

小麦由来機能性成分の新規利用技術の開発 (2)

樋口誠一* 高橋学* 山路明俊**

Utilization of the Functional Constituents from Wheat (2)

HIGUCHI Seiichi*, TAKAHASHI Manabu*, YAMAJI Akitoshi**

抄録

小麦ふすま中の機能性成分であるフェルラ酸に注目し、アルカリ、酸、繊維分解酵素を用いた3種の遊離方法について検討を行った。酵素処理はアルカリ処理よりもフェルラ酸遊離量は少なかったが、他法に比べて品質面、製造面での安全性が高く、かつその後の精製工程も効率的に行うことができると考えられた。さらに酵素剤、条件の最適化によって、小麦ふすま1g当たり1.9mgのフェルラ酸を得ることが可能になった。また、酵素剤を変えることによりフェルロイルオリゴ糖の選択的な生産も可能であった。

キーワード：小麦ふすま，フェルラ酸，フェルロイルオリゴ糖，繊維分解酵素

1 はじめに

埼玉県は全国有数の小麦の産地であり、生麺類をはじめとする各種の小麦粉製品は、本県を特徴づける食品の一つになっている。この小麦粉の製造工程において、副産物である小麦ふすまが大量に発生する。小麦ふすまは、その大半が家畜の飼料として利用されているのが現状であるが、国内の飼料の需要が伸び悩んでいることや、食品リサイクル法の実施に伴い、他の食品残さの飼料化が行われることなどから、今後は小麦ふすまの飼料としての需要が低下し、その価格が下落することも考えられる。そのため、飼料用以外での小麦ふすまの有効利用が重要な課題となっている。

小麦ふすまは、製粉後に残った外皮と胚芽、胚乳の一部が混ざったもので、製粉時に30%ほど発生する。その成分としては食物繊維が多いが、その他にフィチン酸、フェルラ酸などのポリフェノール類、ビタミン類、ミネラルなどが豊富に含ま

れる。著者らは小麦ふすまからフィチン酸抽出物を得る技術を確立し、抗酸化性の高いフィチン酸抽出物の利用が可能になった¹⁾。本研究は、フィチン酸を抽出した後の残さの有効利用について検討を行った。特にこの中に含まれるフェルラ酸に注目した。

小麦ふすまの繊維はセルロース、ヘミセルロース、リグニン、タンパク質などから構成されている。主にフェルラ酸は、図1のようにヘミセルロースであるアラビノキシランにエステル結合しており、ジフェルラ酸を形成してアラビノキシラン同士の架橋に関与するなど、強固な骨格形成の一端を担っている²⁾。また、工業的にはフェルラ酸

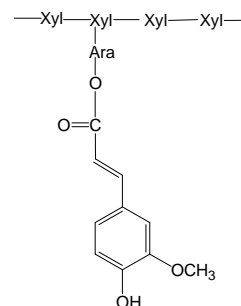


図1 フェルラ酸とアラビノキシランの構造

* 北部研究所 生物工学部

** 株式会社創健社

は抗酸化剤などとして利用されている。従来は合成により作られていたが、近年は米ぬか油副生成物から得られている³⁾。植物界全般に存在しており、特に単子葉植物に多く見られるが、現在小麦ふすまに含まれるフェルラ酸は有効に利用されていない。

そこで、小麦ふすまを有効利用した機能性食品素材の開発を目的に、小麦ふすまを原料としたフェルラ酸の製造方法について検討を行った。

2 実験方法

2.1 供試試料

県内製粉会社において得られた埼玉県産農林61号の小麦ふすまを用い、既報¹⁾にしたがって脱脂、加熱、粉碎処理を行った。これを水洗した後、風乾したものを供試試料とした。

2.2 フェルラ酸の定量

フェルラ酸の定量はKrygierらの方法⁴⁾により以下のように行った。小麦ふすま試料 0.2gに 80%アセトン水溶液 15mLを添加して振とう抽出し、遠心分離後の上清を遊離型フェルラ酸溶液とした。また、同様に抽出した液を減圧乾固し、2N水酸化ナトリウム水溶液 20mLを加えて、65°Cで90分間加水分解したものをエステル型フェルラ酸溶液とした。さらに、先に遠心分離した沈殿について、同様にアルカリ処理をしたものを結合型フェルラ酸溶液とした。それぞれの試料溶液について塩酸酸性とし、ヘキサンで洗浄後、ジエチルエーテル/酢酸エチル混液(1:1) 10mLで3回抽出した。集めた有機溶媒層を減圧乾固し、50mM酢酸緩衝液(pH4.0)/アセトニトリル混液(1:1) 1mLに溶解し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析に供した。HPLC条件として、カラムはGLサイエンス(株)製Inertsil ODS-3 (φ4.6×250mm, 5μm)、溶出は 50mM酢酸緩衝液(pH4.0)に対しアセトニトリルを30分間で5から50%にするグラジエント、カラム温度 40°C、流速 1.0mL/min、検出は 320nmのUV吸収で分析した。なお、エステル型フェルラ酸量は遊離型フェルラ酸量を差し引いて算出した。

2.3 フェルラ酸遊離法の検討

小麦ふすまからのフェルラ酸の遊離方法について、アルカリ、酸、繊維分解酵素を用いた3法を検討した。アルカリ処理は、水洗小麦ふすま 0.3g に対し、結合型フェルラ酸量を測定する場合と同様に行った。酸処理は、水洗小麦ふすま 0.3g に 0.1N 硫酸 20mL を加え、100°Cで60分間加水分解した。酵素処理は、水洗小麦ふすま 0.3g を水に懸濁し、100°Cで5分間膨潤処理したのに対し、0.6%(w/v) 酵素剤溶液 (表1 A4、50mM 酢酸緩衝液(pH4.5)、対試料 10%) 5mL を添加し、40°Cで24時間インキュベートした。これらの分解後の溶液について塩酸酸性とし、前項と同様にフェルラ酸含量を測定した。

2.4 酵素活性の測定

小麦ふすまからのフェルラ酸遊離に適した繊維分解酵素を調べるため、10社20種類の主に食品用酵素剤(表1)についてフェルラ酸エステラーゼ(FAE)活性及びキシラナーゼ活性を評価した。

FAE活性の評価は、フェルラ酸メチルを基質として以下のとおり行った⁵⁾。予備試験を行ったところ、FAEの至適条件はpH6.0、50°Cであったので、この条件で評価を行った。まず、2mMフェルラ酸メチル 0.5mLに 0.1%(w/v) 酵素剤溶液 (50mM MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid) 緩衝液(pH6.0)) 0.5mLを添加し、50°Cで10分間インキュベートした。その後、沸騰水浴中にて酵素を失活させた。遠心分離後の上清につき、生じたフェルラ酸量を2.2項と同様の条件によりHPLC分析した。1分間当たり 1μmolのフェルラ酸を遊離する酵素量を1ユニットと定義した。

キシラナーゼ活性の測定は、小麦由来アラビノキシラン(メガザイム社)を基質に使用して次のように行った。0.5%アラビノキシラン溶液 0.5mLに 0.025%(w/v) 酵素剤溶液 (50mM 酢酸緩衝液(pH4.5)、対試料 1%) 0.5mLを添加し、50°Cで60分間インキュベートした。その後、沸騰水浴中にて酵素を失活させた。遠心分離後の上清につき、3,5-ジニトロサリチル酸(DNS)法⁶⁾により還元糖量を測定し、キシロース当量で表した。1分間

当たり $1 \mu\text{mol}$ の還元糖を生じる酵素量を 1 ユニットと定義した。

2.5 小麦ふすまの酵素処理

酵素剤を使用した小麦ふすまからのフェルラ酸製造方法を以下のとおり検討した。

水洗小麦ふすま 10mg に 50mM MES 緩衝液 (pH6.0) 0.5mL を加え、 100°C で 5 分間加熱し、ふすまを膨潤させた。冷却後、0.1%(w/v) 酵素溶液 (50mM MES 緩衝液 (pH6.0)、対試料 5%) 0.5mL を添加し、 50°C で 20 時間インキュベートした。その後、沸騰水浴中にて酵素を失活させた。遠心分離後の上清につき、フェルラ酸含量を 2.2 項と同様の条件により HPLC 分析するとともに、還元糖量、総ポリフェノール量⁷⁾、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去能⁷⁾ を測定した。また、この上清 300 μL を取り、2N 水酸化ナトリウム水溶液 150 μL を加えて 65°C で 60 分間加水分解した。冷却後、2N 塩酸 150 μL を加えた溶液について 2.2 項と同様にフェルラ酸含量の HPLC 分析を行った。アルカリ分解前後における溶液中フェルラ酸含量の差から、フェルロイルオリゴ糖量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 小麦ふすまのフェルラ酸

まず、小麦ふすまに含まれるフェノール酸類について調べたところ、ほとんどがフェルラ酸であり、その含量は 1g 中約 2.6mg であった。また、フェルラ酸の存在様式について調べたところ、遊離型、エステル型はそれぞれ 0.4、3.3% とほとんど存在せず、残り 96.4% が不溶な細胞壁多糖に結合した形で存在していると推定された。そのため、ふすまの結合型フェルラ酸の遊離法について以下に検討を行った。

3.2 フェルラ酸遊離法の検討

アルカリ、酸、繊維分解酵素を用いた 3 法について、そのフェルラ酸遊離量を比較したところ、それぞれ 2.6、0.7、1.6mg/g であった。アルカリ処理のフェルラ酸遊離量が多いのは、エステル結合を選択的に切断できるためと考えられる。酵素

処理において、細胞壁多糖の分解のみならずフェルラ酸も遊離したのは、これを糖鎖から切り出す FAE⁸⁾ が繊維分解酵素中に存在するためであると考えられる。

これらの分解生成物を比較すると、アルカリ及び酸処理後の反応液は濃い茶色を呈していた。生じたフェルラ酸を利用する際には、この色素や反応液の中和により生じる多量の塩が問題になると予想された。これに対して酵素処理ではこのようなことがなく、品質面、製造面での安全性も高いと考えられる。酵素処理におけるフェルラ酸遊離量はアルカリ処理の約 60% であるが、酵素の種類や条件によってはこれを高めることができると考えられたので、以後、酵素による処理について検討することとした。

3.3 酵素剤の比較

小麦ふすまからのフェルラ酸遊離に適した繊維分解酵素剤について検討した結果を表 1 に示す。フェルラ酸メチルを基質とした FAE 活性は *Aspergillus* 属起源のものが高くなる傾向であったが、*Trichoderma* 属起源ではその活性がほとんどなかった。キシラナーゼ活性は A1 と A10 を除くと大差がなく、酵素の起源に関係なく小麦アラビノキシランを分解できることを確認した。

実際に小麦ふすまを基質にした場合、フェルラ酸遊離量が多いのは A6、A4、A5、A3 などといった FAE 活性が高い *Aspergillus* 属起源のものであったが、T9 のように FAE 活性がまったくなかった *Trichoderma* 属起源のものでも遊離が認められた。これは、両者に含まれている FAE の基質特異性が異なるためではないかと考えられた。

その一方で、T3 のようにフェルラ酸遊離量はほとんどないが、総ポリフェノール量が多く、DPPH ラジカル消去能も高いものがあった。この原因について検討を行ったところ、表 1 及び図 2 に示すとおり、フェルラ酸がフェルロイルオリゴ糖として存在していることが明らかになり、*Trichoderma* 属起源のものでその量が多くなる傾向が認められた。フェルラ酸の主な遊離過程は、まず細胞壁多糖にキシラナーゼが働いてフェルロ

表1 酵素剤の比較

No.	起源	FAE活性 (U/g)	キシラナーゼ活性 (U/g)	フェルラ酸遊離量 (mg/g)*1	還元糖生成率 (%)**2	総ポリフェノール量 (mg/g)*3	DPPHラジカル消去能*4	フェルロイルオリゴ糖 (mg/g)*1*3
A1	<i>Aspergillus niger</i>	1	47	0.08 (3)	15	1.6	0.0	0.05 (2)
A2	<i>Aspergillus niger</i>	10	485	0.35 (17)	22	2.7	1.9	0.01 (1)
A3	<i>Aspergillus niger</i>	12	815	1.02 (39)	31	3.3	2.8	0.05 (2)
A4	<i>Aspergillus niger</i>	22	810	1.21 (42)	33	3.6	2.9	0.00 (0)
A5	<i>Aspergillus niger</i>	18	595	1.03 (42)	31	3.7	2.4	0.02 (1)
A6	<i>Aspergillus niger</i>	31	791	1.41 (54)	34	4.1	2.9	0.02 (1)
A7	<i>Aspergillus niger</i>	24	461	0.34 (15)	25	2.7	0.8	0.01 (0)
A8	<i>Aspergillus niger</i>	8	525	0.51 (18)	30	2.6	1.7	0.00 (0)
A9	<i>Aspergillus usamii</i>	3	384	0.20 (8)	29	3.3	0.0	0.03 (1)
A10	<i>Aspergillus oryzae</i>	0	0	0.10 (6)	24	2.8	0.4	0.06 (2)
T1	<i>Trichoderma</i> sp.	0	793	0.04 (1)	10	3.2	2.1	1.50 (58)
T2	<i>Trichoderma</i> sp.	0	665	0.05 (1)	20	4.0	3.1	1.53 (59)
T3	<i>Trichoderma viride</i>	0	742	0.15 (3)	13	5.3	3.2	1.75 (67)
T4	<i>Trichoderma viride</i>	0	507	0.19 (3)	24	3.0	2.8	1.17 (45)
T5	<i>Trichoderma reesei</i>	0	810	0.05 (2)	11	3.7	2.3	1.43 (55)
T6	<i>Trichoderma reesei</i>	0	649	0.43 (13)	25	4.6	4.1	1.15 (44)
T7	<i>Trichoderma longibrachiatum(reesei)</i>	0	664	0.65 (20)	21	3.8	3.2	0.34 (13)
T8	<i>Trichoderma longibrachiatum(reesei)</i>	1	645	0.77 (20)	20	3.7	3.6	0.82 (31)
T9	<i>Trichoderma longibrachiatum(reesei)</i>	0	670	1.32 (45)	32	4.6	3.6	0.40 (16)
B1	<i>Basidiomycetes</i> sp.	0	573	0.07 (0)	19	3.9	2.2	1.43 (55)

*1:()内は、アルカリ処理におけるフェルラ酸遊離量を100としたときの割合

*2:小麦ふすまがキシロースへ完全分解したと仮定した場合の還元糖を100としたときの割合

*3:フェルラ酸当量 *4:Trolox当量(nmol)

イルオリゴ糖が生成し、その後FAEがフェルロイルオリゴ糖からフェルラ酸を遊離させると考えられている⁸⁾。フェルロイルオリゴ糖の多いものは、FAE量が少なく、フェルラ酸遊離までに至っていないと考えられる。フェルラ酸とフェルロイルオリゴ糖は同程度の抗酸化性を持っていると考えられるが、一方で水溶性などが異なるため、抗酸化剤の用途によってこれらを使い分けることも可能である。また、フェルロイルオリゴ糖にはLDL酸化抑制能⁹⁾、抗菌性¹⁰⁾や抗癌性¹¹⁾などでフェルラ酸よりも高い機能性があるとの報告もされ

ており、本研究で開発した酵素分解法では付加価値の高い製品製造も可能である。

従来法である米ぬかからのフェルラ酸製造法と比較すると、米ぬかではフェルラ酸エステルであるγ-オリザノールのアルカリ加水分解により、フェルラ酸のみが生産される¹²⁾。本研究で検討した小麦ふすまの酵素処理では、フェルラ酸だけでなく、機能性の高いフェルロイルオリゴ糖も選択的に生産することが可能であるほか、食品用酵素を使用することでより安全性の高い生産が可能であるなど、本研究で開発した小麦ふすまからのフェルラ酸類の生産技術の優位性を示していた。

3.4 酵素処理における最適条件の検討

最後に、フェルラ酸遊離量の多かった A6 及びフェルロイルオリゴ糖遊離量の多かった T3 について、最適な酵素量と反応時間を検討した。結果を図3に示す。A6 は添加酵素量及び反応時間の増加とともにフェルラ酸遊離量が増加したのに対して、T3 は少量の酵素と短時間の条件でもフェルロイルオリゴ糖の遊離量が多かった。そこで、両者を組み合わせて反応させたところ、反応4時

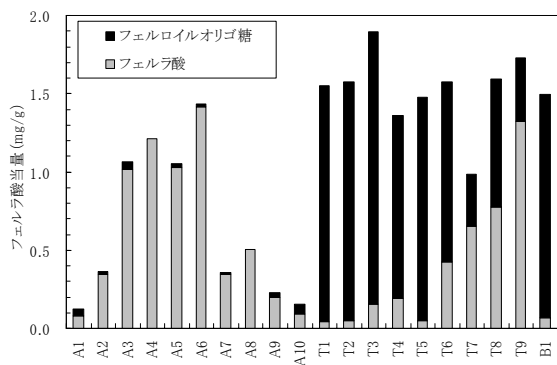


図2 酵素剤によるフェルラ酸及びフェルロイルオリゴ糖の遊離量

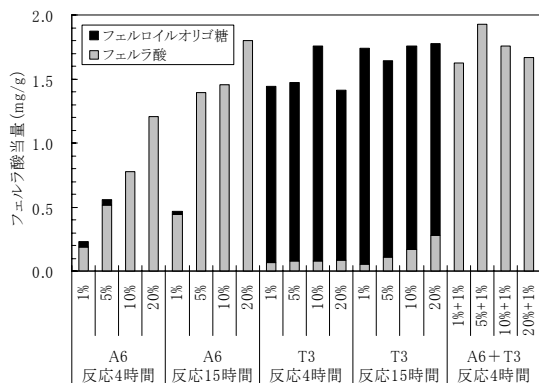


図3 酵素処理における最適条件の検討
 図中%値は、試料に対する酵素添加量を示す。

間でも小麦ふすま 1g あたり 1.9mg のフェルラ酸を得ることができた。このように、起源の異なる複数の酵素剤を組み合わせることで、反応時間の短縮と遊離フェルラ酸量の増加が可能であることが明らかとなった。

4 まとめ

小麦ふすまからのフェルラ酸の製造方法について、アルカリ、酸、繊維分解酵素を用いた3種の方法について検討を行った。酵素処理はアルカリ処理よりもフェルラ酸遊離量は少なかったが、他法に比べて分解物の品質や製造面での安全性が高く、かつその後の精製工程も効率的に行うことができるため、有効な方法であると考えられた。酵素剤と反応条件の最適化により、小麦ふすま 1g あたり 1.9mg のフェルラ酸を遊離することが可能であった。また、使用する酵素剤を変えることで、より付加価値の高いフェルロイルオリゴ糖の選択的生産も可能であった。

既報のフィチン酸の抽出技術¹⁾とフェルラ酸類の抽出技術を組み合わせることにより、小麦ふすまに含まれる機能性成分の総合的な利用が可能になると考えている。

謝辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導を頂いた、埼玉大学の円谷陽一教授に深く感謝の意を表します。また、試料は前田食品(株)に提供して頂きました。ここに心より感謝申し上げます。

参考文献

- 樋口誠一, 高橋学, 山路明俊: 小麦由来機能性成分の新規利用技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **5**, (2007) 71
- 渋谷直人: 植物細胞壁多糖間の架橋構造, 化学と生物, **21**, (1983) 143
- Graf, E.: Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, **13**, 4 (1992) 435
- Krygier, K. Sosulski, F. Hogge, L.: Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, (1982) 330
- Faulds, CB. Williamson, G.: The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*, *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 10 (1991) 2339
- 福井作造: 生化学実験法 1 還元糖の定量法 第2版, 学会出版センター, (1990) 23
- 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一: 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, *食科工*, **52**, 10 (2005) 462
- Williamson, G. Kroon, PA. Faulds, CB.: Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases, *Microbiology*, **144**, (1998) 2011
- Ohta, T. Semboku, N. Kuchii, A. Egashira, Y. Sanada, H.: Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in the LDL oxidation system, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, (1997) 1644
- 石原昌信, 長谷川真由, 平良東紀, 当山清善: パイナップル茎部からのフェルロイルオリゴ糖エステルとその抗菌活性, *食科工*, **47**, 1 (2000) 23
- 加藤陽治: 植物細胞壁多糖の微細構造解析と機能に関する研究, *J. Appl. Glycosci.*, **55**, (2008)35
- 国産農水産物利用食品新素材利用マニュアル No.1 フェルラ酸, (社)菓子総合技術センター