



Studies on Phosphoryl Oligosaccharides from Potato Starch

釜阪, 寛

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1997-09-17

(Date of Publication)

2012-07-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2162

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141207>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002162>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かま 釜	さか 阪	ひろし 寛	(大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)			
学位記番号	博ろ第38号			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
学位授与の日付	平成9年9月17日			
学位論文題目	Studies on Phosphoryl Oligosaccharides from Potato Starch (馬鈴薯澱粉由来リン酸化オリゴ糖に関する研究)			

審査委員	主査	教授	新家	龍
		教授	相菌	泰生
		教授	青木	健次
			教授	岸原
				士郎

論文内容の要旨

わが国の平成5年度の国民栄養調査によると、主な栄養素の摂取量は充足または上回っており、平均摂取量が所要量を下回っている栄養素はカルシウムだけである。すなわち、カルシウムは生体にとって重要なミネラルの一つにもかかわらず現在でも一日当たりの平均摂取量が537mgであり、依然として所要量の600mgを下回っている状況である。食事摂取による生体へのカルシウム供給量が減少すれば骨からカルシウムを遊離して供給することになり、骨粗鬆症等の疾患の原因とされ、現代の社会的な問題にまで発展している。カルシウムの吸収に関する因子としてビタミンD等の関与があるが、第一義的には、主な吸収部位である小腸での可溶性のカルシウムを増加させることが重要である。ところが、小腸の腸管内pHは中性から微アルカリ性であり、このような条件下ではカルシウムは無機リンと結合して不溶性の塩を形成して沈殿しやすくなるため、その摂取量の約50%が不溶性カルシウムとして排泄されてしまう。さらに、現代の加工食品には無機リンが多く含まれており、カルシウムの不溶化が容易に進むと考えられる。このように、単に摂取量を増加させても吸収量が増加するか否かは疑問であり、逆に過剰摂取は他のミネラルバランスから考えても決して推奨される策ではない。このような視点からカルシウムの吸収率を上昇させる物質として近年、牛乳カゼインのプロテアーゼ分解物であるホスホペプチド(CPP)が研究され食品に既に利用されている。しかし、CPPは高価な素材であるとともにペプチド特有の苦味があり、その利用には制限がある。本論文は、このような背景からカルシウム吸収に関する問題点に対する解決策の検討を、実用化をめざして行ったものである。

第1章では、馬鈴薯澱粉からリン酸化オリゴ糖の調製方法とこのオリゴ糖のカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果について、*in vitro*および*in vivo*の結果を示した。さらに、リン酸化オリゴ糖は、結合リン酸基を1個有する重合度3~5のオリゴ糖と、結合リン酸基を少なくとも2個有する重合度4~8のオリゴ糖から構成されていることが分かった。このような分子内リン酸基数とカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果の相関について検証した結果、分子内に少なくとも2個のリン酸基を有する場合に顕著な効果を示すことを明らかにした。この効果は、既に食品で用いられているCPPのそれと同等であり、カルシウムを有効利用するための食品素材としての可能性を示した。

第2章では、このリン酸化オリゴ糖について、化学的および酵素的分析を組み合わせることで、その構造を明らかにした。これにより、馬鈴薯澱粉のリン酸基の結合位置についてこれまで明らかにされていたグルコース残基の6位に結合している以外に、3位にもリン酸基が存在し、その比率が、およそ7 : 3であることを明確にするとともに、リン酸基結合位置の新たな簡便分析方法を提案した。さらに、馬鈴薯澱粉にはリン酸基が近接して存在する箇所が存在することも新たに明らかにした。

第3章、4章では、馬鈴薯由来リン酸化オリゴ糖の主な画分が、結合リン酸基を分子内に1個有する重合度3~5の直鎖のオリゴ糖であることから、高い活性を示すとされる、分子内に少なくとも2個以上のリン酸基を有する物質に改良する方法を検討し、転移酵素を用いる方法とメイラード反応を用いる2つの方法を提案した。まず、転移酵素処理により主に重合度5のオリゴ糖が分子間転移して重合度が8あるいは11程度に増加し、分子内に複数個のリン酸基を有する画分が生成することが明らかになった。次に、食品加工の上で頻繁に生じるメイラード反応を利用することで、タンパク質のアミノ基に、複数個のリン酸化オリゴ糖の還元末端が反応して結合したハイブリッドが生成した。以上の結果は、カルシウム沈殿阻害効果を有する物質を安価に、しかも安全に生産することが可能であることを示している。同時に、これら2種類の処理によってカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果が確かに上昇することも明らかになった。

第5章では、カルシウムについて摂取不足になりがちな鉄についてとりあげ、リン酸化オリゴ糖の鉄可溶性を調べた。本効果は、鉄と不溶性の沈殿を形成する重炭酸イオンやリン酸イオンの存在下で調べた。リン酸化オリゴ糖のうち、分子内に1個のリン酸基を有する画分のリン酸化オリゴ糖は、それと等分子数の鉄を可溶化した。一方、分子内に2個以上のリン酸基を有する画分のリン酸化オリゴ糖は、その10分子以上の鉄を可溶化しうることが明らかになった。つまり、鉄の可溶性効果においてもカルシウムの場合と同様、分子内のリン酸基数が影響することを明確にした。

第6章では、リン酸化オリゴ糖への幾つかのアミラーゼ類の作用様式について検討した。つまり、リン酸基の近隣はアミラーゼの加水分解を受け難く、難消化性であり、6位にリン酸基が結合したリン酸化オリゴ糖と、3位にリン酸基が結合したリン酸化オリゴ糖で、それぞれ酵素作用が異なることが明らかになった。さらに、それらの作用様式を比較した結果、ある種のアミラーゼは特徴的な作用様式を有しており、リン酸化オリゴ糖がアミラーゼの同定分類に利用し得ることを提示した。

以上の結果から、著者らが開発したリン酸化オリゴ糖は、カルシウムや鉄の可溶性という新しい機能を有しており、従来から研究されてきたオリゴ糖の機能である整腸作用や虫歯予防、そして低カロリー等に加え、オリゴ糖の第4の機能が提案できたと思われる。カルボキシル基を持つ多糖、例えばアルギン酸やペクチンについても、カルシウム沈殿阻害効果が認められるが、これらは低分子化すると効果が減少あるいは消失することも明らかにした。すなわちカルボキシル基の場合、リン酸基と異なり高分子であることが必要であり、それらは、比較的高粘度物質である。従って、それらの用途に制限が加わることから、利用面ではリン酸基を有する物質の方が優れていると考えられる。また、食品にとって味覚はもっとも重要な因子のひとつである。このリン酸化オリゴ糖はCPPと異なり、苦味は全く感じられないのも大きな特徴である。

一方、日本の澱粉糖化産業において、年間に少なくとも25万トンの馬鈴薯澱粉が、アミラーゼを用いて処理されている。その廃液を調査した結果、本リン酸化オリゴ糖が多く含まれていることが明らかになった。現在、廃棄されている本リン酸化オリゴ糖を回収してその利用拡大を図ることは、いわゆるバイオマスの有効利用というだけでなく、環境問題という側面からも強く望まれているものである。

このように、リン酸化オリゴ糖は馬鈴薯澱粉由来であることから食品としてもきわめて安全であり、しかも安価に製造できるため乳児から老人まであらゆる層の人のための機能性食品素材として幅広い応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

わが国の平成5年度の国民栄養調査によると、主な栄養素の摂取量は充足または上回っており、平均摂取量が所要量を下回っている栄養素はカルシウムだけである。すなわち、カルシウムは生体にとって重要なミネラルの一つにもかかわらず現在でも一日当たりの平均摂取量が537mgであり、依然として所要量の600mgを下回っている状況である。食事摂取による生体へのカルシウム供給量が減少すれば骨からカルシウムを遊離して供給することになり、骨粗鬆症などの疾患の原因とされ、現代の社会的な問題にまで発展している。カルシウムの吸収に関する因子としてビタミンD等の関与があるが、第一義的には、主な吸収部位である小腸での可溶性のカルシウムを増加させることが重要である。ところが、小腸の腸管内pHは中性から微アルカリ性であり、このような条件下ではカルシウムは無機リンと結合して不溶性の塩を形成して沈殿しやすくなるため、その摂取量の約50%が不溶性カルシウムとして排泄されてしまう。さらに、現代の加工食品には無機リンが多く含まれており、カルシウムの不溶化が容易に進むと考えられる。このように、単に摂取量を増加させても吸収量が増加するか否かは疑問であり、逆に過剰摂取は他のミネラルバランスから考えても決して推奨される策ではない。このような視点からカルシウムの吸収率を上昇させる物質として近年、牛乳カゼインのプロテアーゼ分解物であるホスホペプチド(CPP)が研究され食品に既に利用されている。しかし、CPPは高価な素材であるとともにペプチド特有の苦味があり、その利用には制限がある。本論文は、このような背景からカルシウム吸収に関する問題点に対する解決策の検討を、実用化をめざして行ったものである。

第1章では、馬鈴薯澱粉からリン酸化オリゴ糖の調製方法とこのオリゴ糖のカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果について、*in vitro*および*in vivo*の結果を示した。さらに、リン酸化オリゴ糖は、結合リン酸基を1個有する重号度3~5のオリゴ糖と、結合リン酸基を少なくとも2個有する重合度4~8のオリゴ糖から構成されていることが分かった。このような分子内リン酸基数とカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果の相関について検証した結果、分子内に少なくとも2個のリン酸基を有する場合に顕著な効果を示すことを明らかにした。この効果は、既に食品で用いられているCPPのそれと同等であり、カルシウムを有効利用するための食品素材としての可能性を示した。

第2章では、このリン酸化オリゴ糖について、化学的および酵素的分析を組み合わせることで、その構造を明らかにした。これにより馬鈴薯澱粉のリン酸基の結合位置についてこれまで明らかにされていたグルコース残基の6位に結合している以外に、3位にもリン酸基が存在し、その比率が、およそ7:3であることを明確にするとともに、リン酸基結合位置の新たな簡便分析方法を提案した。さらに、馬鈴薯澱粉にはリン酸基が近接して存在する箇所が存在することも新たに明らかにした。

第3章、4章では、馬鈴薯由来リン酸化オリゴ糖の主な画分が、結合リン酸基を分子内に1個有する重合度3~5の直鎖のオリゴ糖であることから、高い活性を示すとされる、分子内に少なくとも2個以上のリン酸基を有する物質に改良する方法を検討し、転移酵素を用いる方法とメイラード反応を用いる2つの方法を提案した。まず、転移酵素処理により主に重合度5のオリゴ糖が分子間転移して重合度が8あるいは11程度に増加し、分子内に複数個のリン酸基を有する画分が生成することが明らかになった。次に、食品加工の上で頻繁に生じるメイラード反応を利用することで、タンパク質のアミノ基に、

複数個のリン酸化オリゴ糖の還元末端が反応して結合したハイブリッドが生成した。以上の結果は、カルシウム沈殿阻害効果を有する物質を安価に、しかも安全に生産することが可能であることを示している。同時に、これら2種類の処理によってカルシウム-リン酸の沈殿形成阻害効果が確かに上昇することも明らかになった。

第5章では、カルシウムについて摂取不足になりがちな鉄についてとりあげ、リン酸化オリゴ糖の鉄可溶化能を検討した。本効果は、鉄と不溶性の沈殿を形成する重碳酸イオンやリン酸イオンの存在下で調べた。リン酸化オリゴ糖のうち、分子内に1個のリン酸基を有する画分のリン酸化オリゴ糖は、それと等分子数の鉄を可溶化した。一方、分子内に2個以上のリン酸基を有する画分のリン酸化オリゴ糖は、その10分子以上の鉄を可溶化しうることが明らかになった。つまり、鉄の可溶化効果においてもカルシウムの場合と同様、分子内のリン酸基数が影響することを明確にした。

第6章では、リン酸化オリゴ糖への幾つかのアミラーゼ類の作用様式について検討した。つまり、リン酸基の近隣はアミラーゼの加水分解を受け難く、難消化性であり、6位にリン酸基が結合したリン酸化オリゴ糖と、3位にリン酸基が結合したリン酸化オリゴ糖で、それぞれ酵素作用が異なることが明らかになった。さらに、それらの作用様式を比較した結果、ある種のアミラーゼは特徴的な作用様式を有しており、リン酸化オリゴ糖がアミラーゼの同定分類に利用し得ることを提示した。

以上の結果から、著者らが開発したリン酸化オリゴ糖は、カルシウムや鉄の可溶化という新しい機能を有しており、従来から研究されてきたオリゴ糖の機能である整腸作用や虫歯予防、そして低カロリー等に加え、オリゴ糖の第4の機能が提案できたと思われる。カルボキシ基を持つ多糖、例えばアルギン酸やペクチンについても、カルシウム沈殿阻害効果が認められるが、これらは低分子化すると効果が減少あるいは消失することも明らかにした。すなわちカルボキシル基の場合、リン酸基と異なり高分子であることが必要であり、それらは、比較的高粘度物質である。従って、それらの用途に制限が加わることから、利用面ではリン酸基を有する物質の方が優れていると考えられる。また、食品にとって味覚はもっとも重要な因子のひとつである。このリン酸化オリゴ糖はCPPと異なり、苦味は全く感じられないのも大きな特徴である。

一方、日本の澱粉糖化産業において、年間に少なくとも25万トンの馬鈴薯澱粉が、アミラーゼを用いて処理されている。その廃液を調査した結果、本リン酸化オリゴ糖が多く含まれていることが明らかになった。現在、廃棄されている本リン酸化オリゴ糖を回収してその利用拡大を図ることは、いわゆるバイオマスの有効利用というだけでなく、環境問題という側面からも強く望まれているものである。

このように、リン酸化オリゴ糖は馬鈴薯澱粉由来であることから食品としてもきわめて安全であり、しかも安価に製造できるため乳児から老人まであらゆる層の人のための機能性食品素材として幅広い応用が期待できる。

以上の内容について慎重に審査・討議した結果、本論文は新しい機能性食品素材としての馬鈴薯澱粉由来のリン酸化オリゴ糖の実用化を見据えた研究であり、また、バイオマスの有効利用に繋がる価値ある集積であると認める。よって、学位申請者は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。