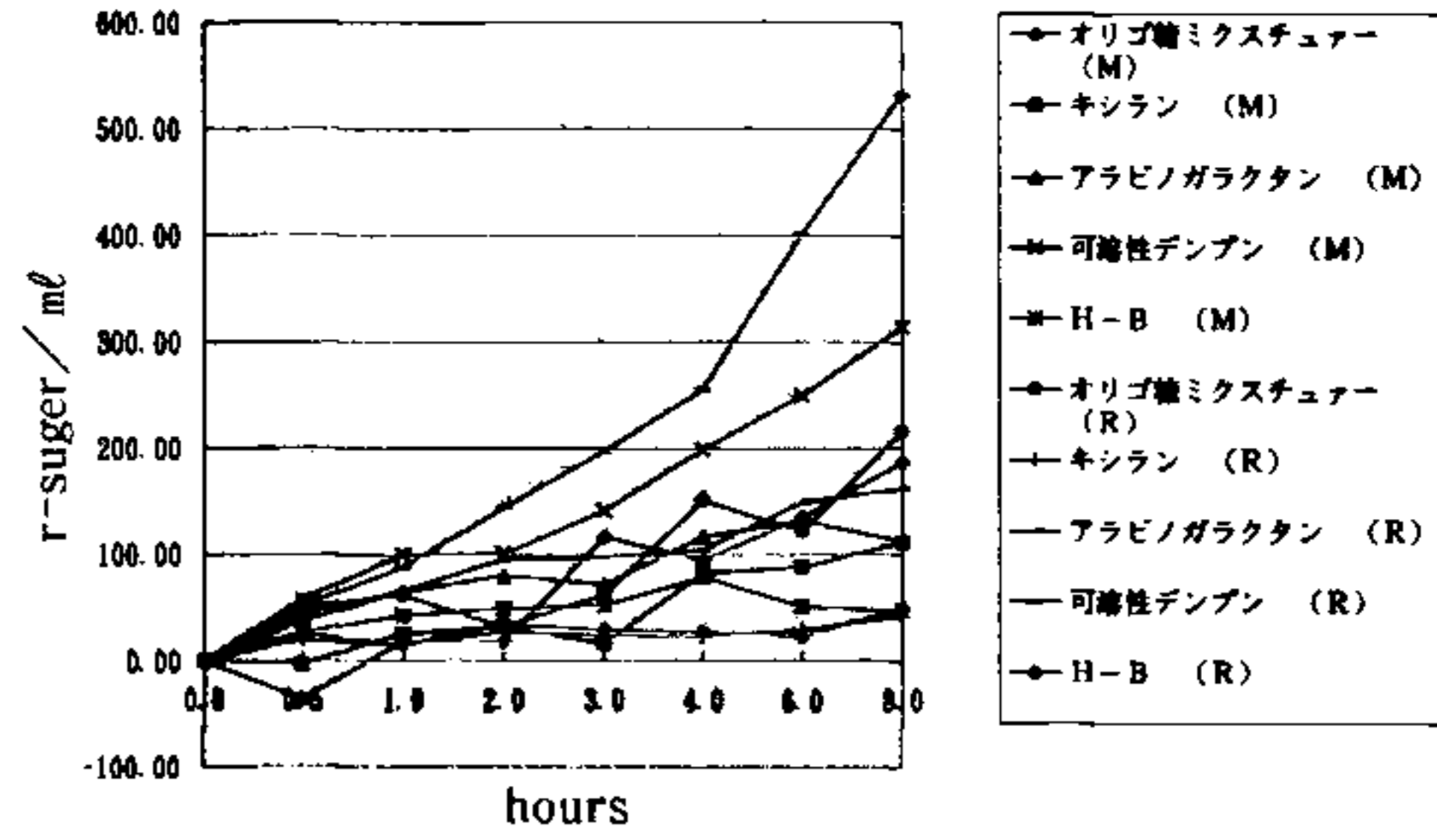
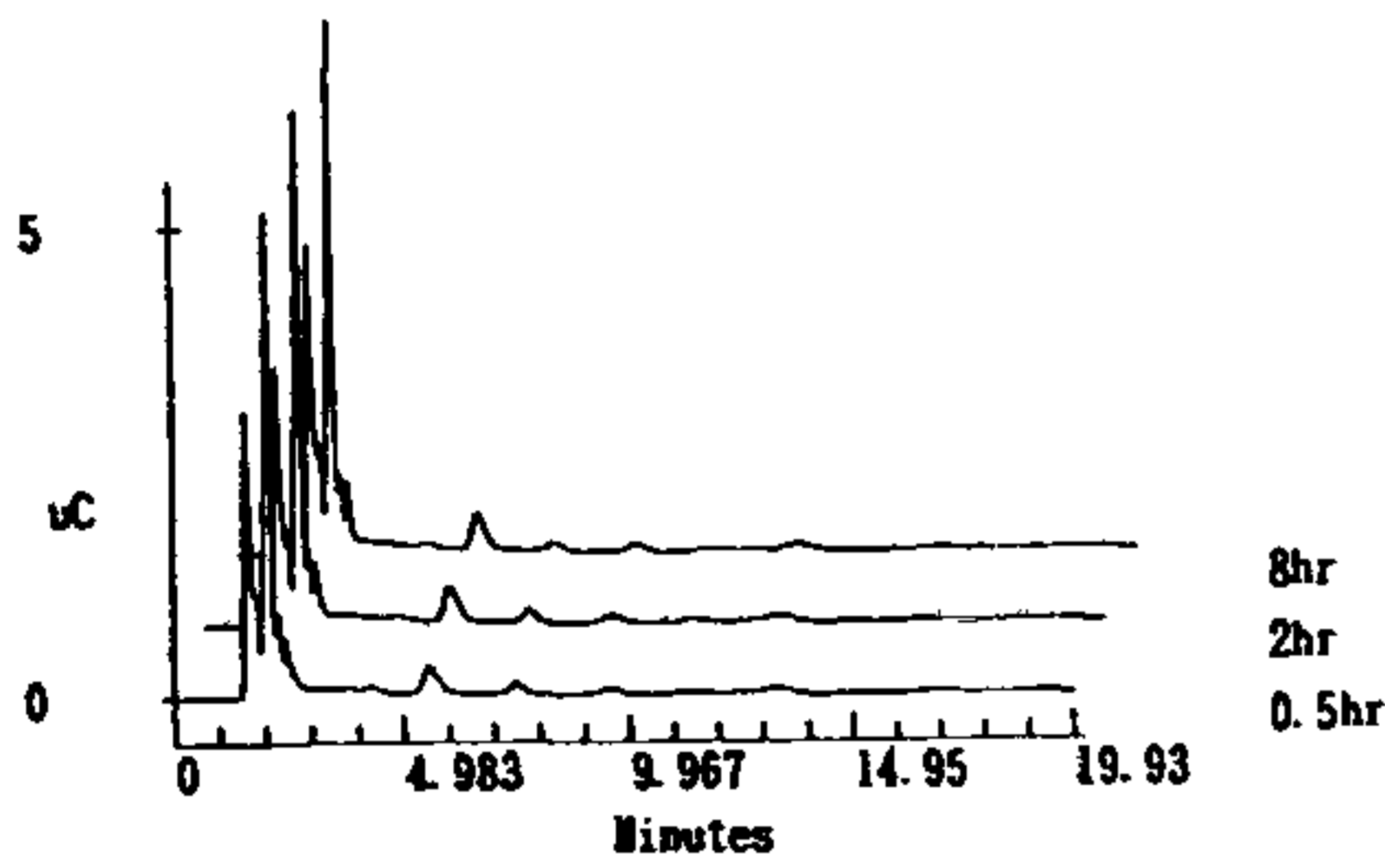
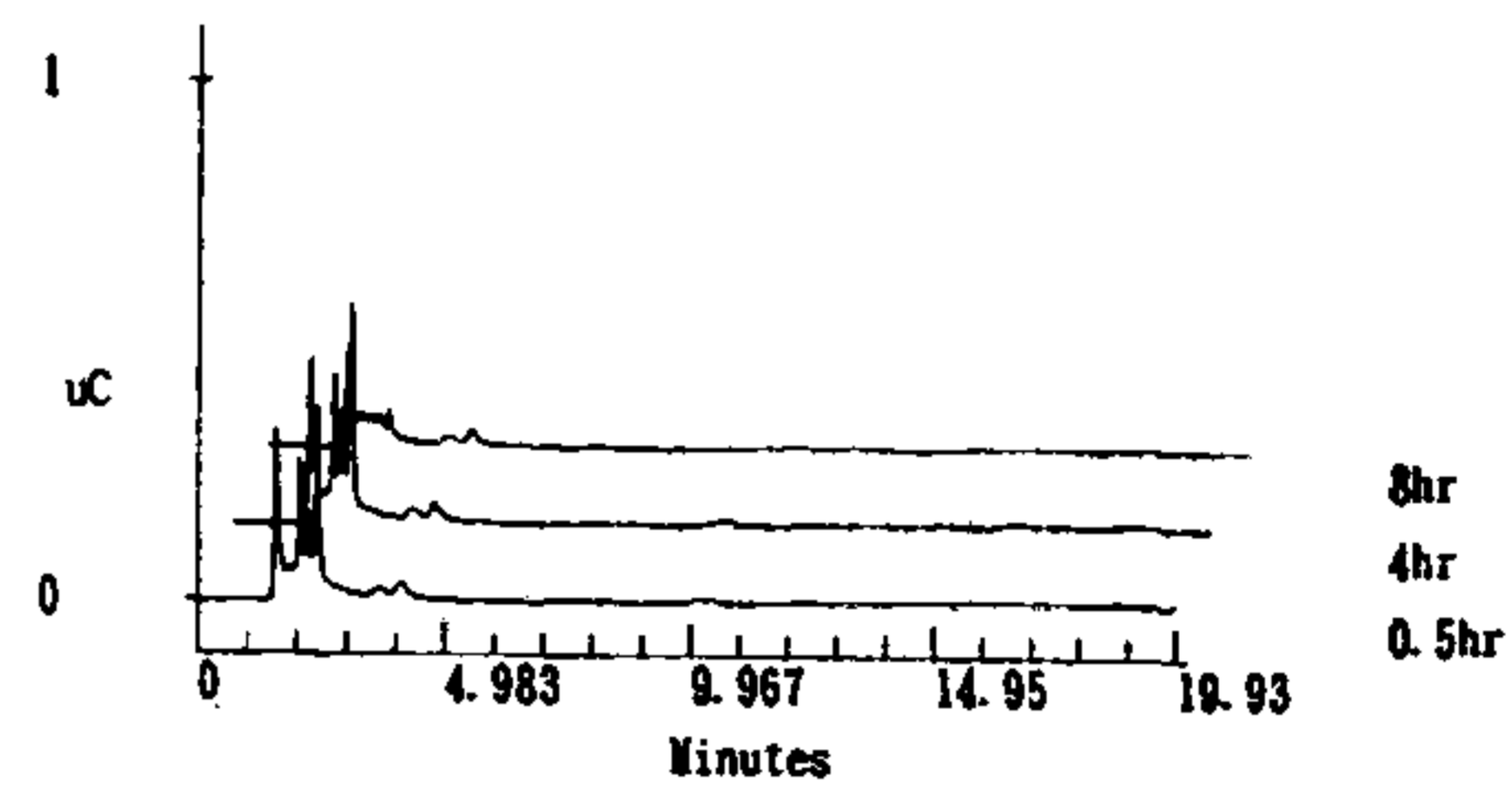


図-5 おからオリゴ糖ミクスチャーに小腸アセトンパウダーを作用させた消化性試験の還元糖の経時変化

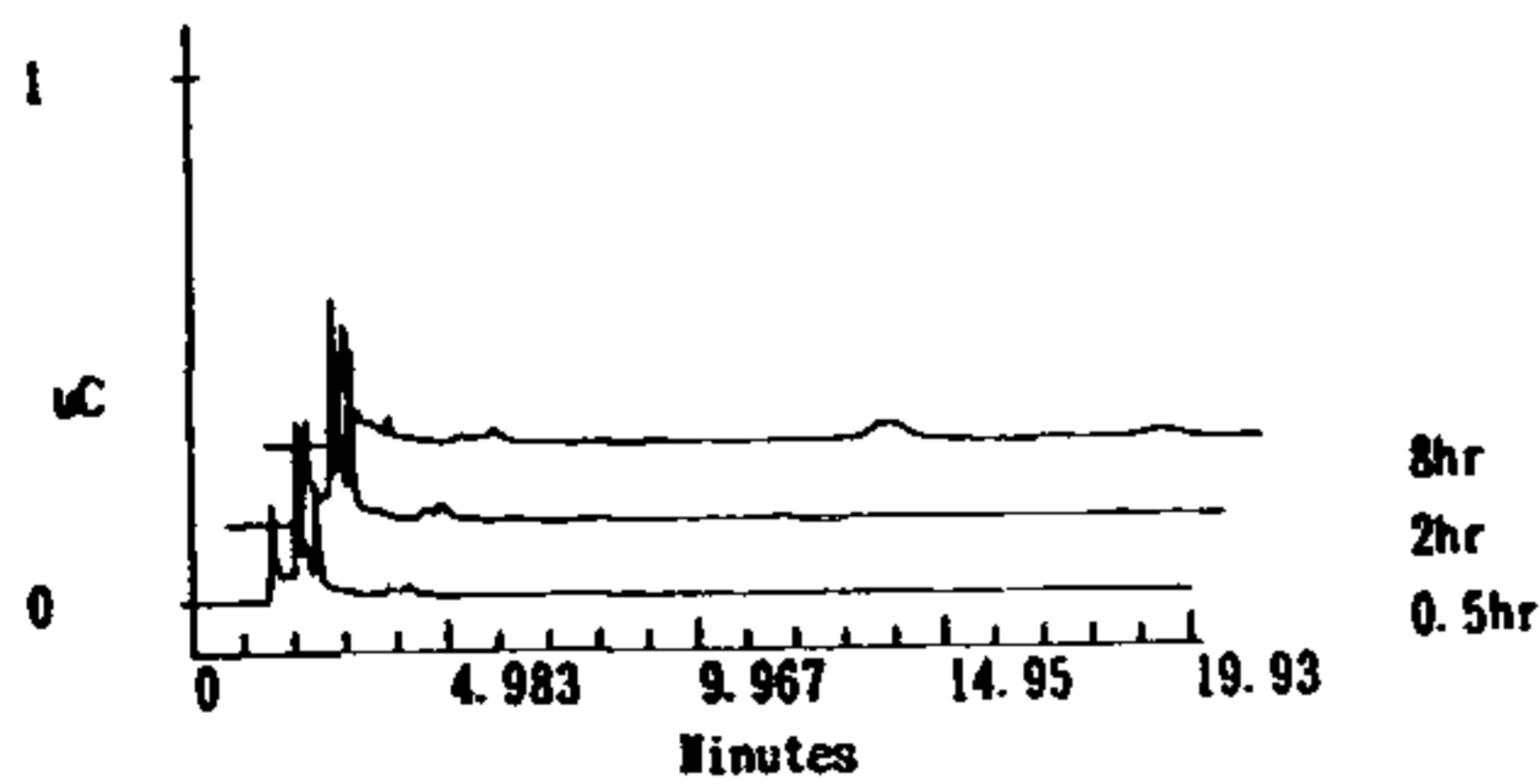
ヘミセルロース画分を10日間酵素分解反応した後のオリゴ糖ミクスチャーのサンプルについて、小腸アセトンパウダーによる消化性試験を行った。1 N-NaOHでpH7.5に調整したオリゴ糖ミクスチャー10mlに小腸アセトンパウダー (Rat, Mouse) 10mgを加え、37℃、120rpmで反応させた。一定時間毎に1 mlずつサンプリングし、100℃で10分加熱後、遠心分離し、上清の還元糖量をネルソンソモギー法で測定した。



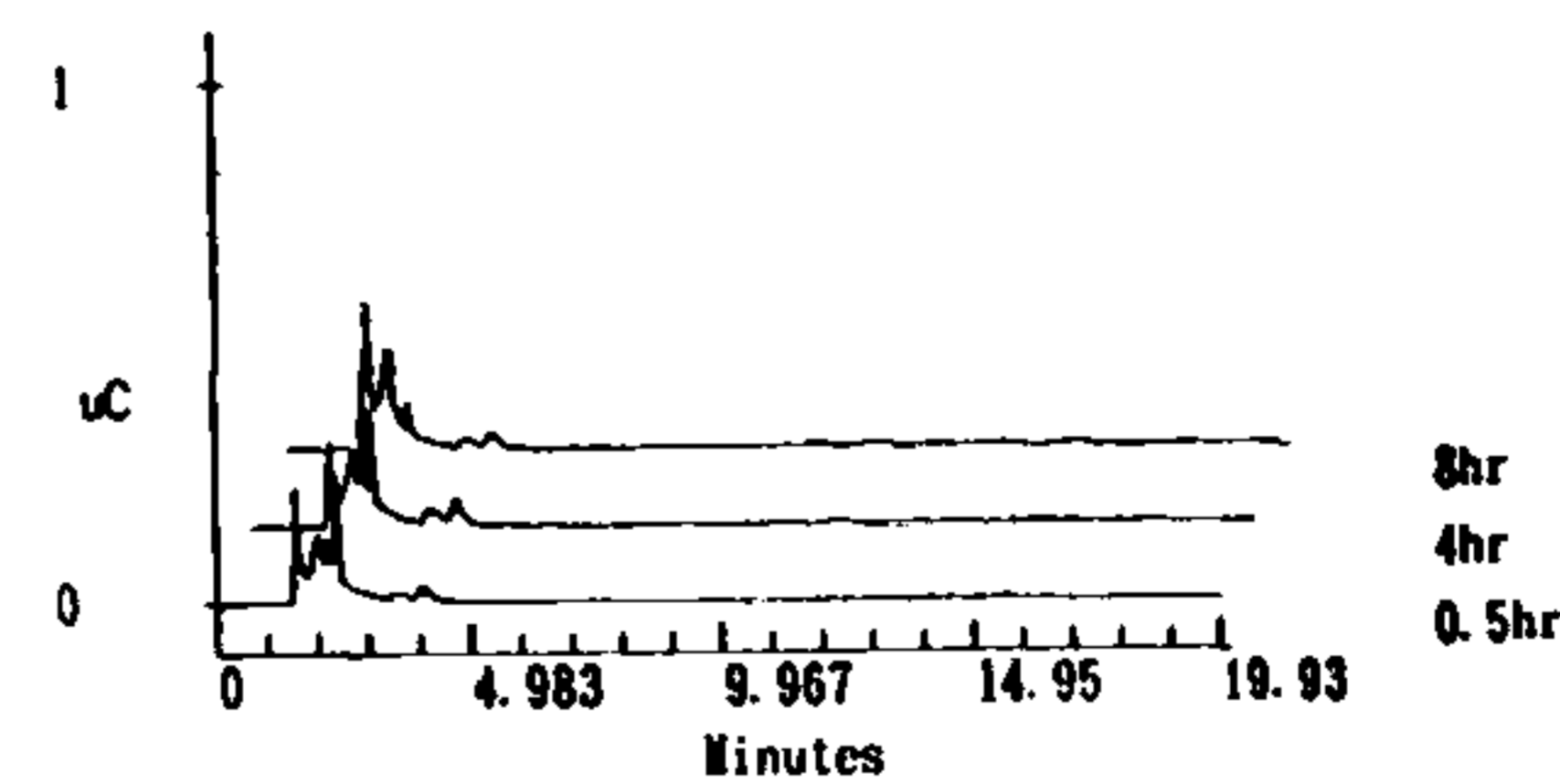
おからオリゴ糖ミクスチャーをマウス小腸アセトンパウダー消化



ブナキシロース (シグマ) をマウス小腸アセトンパウダー消化



でんぷん (ナカライテイスク) をラット小腸アセトンパウダー消化



カラマツアラビノガラクトン (シグマ) をラット小腸アセトンパウダー消化

図-6 小腸アセトンパウダーを用いた消化性試験の高速液体クロマトグラフの経時的なパターン変化から見たおからオリゴ糖ミクスチャーの性質

ヘミセルロース画分を10日間酵素分解反応した後のオリゴ糖ミクスチャーのサンプルについて、小腸アセトンパウダーによる消化性試験を行った。比較する試料としては、市販のでんぷんとキシロース及びアラビノガラクトンを用いた。1 N-NaOHで、pH7.5に調整したオリゴ糖ミクスチャー10mlに小腸アセトンパウダー (Rat, Mouse) 10mgを加え、37℃、120rpmで反応させた。一定時間毎に1 mlずつサンプリングし、100℃で10分加熱後、遠心分離し、上清を高速液体クロマトグラフ (ダイオネクスBo-LO) で測定した。

4. 考 察

4-1 おからの食物繊維含量

酵素法で測定したおからの食物繊維の含量は、日本の食品分析で用いられている食品成分分析法の酸・アルカリ法に比べ、3倍もの含量が得られた。これにより、オリゴ糖の供給源として有望であることが明らかとなった。食物繊維の含量は、分析法で得られる数値が大きく異なることが知られているが、今回のおからの食物繊維の含量は、豆腐製造時に水溶性の大豆オリゴ糖が流出した後でも、今まで考えられていた以上に難溶性の成分が含まれており、おからは有望な食物繊維の供給源であった。

4-2 おからへミセルロース画分の特徴

おからを熱水処理後に脱リグニン・アルカリ・中和沈殿処理するだけで分画出来たへミセルロース画分(H-A)は、収量が0.23%と少なく、へミセルロースの5%を占める程度であった。しかし、このH-Aの成分は、トリフルオロ酢酸による完全分解で、キシロースが90%以上を占めるキシランを主体とするものであり、有力なキシロオリゴ糖生産の素材であった。また、簡単に高純度のキシランが得られたことから、このままの用途を検討することも有力と考えられる。

アルカリ・中和処理で沈殿しない画分に、脱塩・エタノール沈殿というステップを加えると、4%の収率で、おからへミセルロースが得られた。これはおからへミセルロースの95%を占める主要画分(H-B)であり、アラビノースとガラクトースが1:2の割合で構成されており、有力なビフィダス菌生育因子となるオリゴ糖生産の素材であった。

4-3 酵素の性質について

市販酵素をアセトン処理しただけのものを反応用に使ったので、オリゴ糖の生成効率に問題が生じた。いわゆるセルラーゼで言うところの高分子の糖をランダムに切断するエンドタイプと端から単糖に切断していくエクソタイプが混在しているレベルの酵素であり、エクソタイプで作られたオリゴ糖は次々と単糖レベルまで分解されてしまうため、ビフィダス菌生育因子としてより効果の高い4~6個の糖が結合したようなオリゴ糖は、高濃度では得られなかったと考えている。

市販酵素中に、いくつかのへミセルラーゼが含まれていることは、電気泳動プレートを利用したキシロース混濁プレートのクリアゾーン形成反応で、透明になる部位が分子量の異なる数カ所に見られることから推察できた。今後、エクソタイプのみキシラナーゼあるいはアラビノガラクタナーゼでの反応が有効と考えられるため、酵素の分離精製法の検討を進める必要がある。

4-4 おからオリゴ糖の生理活性

H-AあるいはH-B画分をへミセルラーゼで分解して得られた糖は、2糖類が中心と考えられた。アラビノガラクトオリゴ糖やキシロオリゴ糖は、2糖類から3糖類でも、ビフィダス因子としての生理活性があることが知られており⁽⁶⁾、本研究で得られた2糖類を中心としたアラビノガラクトオリゴ糖ミクスチャーあるいはキシロオリゴ糖のミクスチャーは、ビフィズス菌の栄養成分として有用な成分と考えられた。

4-5 これからの課題

生理活性の高いオリゴ糖を高濃度で生産するため、様々な酵素が含まれている市販のへミセルラーゼの分離精製を進め、オリゴ糖のみを生産する酵素を獲得したい。オリゴ糖の生理活性については、腸内細菌の資化性試験と動物による試験も検討している。また、本研究を進展させて、効率の良いオリゴ糖生産法を確立し、パンや麺への添加による物性等の品質改良効果等についても研究を進めていきたい。

本研究は、中小企業庁の平成5年度技術開発研究補助事業「おからからの有用オリゴ糖等の生産」により実施しました。御指導・御助言を頂いた工業技術院生命工学工業技術研究所 技術交流推進センター長山口宗男先生、食品総合研究所企画連絡室長谷口肇博士をはじめ、中小企業庁技術課及び東北通商産業局の関係各位に深謝いたします。また、原料のおからと品質管理に使用されている分析データを提供していただいた(株)平川食品、試験用の酵素を提供していただいたヤクルト薬品工業株式会社・明治製菓株式会社の関係者の方々に感謝いたします。

6. 文 献

- (1) 青木 裕、浅野千秋、江島暢昭、木島弘倫、佐藤哲也、谷口 等、丹野 務、渡辺篤二：「平成2年度大豆加工食品副産物高度利用研究開発事業報告書」、(財)食品産業センター、東京、1991、PP. 1-125
- (2) 科学技術庁資源調査会編：四訂 日本食品標準成分表(1982)
- (3) 河原秀久：醸協, 89, 355-363 (1994)
- (4) L. Prosky : J. Assoc. Off. Anal. Chem. : 68, 677-679 (1985)
- (5) H. Yamada, K. Sibata, H. Hara, N. Ishida, T. Sasaki, and H. Taniguti : *Biosci. Biochem.*, 58, 288-292 (1994)
- (6) 藤川茂昭、岡崎昌子、松元信也、古賀邦正：澱粉科学, 37, 69-77 (1990)