

新解説

グルテンフリー製品への酵素の利用 (1)

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2}

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)³ 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)³

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会会長, ³ 神戸女子短期大学

Key Words : グルテンフリー 酵素

本論文「新解説 グルテンフリー製品への酵素の利用 (1)」は“Gluten-Free Cereal Products and Beverages” (Edited by E. K. Arendt and F. D. Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER) の第 11 章 Use of enzymes in the production of cereal-based functional foods and food ingredients by H. Goesaert, C, M, Courtin, and J. A. Delcour の一部を翻訳紹介するものである。

穀物ベースの機能食品と食品成分生産における酵素利用

はじめに

健康な生活に毎日の食事が重要であることが次第に認識されてきた。消費者は味と栄養価のみで食品を判断するのではなく、健康と安全性を基準に食品を判断する。機能性食品および機能性食品成分は、健全かつ健康な身体となるように働き、クローン病等のリスクを減らし、体内機能にとって価値ある影響を及ぼすものであるが、消費するときには期待される正常な食事レベルで摂ることが望ましく (Ashwell, 2002), そこで消費者の新しい要求に応えることができる。科学のおよび商業の見地から機能食品の成分について関心は驚くほど高い。実際、機能性食品は健康促進成分を含有させて作られ、危険な成分を除去することによって生産される。また、天然成分の性質や特異的成分の改良により生産をすることができる (Ashwell, 2002)。

この章では、機能性食品および健康促進成分生産のため、穀物利用の可能性に焦点を絞った。特に主な部分では、我々は酵素の利用によって、いろいろな穀物炭水化物をいかに改良でき

るか、その食品成分の機能に結果を出せるかを検討する。この目的のため、主な酵素作用同様、各穀物炭水化物の全体を調査し、いかに酵素技術がその成分を改良して健康に関わる成分となるかも討論する。穀物炭水化物関連の機能食品成分のコンセプトの中で、我々は高分子量可溶性食物繊維、プレバイオティクスの非消化性オリゴ糖、および抵抗性デンプンを考察する。

この章の第 2 の部分では穀物タンパク質の機能的食品関連面を扱う。穀物タンパク質の酵素改良は健康促進成分の可能性を引き出すことができ、例えばバイオアクティブペプチド類 (それは心臓血管, 内分泌, 免疫, あるいはまた神経系に影響する) (Korhonen *et al.*, 1998; Korhonen and Pihlanto, 2003), われわれは主にグルテンフリー食品の酵素関連面について焦点を絞る。危険な成分 (グルテンの場合, セリアック病患者のため) の除去は機能性食品を作るための 1 つの方法 (Ashwell, 2002) で、グルテンフリー食品もそのように考えられる。

非デンプン性多糖類の機能的食品成分

穀物非デンプン性多糖類 (NSP) は、栄養的

観点からは重要である。それらは重要な食物繊維成分であり、健康促進食品成分となり、例えば非消化性オリゴ等のプロバイオティックな性質を持ったものである。

非デンプン性多糖類と NSP- 分解酵素アラビノキシラン

多くの穀物でも特に小麦、ライ麦中のアラビノキシラン成分は最も大きな NSP 区分である。それらは水抽出区分 (WE-AX), さらに、水不抽出区分 (WU-AX) の形で存在している。後者は細胞壁中で強く架橋しており (Iiyama *et al.*, 1994), アルカリ (AS-AX) と、酵素 (ES-AX) で溶ける。

WU-AX と WE-AX は両方とも一般的な構造の多分散多糖類である。内胚乳アラビノキシランはバックボーンが β -1, 4-結合の D-キシロピラノシル残基を含み、いずれも C(O)-3 か、あるいは C(O)-2 の位置でモノメリックの α -L-アラビノフラノース残基と未置換、あるいは置換している (Perlin, 1951a, 1951b)。C(O)-5 のアラビノース残基のあるものはフェノール酸にエステル結合している (例: フェルラ酸) (Fausch, *et al.*, 1963)。酸化条件下 (例: H_2O_2 /ペルオキシダーゼ系) で、WE-AX は 2 つのフェルラ酸残基間の共有結合によって架橋している (Vinkx *et al.*, 1991; Figueroa-Espinoza and Rouau, 1998)。

ふすまアラビノキシランにはさらに、置換基があり、例えばグルクロン酸、およびその 4-O-メチルエーテル、さらに、オリゴマー化したアラビノースの側鎖がついている (Voragen *et al.*, 1992)。アラビノキシランの置換程度はアラビノースとキシロース比 (A/X) で表され、典型的な平均値 0.5-0.6 で、これは一般の小麦とライ麦 WE-AX グループでの平均である (Cleemput, *et al.*, 1993; Vinkx and Delcour, 1996)。しかしながらアラビノキシラン亜グループは広い範囲の A/X 値、ほぼ 0.3-1.3 を示す (Cleemput, *et al.*, 1995; Dervilly *et al.*, 2000; Trogh *et al.*, 2005a; Vermimp *et al.*, 2007)。AS-AX はほんの

僅かの違いが分子量にあることを示し (Meuser and Suckow, 1986), さらに A/X 比 (Gruppen *et al.*, 1993) が WE-AX と比較された。また、いくつかのアラビノキシラン構造モデルは、アラビノースキシラン鎖に沿って非ランダム分布のアラビノース置換基を記述し、高度に分枝した領域が、低置換のより広い領域と連結が起こっている (Goldschmid and Perlin 1963, Gruppen, *et al.*, 1993)。アラビノキシランの構造と相対的な物理化学的性質は、その機能性を穀物ベースの加工、例えば製パン性に影響を与えている (Courtin and Delcour, 2002)。WE-AX の方は高度に粘度ある水溶液であり、一方、WU-AX は強い水分結合能を示す。

アラビノキシラン加水分解酵素

アラビノキシランはヘテロな構造のために、アラビノキシランの完全な加水分解は少々の各種加水分解酵素を必要とする (図 11.1)。エンド-(1, 4)- β -D-キシラナーゼはエンドキシラナーゼ (EC3.2.1.8) ともいい、主のアラビノキシラン分解酵素で、それらはアラビノキシランの内部を加水分解してキシランのバックボーンまで壊し、アラビノキシラン分子の分子量を低下させ、最終的には (アラビノ) キシロオリゴ糖 (A) XOS にする。ここでそれらは強くアラビノキシラン構造と機能に影響する。エンドキシラナーゼは、いくつかのエキソ酵素のタイプで助けられる。 α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC3.2.1.55) はアラビノキシラン (フラグメント) のアラビノース残基を放ち、エンドキシラナーゼが新たに攻撃する新しい場所を作る。他の代用物は、主にふすまアラビノキシラン中にあり、 α -D-グルクロニダーゼとアセチルキシランエステラーゼにより除去される。 β -D-キシロシダーゼ (EC3.2.1.37) は、アラビノキシラン区分を非還元末端から分解し、キシロースを引き離す。例えばフェルロイル (feruloyl) エステラーゼのようなフェノール酸エステラーゼは、アラビノース側鎖とフェノール酸の間のエステル結合を加水分解する。さら

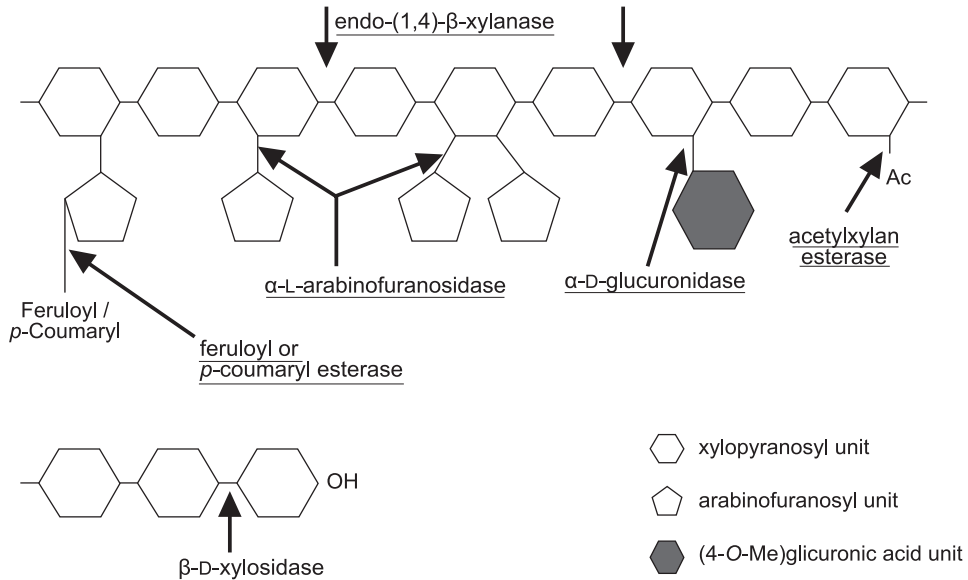


図 11.1 基質キシランへの酵素作用の全体図 Collins *et al.* (2005)

に、異なった補助的酵素活性は、例えば溶解性、分子量のような基質の性質の違いで変わる。

アミノ酸配列、構造の類似性に基づいて、エンドキシラナーゼの大部分は2つのグルコサイドハイドラーゼ (GH) グループ、GH10 と GH11 に分かれる (Henrissat 1991, Goutinho and Henrissat, 1999) , 各酵素は異なる構造と、触媒の性質を有する (Jeffries, 1996; Biely *et al.*, 1997; Torronen and Rouvinen 1997)。GH5, 8, および 43 に属するいくつかのエンドキシラナーゼは、同定され (Coutinho and Henrissat, 1999) , 詳細に研究された。上述したそれぞれの GH 群は微生物のエンドキシラナーゼに含まれ、全ての植物エンドキシラナーゼはこれまで同定され、穀物のもも含まれて、GH10 にクラス分けされた (Simpson *et al.*, 2002)。エンドキシラナーゼは基質に対するそれらの作用機作が異なっている。これは得られた加水分解生成物の種類、サイズの違いから明らかである。エンドキシラナーゼの機能性はいくつかのパラメーターに基づき、それは生化学的酵素の性質 (例えば pH, 至適温度) , 基質特異性、基質選択性、さらに、タンパク質性エンドキシラナーゼ阻害剤に対する感受性である。

エンドキシラナーゼは一般に穀物の加工時に、穀物加工性および製品品質改良に用いられる。製パンではエンドキシラナーゼ添加は、製パンの初期段階でドウの安定性を増加し、オープンライズを延長し、製パンにはより高い容積を与え、パンクラムの細かさ、柔らかさに加えて、より均一性を与える (Courtin *et al.*, 1999, 2001; Courtin and Dolcour, 2002; Goesaert *et al.*, 2006)。

基質特異性

両分類のエンドキシラナーゼは類似の触媒残基とメカニズムを有しているが、GH10 エンドキシラナーゼは GH11 エンドキシラナーゼに比べ特異性は低く、触媒的にも多く利用でき、より短フラグメントにして引きはなす。後の酵素は一段と容易にアラビノキシランのアラビノース置換基によって阻害される (Jeffries, 1996; Biely *et al.*, 1997; Trogh *et al.*, 2005a; Donnin *et al.*, 2006)。これは AS-AX 亜集団の A/X 比の異なるものを *Aspergillus aculeatus* GH10 と *Bacillus subtilis* GH11 エンドキシラナーゼを用いた分解研究で示された。両方の酵素とも、非活性と基質分解性は A/X 比の増加に伴って低下し、より高い A/X 比をもつアラビノキシ

ラングループは GH11 酵素によるキシラン性 (xylanolytic) 分解に対しほとんど抵抗を示すほどである (Trogh *et al.*, 2005a)。これはアラビノキシランの酵素的分解が、基質の性質 (例えば A/X 比の構造パラメーター) とアラビノキシランの酵素特徴性 (例えば比特異性) によるものである。

基質選択性

エンドキシラナーゼもまた基質選択性に変化があり、例えば WU-AX と WE-あるいは S-AX への相対的活性である。エンドキシラナーゼは WU-AX と WE-AX の両方を加水分解できるが、いくつかの酵素は水溶性基質 (WE-AX と S-AX) を好んで分解する。そして WU-AX には制限付き活性を持つ。一方、他は好んで WU-AX を水解する (Courtin *et al.*, 2001; Courtin and Delcour, 2002; Moers *et al.*, 2003, 2005; Bonnin *et al.*, 2006)。これは穀物加工でエンドキシラナーゼの適用性に影響する。WU-AX の加水分解で WU-AX の水結合能が低下し水溶性アラビノキシランとなり、さらに、その結果として水相の粘度増加がおこる。製パン性においては、この種のエンドキシラナーゼ作用は一般に価値あるものと考えられている。天然の WE-AX と S-AX の加水分解は、低分子量のアラビノキシラン区分を生じ、さらに、付属的に粘度低下させ、この作用は製パンではマイナスであると考えられている (Petit-Benvegnen *et al.*, 1998; Courtin *et al.*, 2001)。ドウ中における

ような WU-, WE-AX 両方を含むシステム中、エンドキシラナーゼのこれらの作用の各相対的な働きは、基質選択性によって決まる。しかしながら基質選択性のメカニズムや、特異性をもつ他の酵素の性質との関連は未だ不明のままである。この考えは、ここでは生化学的な見地よりも機能性、および実際の見地から考えるべきであろう (Moers *et al.*, 2005)。

阻害に対する感受性

エンドキシラナーゼの機能は、エンドキシラナーゼタンパク質性阻害剤によって影響され、それは穀物粒内部に存在する。異なった構造と特異性を持つ 3 タイプの穀物エンドキシラナーゼ阻害剤が同定され、記述され (表 11.1), 例えば TAXI- タイプ (Triticumaestivum L. endoxylanase inhibitor) (Debyser *et al.*, 1999; Gebruers *et al.*, 2001;2004;Goesaert *et al.*, 2003a, 2004), XIP-type (endoxylanase inhibiting protein) (McLauchlan *et al.*, 1999; Goesaert *et al.*, 2003b, 2004;Juge *et al.*, 2004), TLXI- タイプ (ソーマチン様-エンドキシラナーゼ阻害剤) (Fierens *et al.*, 2007) である。最近、酵素と阻害剤間のいくつかの結晶学的研究に基づくエンドキシラナーゼの分子エンジニアリング研究が行われ (Tahir *et al.*, 2002;Sansen *et al.*, 2004a, 2004b; Payan *et al.*, 2004; Fierens *et al.*, 2005), エンドキシラナーゼが穀物エンドキシラナーゼ阻害剤には不活性であると研究が進められた (Sibbesenana Sdresen, 2001; Tahir *et al.*, 2002)。

表 11.1 各穀物エンドキシラナーゼ阻害剤の比較

	TAXI-type ^a	XIP-type ^b	TLXI-type ^c
Molecular form	Monomer	Monomer	Monomer
Molecular mass	Form A: ~ 40kDa Form B: ~ 30+10kda	~ 30kDa	~ 18kDa
pI	>8.8	>8.0	>9.3
Glycosylation	Yes (limited)	Yes	Yes (modtly O-linked)
Specificity	GH 11 of fungal and bacterial origin	GH 10 and 11, of fungal origin	GH 11 of fungal and bacterial origin

^aGebruers *et al.* (2001, 2004).

^bFlatman *et al.* (2002), Juge *et al.* (2004).

^cFierens *et al.* (2007).

β-D-Glucan と β-D-glucan 水解酵素

アラビノキシランのように、β-D-グルカンは穀物細胞壁中に存在しており、ある一般的構造をもつ水抽出物、水不抽出物で示される。β-D-グルカンは長く、直鎖鎖の(約70%)のβ-(1,4)-、および(約30%)のβ-(1,3)-結合した-D-グルコピラノシル残基からなる不均一グループのポリマーである。さらに、β-D-グルカン鎖は、主(約90%)にはセロトリオシルとセロテトラオシルユニットのブロックからなり、単一のβ-(1,3)-結合で分離される。ほぼ10%の鎖は4-15の連続したβ-(1,4)-結合グルコース残基のブロックから成る(Wood *et al.*, 1991, 1994)。β-(1,3)-結合は、リボン状のβ-(1,4)-結合グルコース分子の形で伸展しているものを遮り、鎖によじれをおこさせ、β-D-グルカン鎖をより柔軟に、より可溶化し、セルロースよりも不活性を減らすようにする。β-D-グルカンの主な性質は高粘度一起泡性の可能性であり、それはβ-D-グルカンの構造によるだけでなく、その分子量と濃度にもよる(Fincher and Stone, 1986)。

ある種の酵素はβ-D-グルカンの内部結合を加水分解することができる。エンド-β-(1,3)(1,4)-グルカナーゼ(EC3.2.1.73 リヘナーゼ, GHs16-17)は、β-(1,3)-結合に隣接したβ-(1,4)-結合を切る。エンド-β-(1,4)グルカナーゼ(EC3.2.1.4, セルラーゼ)は、β-(1,4)-結合グルコースユニットに連続しているβ-D-グルカンのβ-(1,4)-結合をまず切る。あとの酵素は主に多くの異なった構造、性質を持つGHグループに見出される(Coutinho and Henrissat, 1999)。

可溶性食物繊維と酵素技術

穀物食物繊維

食物繊維は、植物の可食部分と定義され、また、類似の炭水化物と定義され、人の小腸で消化と吸収に抵抗性があり、大腸で一部あるいは完全に発酵(短鎖脂肪酸(SCFA)とガスに)される(American Association of Cereal Chemists, 2001)。可溶性食物繊維は血清コレステロールレベルを低下し、心臓病のリスクファ

クターの低下、人の食物血糖値レベルの低下を引き起こし、人の食事の中では重要な価値がある(Cummings *et al.*, 2004)。

一般に不溶性食物繊維は、高水分吸収能であり、大便の増量、軟化を引き起こす。また、それは便の大腸での透過時間を減らす(Manthey *et al.*, 1999, American Association of Cereal Chemists, 2001, 2003)。19-50才までの人にとって、推薦される食事摂取中の全食物繊維は男38g、女25gである(American Association of Cereal Chemists, 2003)。穀物NSPs、主にアラビノキシランとβ-D-グルカンであるが、セルロース、アラビノガラクトナンペプチドも全て食物繊維成分として分類することができる。それらのうちで特に可溶性区分に入るものは、健康に効果があるものと述べられる(Lanza *et al.*, 1987)。様々な研究によってβ-D-グルカンがコレステロール、血中グルコース低下剤として用いることができることを示したが、おそらくそれは高粘度の性質のためであろう(Klopfenstein, 1988; McIntosh *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1997; Hecker *et al.*, 1998; Cavallero *et al.*, 2002)。

United State Food and Drug Administration (FDA)によると、約3g/dayのβ-D-グルカン可溶性食物繊維の消費は血液コレステロールレベルを低下する(FDA, 1997)。アラビノキシランはまた栄養学の検知から重要である。Luと共同研究者らは(2000a, 2000b)、アラビノキシランは人の食後血糖値を低下し、インシュリン応答を低下すると述べた。さらに、アラビノキシランは粘度増加の性質のため血中コレステロールレベルを低下する(Bourdon *et al.*, 1999; Rieckhoff *et al.*, 1999)。さらに、アラビノキシランとβ-D-グルカンはプレバイオティクス効果がある(Charalampopoulos *et al.*, 2002; Crittenden *et al.*, 2002; Grasten *et al.*, 2003)。

可溶性高分子量アラビノキシランの生産

これまで示したように、可溶性アラビノキシラン(高分子量の)はWU-AXのアルカリ処理か、あるいは酵素処理変換で得られる。後者の

場合、エンドキシラーゼ活性と選択性およびインキュベーション条件（例えば時間、添加量）は、S-AXの回収量と性質（分子量）に大きく影響する。

食物成分として可溶性高分子量アラビノキシランの生産

in vitro 実験で、小麦 WU-AX の酵素的加水分解を異なった基質選択性を持ったエンドキシラーゼ等の一連のセットで進めたところ、アラビノキシランの構造的特徴の変化に選択的特徴を示した。すべての酵素試験で WU-AX のエンドキシラーゼ添加量を増やしてインキュベーションすると、アラビノキシランポリマーの溶解性が増え、S-AX 分子量の付随的低下が起こった (Moers *et al.*, 2005)。しかし、エンドキシラーゼの特異的可溶化活性は、基質選択性が伴って徐々に減少が観察された。さらに、選択的エンドキシラーゼで WU-AX 可溶化と S-AX 区分のその後の分解が起こると、見かけの分子量プロフィールに広い異なりが起こり、それは酵素の基質選択性によるものであった。こうして WU-AX に対し高度の選択性を持つ酵素は高レベルの S-AX を作り、それは低選択性の酵素を用いたものよりもより高分子量のものである。事実、GH11 *B. subtilis* XynA (WU-AX に対し高い選択性) の低添加量は、全キシロースの約 58% を溶かし約 410kDa の 1 つの重合度 (DP) のピークをもつ S-AX を生じた。一方、GH10A の *A. aculeatus* エンドキシラーゼ (WE-AX に高度の選択性ある) の低添加量では、元々の WU-AX 材料の全キシロースのわずか 13% が可溶化され、そして可溶化した区分の見かけピーク DP は約 12kDa であった (Moers *et al.*, 2005)。基質特異性と選択性には関係ないが (Moers *et al.*, 2005; Bonnin *et al.*, 2006)、基質特異性はアラビノキシラン区分の構造的性質を決める。事実、高特異的エンドキシラーゼは基質の存在で邪魔されるが、アラビノキシラン中に制限された数の結合だけを加水分解し、こうしてより大きなアラビノキシラン区分を生じる

(Trogg *et al.*, 2005a)。

酵素のパラメーターに加え、酵素的にアラビノキシランの可溶化は基質の性質によって影響を受け、それは付随的酵素やエンドキシラーゼ阻害剤の存在と同様である。WU-AX は細胞壁区分中に不可欠に存在しているため、細胞壁構築と異細胞壁構成成分間の相互作用はアラビノキシラン集団がかなりエンドキシラーゼで影響を受けやすくなるように決められている。一般に、外胚乳細胞壁は薄く、簡単にエンドキシラーゼで溶けやすい。対照として、ふすまアラビノキシランの酵素的可溶性はずっと制限される (Figuerola-Espinoza *et al.*, 2004; Maes *et al.*, 2004)。さらに、エンドキシラーゼ効果は各ふすま組織間で異なり、それは組織的、化学的不均一性のためである (Beaugr and *et al.*, 2004a)。しかしながら一般には、小麦粉 WU-AX (例えば *B. subtilis* Xyn A) を可溶化する活性の高い酵素はふすまからの可溶性繊維生成に効果的であった (Maes *et al.*, 2004)。

さらに、ふすまアラビノキシランのキシラン分解可溶性は、もっと低い A/X 比をもつ S-AX を生じ、さらにより高い置換不溶性残基を残した (Maes *et al.*, 2004)。GH11 *B. Subtilis* Xyn A と GH10 *A. aculeatus* 酵素が混合されるとき、可溶化に対する相乗効果はない。可溶化は、例えばエクストルージョンのようなふすま前処理によって改良される (Figuerola-Espinora *et al.*, 2004)。さらに、他のヘミセルロース分解酵素の作用、所謂 β -グルカナーゼのようなものは、細胞壁中のアラビノキシランのキシラン分解攻撃に対する感受性を増加できる。エンドキシラーゼと付随的酵素、例えばアラビノフラノシダーゼとエステラーゼによる相乗効果は、アラビノキシランの分解ではよく知られている (Kormelink and Voragen 1992) が、未だ不明なのは細胞壁構造の開化を助けるのに、後者の酵素がどの程度助けになるのかである。この点で、Petit-Benvegnen と協同研究者 (1998) は、小麦粉 WU-AX からのアラビノキシランの僅かな可溶性増加が、*A. niger* エンドキシラーゼ調製

品とフェルロイルエステラーゼ、セルラーゼ、あるいはエンド-β-グルカナーゼとを結びつける事で明らかにした。他の研究者らは、処理したライ麦ふすまからのアラビノキシラン可溶化は、エンド-β-グルカナーゼと *B. subtilis* エンドキシラナーゼの利用の結びつけるときのみであり、アラビノフラノシダーゼあるいはフェルロシルエステラーゼとのコンビネーションでは進まないと報告した (Figuroa-Espinoza *et al.*, 2004)。

また、それらのエンドキシラナーゼ作用への効果に加えて、エンドキシラナーゼ阻害剤はアラビノキシランにも同様に結合する (Rouau *et al.*, 2006; Fierens, 2007)。これは酵素的アラビノキシラン可溶化とアラビノキシラン脱重合化の間のバランスに影響を及ぼす可能性があり、それは生成する可溶性アラビノキシラン材料の純度に影響を与える可能性がある。

加工中の高分子量可溶性繊維の生産

エンドキシラナーゼ酵素技術利用の健康関連面への利用の考え方はすでに製パンで明らかにされている。外皮なし大麦粉と酵素技術の結びついた利用は、そのまま健康促進食物繊維成分のアラビノキシラン、β-D-グルカンのレベル増加を伴って、おいしい消費者受けのパン生産ができた (Trough *et al.*, 2004, 2005b, 2007)。合

成粉パンはアラビノキシラン含量の小麦粉パンよりわずかに高いのであるが、それらの可溶性アラビノキシラン含量 (WE-AX と S-AX の総量) は同程度である (0.3-0.4g/100g パン (表 11.2))。レシピにエンドキシラナーゼを加算すると、可溶性アラビノキシラン含量が増加した。それは WU-AX の可溶化のためである。こうしてエンドキシラナーゼはパン容積にプラスに貢献するのみならず、可溶性アラビノキシランのレベルの顕著な増加にも用いる事ができた。表 11.2 に示したように、外皮なし大麦粉とエンドキシラナーゼを混ぜて作ったパンは、全体的にアラビノキシラン、β-D-グルカンレベルが 1.8 倍ほどコントロール小麦粉パンのそれより高い。さらに、可溶性アラビノキシランと β-D-グルカンレベルは小麦粉パンに相当するものの 2.8 倍であった。可溶性食物繊維レベルの増加を引き起こしたエンドキシラナーゼは、非常に栄養的影響力がある。事実、エンドキシラナーゼを入れた 100g 小麦粉・皮なし大麦粉のパンによる毎日の消費は、3.1g 全アラビノキシランと 1.4g 可溶性アラビノキシランの取り込みと β-D-グルカンの取り込みが可能である (それは 100g 小麦粉パンの各 1.7g, 0.5g に相当する) が、これは推奨される典型的な健康へのプラス効果 (25g と 38g/day の間) (American Association of Cereal Chemists, 2003)

表 11.2 エンドキシラナーゼ^a 添加した場合、しない場合の、小麦粉 (WF) と合成粉 (WF+HBF)(60% 小麦粉と 40% 外皮無し大麦粉) 各パン中の全および可溶性 AX と β-D-グルカン含量 (% 乾物)

	WF bread (control)	WF bread + endoxylanase	WF + HBF bread	WF bread + HBF bread + endoxylanase
AX				
Total	1.4	1.4	1.9	1.9
Soluble	0.3	0.3	1.2	1.2
β-D-Glucan				
Total	0.3	0.3	1.2	1.2
Soluble	0.2	0.2	0.5	0.5
AX + β-D-Glucan				
Total	1.7	1.7	3.1	3.1
Soluble	0.5	1.2	0.9	1.4

^aTrough *et al.* (2004).

と可溶性食物繊維レベル（約 3g/日 β -D-グルカン可溶性食物繊維）（FDA, 1997）にあたる。

プレバイオティクスと酵素技術

穀物プレバイオティクス非消化性オリゴ糖

プレバイオティクスは、ホストの唾液および腸消化酵素によって消化されない食品成分であり、結局結腸でバクテリアにより発酵されるものである。最近の食物繊維の定義にうまく合致する。しかしながら、それらはホストに選択的な成長に刺激を与えるか、または結腸中のバクテリアの1種、あるいは制限数種の活性（大きく健康促進する）を刺激して有益な効果を示す（Gibson and Roberfroid 1995; Cummings *et al.*, 2004; Swennen *et al.*, 2006a）。非消化オリゴ糖（NDOs）、例えばイヌリンやフラクトオリゴ糖（FOS）のようなものは最もよく知られたプレバイオティクス物質である。NDOsのいくつかの健康促進効果が想定されている [Swennen *et al.*, (2006a), Mussatto and Mancilha (2007) を全体像を掴むのにはよいので参照]。価値ある効果の重要面として、結腸中で発酵の間 SCFAs への変化である。

結腸環境の酸性下は、ビフィズス菌および乳酸菌のようなバクテリアの成長に都合が良い。さらに、SCFAs は金属吸収、脂質、炭水化物のメタボリズム、免疫系、結腸ガンリスクに影響する（Swennen *et al.*, 2006a; Mussatto and Mancilha, 2007）。西欧社会で FOS は最もよく使われている NDOs であり、人にプレバイオティクス効果を与え、特に腸のビフィズス菌を増加する。しかしながらキシロオリゴ糖（XOS）は FOS よりも強いプレバイオティクス能を持つことを示した（Hsu *et al.*, 2004）。さらに、代用 XOS、すなわちアラビノキシロオリゴ糖（AXOS）も同様に強いプレバイオティクス能を持つ。それらはある健康促進ビフィズス菌によって発酵することができ（Van Laere *et al.*, 2000）、プロイラー（若鶏）およびラットの食事に AXOS の添加で顕著にビフィズス菌の増加することが報告された（Swennen, 2007）。

さらに、フェルラ酸（feruloyl）含有オリゴ糖は天然の抗酸化剤のような効果があるようだ（Yuan *et al.*, 2005）。

一般に、(A) XOS は非常に興味あるテクニカルな性質を示す。XOS および AXOS 両方とも、FOS に比べ広い範囲の pH と温度に安定である（Vazquez *et al.*, 2000; Swennen, 2007）。AXO は XOS（重合度 2-4 である）より甘さが低く、そして中性（neutral）の味である。AXOS を小麦、あるいは大麦ベースのプロイラー食事に添加すると、顕著な動物技術的性能パラメーター、例えばフィード返還率、体重量糖の改良が起こったが、等量の FOS 添加では全く効果がなかった（Swennen, 2007）。さらに、XOS 製品は典型的な重合度 2-4 の直線分子であるのに対し、AXOS は重合度と代用程度（A/X 比）の両方が異なる。この付加的な構造上の複雑さは、結腸の中、すなわち発酵の場所で起こる生理効果である。

最後に β -グルコオリゴ糖は、酵素的加水分解でオート麦ふすまの β -D-グルカンから得られるが、同様のプレバイオティクス効果があり、乳酸菌成長の促進をするとわかった（Jaskari *et al.*, 1998; Kontula *et al.*, 1998）。

アラビノキシロオリゴ糖の生産

一般に酵素加工法は NDOs（非消化オリゴ糖）生産の重要な道具である。一方、多くの NDOs は多糖類の分解物であるが、例えばキシラン、イヌリンのような後者の処理は、特別の酵素処理で好ましい NDOs を生じる。最近グルコシルトランスフェラーゼ、グルコシダーゼ、あるいはグルコシターゼのような酵素で単一の糖から NDOs の生産に非常に多くの関心が持たれている（Swennen *et al.*, 2006a）。無置換 XOS（キシロオリゴ糖）はキシランリッチの生材料から典型的な酵素や化学分解で得られる（Vazquez *et al.*, 2000; Mussatto and Mancilha, 2007）。しばしば低エキソキシラナーゼ、あるいは β -キシロシダーゼ活性を持つ酵素複合体は、キシロース生産を避けることが好ましい（Vazquez *et al.*,

2000)。

同様に AXOS は穀物アラビノキシランの酵素分解で作られる。エンドキシラナーゼ基質の特異性、基質の特徴、インキュベーション条件 (例えば時間、添加量) 等は AXOS 生産のサイズとその性質の決定を行う。純粋な酵素の利用で、構造の良い分解最終生産物を作る。市販の調整には一般に異なった酵素が含まれ、それが異なった加水分解パターンを示す。これまで述べたように、エンドキシラナーゼによるアラビノキシラン分解は、サイズ (DP) と成分 (置換度, A-X 比) の違ういろいろなアラビノキシラン区分を与える (Gruppen *et al.*, 1992; Kormelink *et al.*, 1993; Ordaz-Ortiz *et al.*, 2004; Swennen *et al.*, 2005)。この点, *A. aculeatus* の GH10 エンドキシラナーゼで小麦粉 WU-AX をインキュベーションすると, AX 多糖およびオリゴ糖の混合物が得られた (Swennen *et al.*, 2005)。より酵素量を増やし, インキュベーション時間を長くするとその結果, 分子量の小さいアラビノキシランができ, 一方, 平均 A/X 比は同じであるのでインキュベーション条件の重要性がわかる。*A. aculeatus* からの前述の GH10 エンドキシラナーゼを含む市販エンドキシラナーゼ調整品による AXOS 製造は, Rantanen と共同研究者により研究された (2007)。これらの著者らは, 大部分の AXOS 生産物は続いていくつかの AX 材の酵素的分解が起こりアラビノキシロビオースとなり, ライ麦 WE-AX 分解の場合には約 12% の量の定量的加水分解物ができることを見出した。

さらに, 異質性 AXOS 集団の分画が, AXOS 構造とその機能性の関係を調べるために必要である。異質性 AXOS 混合部は, 勾配エタノール調製法, または分子量の異なる限外濾過膜の

カットオフで分画された。これらの条件下で異なる AXOS 集団が得られ, それらは DP と A/X 比の両方で異なるものであった (Swennen *et al.*, 2005)。特異的 AXOS 分子を分けるのに, 他の技術, ゲルろ過法や準分取高性能陰イオン交換クロマトグラフィー法を用いた (Gruppen *et al.*, 1992; Kormelink *et al.*, 1993; Ordaz-Ortiz *et al.*, 2004)。

コストのかかる AXOS 生産には, 小麦ふすまのような高レベルのアラビノキシランの生材料を必要とする。しかしながらふすまからの可溶性繊維のキシラン生産の場合, この基質の酵素分解に対する感受性はかなり低い。GH11 エンドキシラナーゼは, GH10 キシラナーゼよりも小麦ふすま (代用) のキシロオリゴ等の生産には有用でありながら後者の酵素はより小さいアラビノキシラン区分を生産する (Beaugr and *et al.*, 2004b)。小麦ふすまに同時に両酵素が作用する時には生産物の生産には相乗効果は起こらず, GH10 キシラナーゼ単独生産の場合と生産物混合量は同程度である (Beaugr and *et al.*, 2004b)。小麦ふすまの酵素分解に基づく大スケールの AXOS 生産が進歩してきた (Swennen *et al.*, 2006b)。小麦ふすまからのデンプン, タンパク質の酵素的除去に続き, アラビノキシランに富んだ小麦ふすま区分は *B. subtilis* からの GH11 エンドキシラナーゼでインキュベートされた。得られた AXOS はキログラムスケールの生産物で, 純度, 回収量ともに比較的良好なものであった。ここで得られた AXOS は DD15, A/X 比 0.27 であり, 勾配エタノール沈殿法でさらに, 分離された小麦ふすま AXOS で異なった構造 (例えば OP 範囲 4 から 59 の間) と A/X 比が 0.13-0.43 の間のものが得られた (Swennen *et al.*, 2006b)。

References

- American Association of Cereal Chemists (2001). *Cereal Foods World* **46**: 112-126.
- American Association of Cereal Chemists (2003). *Cereal Foods World* **48**: 128-132.
- Ashwell, M. (2002). Concepts of Functional Foods. Washington DC: International Life Science Institute Press, 40pp.
- Beaugrand, J., Reis, D., Guillon, F., Debeire, P., and Chabbert, B. (2004a). *Int. J. Plant Sci.* **165**: 553-563.
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. (1997). *J. Biotechnol.* **57**: 151-166.
- Bonnin, E., Daviet, S., J. F. *et al.* (2006). *J. Sci. Food. Agric.* **86**: 1618-1622.
- Bourdon, I., Yokoyama, W., Davis, P. *et al.* (1999). *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 55-63.
- Cavallero, A., Empilli, S., Brighenti, F., and Stanca, A. M. (2002). *J. Cereal Sci.* **36**: 59-66.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., and Webb, C. (2002). *Int. J. Food Microbiol.* **79**: 131-141.
- Cleemput, G., Roels, S. P., Van Oort, M., Grobet, P. J., and Delcour, J. A. (1993). *Cereal Chem.* **70**: 324-329.
- Cleemput, G., van Oort, M., Hessing, M. *et al.* (1995). *J. Cereal Sci.* **2**: 73-84.
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005). *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 3-23.
- Courtin, C. M. and Delcour, J. A. (2002). *J. Cereal Sci.* **35**: 25-243.
- Courtin, C. M., Roelants, A., and Delcour, J. A. (1999). *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1870-1877.
- Courtin, C. M., Gelders, G. G., and Delcour, J. A. (2001). *Cereal Chem.* **78**: 564-571.
- Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes server. <http://www.cazy.org/>.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S. *et al.* (2002). *J. Sci. Food. Agric.* **82**: 781-789.
- Cummings, J.H., Edmond, L.M., and Magee, E.A. (2004). *Clin. Nutr. Suppl.* **1**: 5-17.
- Debyser, W., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., and Delcour, J. A. (1999). *J. Cereal Sci.* **30**: 39-43.
- Dervilly, G., Saulnier, L., Roger, P., and Thibault, J.-F. (2000). *J. Agric. Food Chem.* **48**: 270-278.
- Fausch, H., Kündig, W., and Neukom, H. (1963). *Nature* **199**, 28. FDA (Food and Drug Administration) (1997). *Fed. Reg.* **62**: 3584-3601.
- Fierens, E., Rombouts, S., Gebruers, K. *et al.* (2007). *Biochem. J.* **403**: 583-591.
- Fierens, K., Gils, A., Sansen, S. *et al.* (2005). *FEBS J* **272**: 5872-5882.
- Fierens, E. (2007). PhD dissertation, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven Belgium. Figueroa-Espinoza, M. C., Poulsen, C., Soe, J. B., Zargahi, M. R., and Rouau, X. (2004). *J. Agric Food Chem.* **52**: 4240-4249.
- Figueroa-Espinoza, M. C. and Rouau, X. (1998). *Cereal Chem.* **75**: 259-265.
- Fincher, G. B. and Stone, B. A. (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. In: Pomeranz, Y. ed. *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. VIII. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, pp.207-295.
- Flatman, R., McLauchlan, W. R., Juge, N. *et al.* (2002). *Biochem. J.* **365**, 773-781.
- Figueroa-Espinoza, M. C. Poulsen, C., Soe, J. B., Zargahi, M. R., and Rouau, X. (2004). *J. Agric Food Chem.* **52**: 4240-4249.
- Gebruers, K., Debyser, W., Goesaert, H., Proost, P., Van Damme, J., and Delcour, J. A. (2001). *Biochem. J.* **353**: 239-244.
- Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M. *et al.* (2004). *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 213-221.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995). *J. Nutr.* **125**: 1401-1412.
- Goesaert, H., Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2003a). *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3770-3775.
- Goesaert, H., Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2003b). *J. Cereal Sci.* **38**: 317-324.
- Goesaert, H., Elliott, G., Kroon, P. A. *et al.* (2004). *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 193-202.
- Goesaert, H., Gebruers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., and Delcour, J. A. (2006). In: Hui, Y. H., Corke, H., De Leyn, I., Nip, W.-K., and Cross, N. eds. *Bakery Products: Science and Technology*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Company, Chapter 19, pp. 337-364.
- Goldschmid, H. R. and Perlin, A. S. (1963). *Can. J. Chem.* **41**: 2272-2277.
- Grästen, S., Liukkonen, K.-H., Chrevatidis, A., El-Nezami, H., Poutanen, K., and Mykkänen. H. (2003). *Nutr. Res.* **23**: 1503-1514.
- Gruppen, H., Kormelink, F. J. M., and Voragen, A. G. J. (1993). *J. Cereal Sci.* **19**: 111-128.

- Hecker, K. D., Meier, M. L., Newman, R. K., and Newman, C. W. (1998). *J. Sci. Food Agric.* **77**: 179-183.
- Henrissat, B. (1991). *Biochem. J.* **280**, 309-316. Hsu, C.K., Liao, J. W., Chung, Y.C., Hsieh, C. P., and Chan, Y. C. (2004). *J. Nur.* **134**: 1523-1528.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T., and Stone, B. A. (1994). *Plant Physiol.* **104**: 315-320.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Marrila-Sandholm, T., and Poutanen, K. (1998). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 175-181.
- Jeffries, T. W. (1996). Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 337-342.
- Juge, N., Payan, F., and Williamson, G. (2004). *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 203-211.
- Klopfenstein, C. F. (1988). *Cereal foods World* **33**, 865-869. Kontula, P., von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T. (1998). *Int. J. Food Microbiol.* **45**: 163-169.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2003). *Curr. Pharmac. Design* **9**: 1297-1308.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P., and Tupasela, T. (1998). *Trends Food Sci. Technol.* **9**: 307-319.
- Kormelink, F. J. M. and Voragen, A. G. J. (1992). In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J. eds *Xylans and Xylanases, Progress in Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp.415-418.
- Lanza, E., Jone, D. Y., Block, G., and Kessler, L. (1987). *Am. J. Clin. Nutr.* **46**: 790-797.
- Lu, Z. X., Walker, K. Z., Muir, J. G., Mascara, T., and O'Dea, K. (2000a). *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**: 1123-1128.
- Lu, Z. X., Gibson, P. R., Muir, J. G., Fielding, M., and O'Dea, K. (2000b). *J. Nutr.* **130**: 1984-1990.
- Maes, C., Vangeneugden, B., and Delcour, J. A. (2004). *J. Cereal Sci.* **39**, 181-186. Manthey, F. A., Hareland, G. A., and Huseby, D. J. (1999). *Cereal Chem.* **76**: 417-420.
- McIntosh, G. H., Le Leu, R. K., Kerry, A., and Goldring, M. (1993). *Food Australia* **45**: 392-394.
- McLauchlan, W. R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P., and Maat, J. (1999). *Biochem. J.* **338**: 441-446.
- Meuser, F. and Suckow, P. (1986). In: Blanshard, J. M. V., Frazier, P. J., and Galliard, T. eds. *Chemistry and Physics of Baking*. London: The Royal Society of Chemistry, pp.42-61.
- Moers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., Delcour, J. A. (2003). *Analyt. Biochem.* **319**: 73-77.
- Moers, K., Celus, I., Brijs, K., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2005). *Carbohydr. Res.* **340**: 1319-1327.
- Mussatto, S. I. and Mancilha, I. M. (2007). *Carbohydr. Polym.* **68**: 587-597.
- Payan, F., Leone, P., Porciero, S. *et al.* (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 36029-36037. Perlin, A. S. (1951a). *Cereal Chem.* **28**: 370-381.
- Perlin, A. S. (1951b). *Cereal Chem.* **28**: 282-393.
- Petit-Benvegnen, M. D., Saulnier, L., and Rouau, X. (1998). *Cereal Chem.* **75**: 551-556.
- Rieckhoff, D., Trautwein, E. A., Mälkki, Y., and Erbersdobler, H. F. (1999). *Cereal Chem.* **76**: 788-795.
- Rouau, X., Daviet, S., Tahir, T., Cherel, B., and Saulnier, L. (2006). *J. Sci Food Agric.* **86**: 1604-1609.
- Sansen, S., De Ranter, C. J., Gebruers, K. *et al.* (2004a). *Acta Crystallogr. D* **60**: 555-557.
- Sansen, S., De Ranter, C. J., Gebruers, K. *et al.* (2004b). *J. Biol Chem.* **279**: 36022-36028.
- Sibbesen, O. and Sørensen, J. F. (2001). Enzyme. Patent application WO 01/66711 A1. Simpson, D. J., Fincher, G. B., Huang, A. H C., and Cameron-Mills, V. (2002). *J. Cereal Sci.* **37**: 111-127.
- Swennen, K. (2007). Production, characterization and functionality of arabinoxylooligosaccharides with different structures. PhD dissertation, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium.
- Swennen, K., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2006a). *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **46**: 459-471.
- Tahir, T. A., Berrin, J.-G., Flatman, R. *et al.* (2002). *J. Biol. Chem.* **277**: 44035-44043.
- Törrönen, A. and Rouvinen, J. (1997). *J. Biotechnol.* **57**: 137-149.
- Trogh, I., Courtin, C. M., Andersson, A. A. M., Åman, P., Sørensen, J. F., and Delcour, J. A. (2004). *J. Cereal Sci.* **40**: 257-267.
- Trogh, I., Croes, E., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2005a). *J. Agric. Food Chem.* **53**: 7243-7250.

- Trogh, I., Courtin, C. M., Goesaert, H. *et al.* (2005b). *Cereal Foods World* **50**: 253-260.
- Trogh, I., Courtin, C. M. and Delcour, J. A. (2007). In: Marquart, L., Jacobs, D. R., McIntosh, G. H., Poutanen, K., and Reicks, M. eds. *Whole Grains and Health*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, Chapter 13, pp. 157-176.
- Van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J. (2000). *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1644-1652.
- Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2000). *Trends Food Sci. Technol.* **11**: 387-393.
- Verwimp, T., Van Craeyveld, V., Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2007). *J. Agric. Food Chem.* **55**: 1985-1992.
- Vinkx, C. I. A., Van Nieuwenhove, C. G., and Delcour, J. A. (1991). *Cereal Chem.* **68**: 617-622.
- Voragen, A. G. J., Gruppen, H., Verbruggen, M. A., and Viëtor, R. J. (1992). In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J. eds. *Xylans and Xylanases, Progress in Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 51-67.
- Vinkx, C. J. A. and Delcour, J. A. (1996). *J. Cereal Sci.* **24**: 1-14.
- Wood, P. J., Weisz, J., and Blackwell, B. A. (1991). *Cereal Chem.* **68**: 31-39.
- Wood, P. J., Weisz, J., and Blackwell, B. A. (1994). *Cereal Chem.* **71**: 301-307.
- Yokoyama, W. H., Hudson, C. A., Knuckles, B. E. *et al.* (1997). *Cereal Chem.* **74**: 293-296.
- Yuan, X., Wang, J., Yao, H., and Chen, F. (2005). *Lebensm. Wiss. Technol.* **38**: 877-883.

連絡先：瀬口 正晴 (Masaharu Seguchi)
Email: gr228587@wf7.so-net.ne.jp