



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

クコ果実の多糖成分について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 秦, 小明, 加藤, 宏治, 山内, 亮, 相澤, 宏一, 稲熊, 隆博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5522

クコ果実の多糖成分について

秦 小明 加藤宏治 山内 亮 相澤宏一* 稲熊隆博*

食品科学講座, カゴメ株式会社総合研究所*

Chemical Features of Water-soluble Polysaccharides
in *Lycium chinense* Mill. fruitXiaoming QIN, Koji KATO, Ryo YAMAUCHI, Koichi AIZAWA*
and Takahiro INAKUMA*

Department of Food Science and Research Institute, Kagome Co., Ltd.*

SUMMARY

Polysaccharides were extracted with cold water (Cp) and hot water (Hp) from *Lycium chinense* Mill. fruits. By DEAE-Cellulose column (HCO_3^-) chromatography, Cp was separated into three fractions (Cp-1, Cp-2 and Cp-3), and Hp into four fractions (Hp-0, Hp-2, Hp-3 and Hp-4). Some properties of each fraction were examined. The results suggest that the polysaccharides in the fruits are mainly araban, glucan, arabinogalactan and pectic polysaccharides.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (64): 83-88, 1999

要 約

クコ果実より、冷水及び熱水にて多糖成分Cp（冷水抽出多糖）及びHp（熱水抽出多糖）を抽出した。それらをDEAE-セルロースカラム（ HCO_3^- 型）に供したところ、Cpは3つの画分（Cp-1、Cp-2及びCp-3）を、Hpは4つの画分（Hp-0、Hp-2、Hp-3及びHp-4）を与えた。得られた各画分の性質及び化学組成を検討した結果から、クコ果実に含まれる多糖成分は主にアラバン、グルカン、アラビノガラクトン及びペクチン質多糖であることが示唆された。

緒 言

クコ (*Lycium chinense* Mill.) はナス科に属する小灌木で、日本、中国をはじめ世界中に広く分布している。その果実は糖質、タンパク質、ベタイン、 β -カロチン、ビタミンC、ビタミンB群及びミネラル成分を含んでおり、古くから疲労回復、老化防止作用などがあると言われ、漢方薬や薬膳によく利用されている¹⁻³⁾。それらの活性成分は多糖、ベタイン及びphysalinであると報告されているが⁴⁾、近年、クコ果実多糖について、脾臓細胞のNK活性 (Natural killer activity) 及びTNF β (Tumor necrosis factor) 分泌レベルの促進⁵⁾、T細胞に対する影響及びリンパ細胞のIL-2R (Interleukin-2 receptor) 活性の強化^{6,7)}、老化防止、寿命延長^{8,9)}、遺伝子の損傷修復¹⁰⁾、疲労回復¹¹⁾、抗酸化¹²⁾、老人及びガン患者に対して免疫調節機能向上^{4,13)}など様々な生理作用が報告され、多糖の化学構造と生物活性の相関解明に関心がよせられている。しかしながら、クコ果実の水抽出物は糖質のほか、タンパク質、色素などの夾雑物が多く、多糖成分の分離精製は大変困難であると報告されていることから^{2,14-16)}、それら多糖の詳細についてはほとんど明らかにされていない状態である。本論文はクコ果実に含まれる多糖成分の分離及び得られた多糖の性質について検討したものである。

実験材料及び方法

材料 中国の寧夏回族自治区産のクコ (*Lycium chinense* Mill.) 果実 (1996年収穫) を自然乾燥したものを実験に用いた。

一般的方法 全糖量は、グルコースを標準としてフェノール-硫酸法¹⁷⁾、ウロン酸含量はガラクトツロン酸を標準としてカルバゾール-硫酸法の改良法¹⁸⁾、メトキシ基含量はクロモトローブ酸法¹⁹⁾、タンパク質はFolin-Lowry法のMillarの改良法²⁰⁾にて比色定量し算出した。なお、標準タンパク質として牛血清アルブミン (Sigma 社製) を用いた。

ガスクロマトグラフィー (GLC) Shimadzu CPB10-25-025キャピラリーカラム (0.2mm×25m) を装着した島津GC-18A型を用いた。クロマトグラムの記録及びピーク面積の算出には、島津Chromatocorder-21を使用した。なお、分析条件は次のとおりである。

カラム 温度: 220℃

キャリアガス: N₂ 60 ml/min (Split ratio: 1/60)

検出器: 水素炎イオン化検出器 (FID)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 日本分光製ポンプ880-PU, カラムオープン860-CO及び検出器830-RIを用いた。クロマトグラムの記録及びピーク面積の算出には、SIC Chromatocorder-11を使用し、次の条件で分析した。

カラム: Shodex OHpak KB-805 (8×300mm)

カラム温度: 45℃

流速: 1.0 ml/min

溶媒: 0.1 M NH₄HCO₃ 又は H₂O

薄層クロマトグラフィー (TLC) Merck社製シリカゲル60TLCプレート (厚さ0.25mm) を用いた。展開溶媒として酢酸エチル/ピリジン/酢酸/水 (5:5:1:3, v/v) を使用し、上昇法で二重展開した。糖の検出はジフェニルアミン-アニリン²¹⁾ を噴霧後、100℃で、5分間加熱し、発色させることにより行った。

実験結果

1. 水溶性多糖の抽出

自然乾燥したクコ果実に5倍量のクロロホルム・メタノール混液 (1:1, v/v) を加え、ミキサーで破碎した後、75℃で3時間加熱還流し脱脂を行った。風乾した残渣に含まれる種子を除いた後、予め4℃に冷却しておいた5倍量の蒸留水を加え、4℃にて4時間攪拌し、冷水抽出を行った。遠心分離により (10,000×g, 30min, 4℃), 上清と沈澱物に分けた。上清液のモーリッシュ反応が陰性になるまでこの操作を繰り返した。モーリッシュ反応陽性の上清液は合わせた後、約1/10容になるまで限外ろ過で濃縮し、冷水抽出液とした。冷水抽出残渣は再び5倍量の蒸留水を加え、オトクレーブを用い120℃にて熱水抽出を行った。

冷水及び熱水抽出液にそれぞれ3倍量のメタノールを加え、24時間静置し、生じた沈澱物は遠心分離により回収した後、再び水に溶解させ、セロファンチューブを用いて2日間流水中で透析を行った。透析内液を凍結乾燥し、得られた冷水抽出多糖をCp, 熱水抽出多糖をHpとした。なお、メタノール沈澱させた冷水抽出液の上清より回収された低分子糖質は乾燥クコ果実に対しておおよそ40% (ガラクトツロン酸12.5%, グルコース38.6%及びフルクトース36.4%) であった。

2. Cp及びHpの性質、構成糖の種類及びその割合

Cp及びHpはいずれも褐色の繊維状固体として得られ、それらの収率は乾燥クコ果実の重量に対してそれぞれ1.2%と1.4%であった。水に対する溶解性はHpよりCpの方が高い傾向を示し、1%濃度のCp及びHp水溶液のpHを測定したところ、それぞれ5.8と5.9であった。また、Cp及びHpの0.1%水溶液の25℃にお

ける粘度（東京計器BL型粘度計）は、共に0.5mpa・sで、差異は認められなかった。また、同条件における市販のレモンペクチン（1.5mpa・s）より低粘度であった。これは後述するようにクコ果実の冷水抽出及び熱水抽出画分中に占めるペクチン含量が少ない（CPは21.5%，Hpは45.7%）ためであると考えられる。

Cp及びHpの糖組成及びその比率を調べるために、Blakeney法²³⁾に従って調べた。即ち、多糖5mgに対し90%ギ酸1mlを加え、100℃で2時間反応させた後、0.5N硫酸1mlを加え、100℃で16時間加熱することにより加水分解を行った。その分解物は水素化ホウ素ナトリウム10mgを溶かし込んだ1Mのアンモニア0.1mlを加え、40℃で90分間還元した。次いで、無水酢酸0.1mlを加え反応を停止し、1-メチルイミダゾール0.2mlと無水酢酸2mlを順に加え、室温にて40分間アセチル化を行った。生じたアルジトールアセテートはガスクロマトグラフィー（GLC）分析に供した。標準糖との比較より、糖の種類を同定し、面積からそれらの割合を算出した。その結果をTable 1に示した。

Table 1. Some properties of Cp and Hp from *Lycium Chinense* Mill. fruits

Fraction	Yield %	[α] D ^a (c = 0.2, H ₂ O)	Protein %	Total sugar %	GalA ^b %	Methoxyl %	Sugar composition ^b (mol/mol, %)					
							Glc	Ara	Gal	Xyl	Man	Rha
Cp	1.2	+91	24.8	71.8	21.5	0.2	25.2	39.2	20.1	4.8	4.8	2.0
Hp	1.4	+81	20.1	81.3	45.7	2.1	15.8	45.5	23.2	5.2	4.2	6.3

^a The specific rotation was determined with a Horiba SEPA-300 polarimeter at room temperature

^b Glc: Glucose; Ara: Arabinose; Gal: Galactose; Xyl: Xylose; Man: Mannose; Rha: Rhamnose; GalA: Galacturonic acid.

構成糖をみると、両多糖はアラビノース、ガラクトース及びグルコースの含量が比較的多く、少量のキシロース、マンノース及びラムノースも検出された。また、中性糖の他に、ウロン酸含量が多く、そのウロン酸はTLC分析の結果より、ガラクトン酸であることが判明した。

3. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画

Cp及びHpはTable 1に示したように、タンパク質含量が比較的高く、また、その構成糖はアラビノースとガラクトースのほか、グルコース、キシロース、マンノース、ラムノース、ガラクトン酸など数多く、数種の多糖の混合物ではないかと推定される。そこで、タンパク質の除去及び糖質の分離精製を目的として、HeとZhang²⁾およびTsumurayaとHashimoto²³⁾の方法を参考にして、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを試みた。即ち、Cp及びHp（300mg）を予め平衡安定化させたDEAE-セルロースカラム（HCO₃⁻型、4.0×50cm）に供し、予備実験から得られた結果に従って、蒸留水、0.1、0.2、0.3及び0.4Mの炭酸水素アンモニウムにより順次溶出を行った。溶出液は流速30ml/hrで流し、フラクションコレクターで10mlずつ分画した。フラクションごとに全糖量、ウロン酸含量及びタンパク質含量を求めた。その溶出パターンをFig. 1に示した。

Cpは、0.1、0.2、0.3M炭酸水素アンモニウム画分に糖の溶出が認められ、それぞれをCp-1、Cp-2、Cp-3とした。Hpは、蒸留水、0.2、0.3、0.4M炭酸水素アンモニウム画分に糖の溶出が認められ、それぞれをHp-0、Hp-2、Hp-3、Hp-4とした。従って、Cpでは0.4M炭酸水素アンモニウム溶出画分に糖が含まれず、Hpでは0.1M炭酸水素アンモニウム溶出画分に糖が含まれないことが明らかになった。各溶出液で得られた画分は減圧濃縮した後、セロファンチューブを用いて流水に対し二日間透析し、透析内液を凍結乾燥した。

各画分の全糖量、蛋白質及びガラクトン酸含量を求めたところ、炭酸水素アンモニウムの濃度が高くなるにつれガラクトン酸含量が高くなり、中性糖含量が低くなる傾向が認められた。また、各画分の糖組成およびその割合は前記の方法で求め、その結果をTable 2にまとめて示した。

各画分の構成糖をみると、Hp-0から67.2%のアラビノースと16%のグルコースが検出され、Cp-1、Cp-2及びHp-2は、アラビノースとガラクトースが比較的多く含まれることが明らかになった。Cp-3、Hp-3

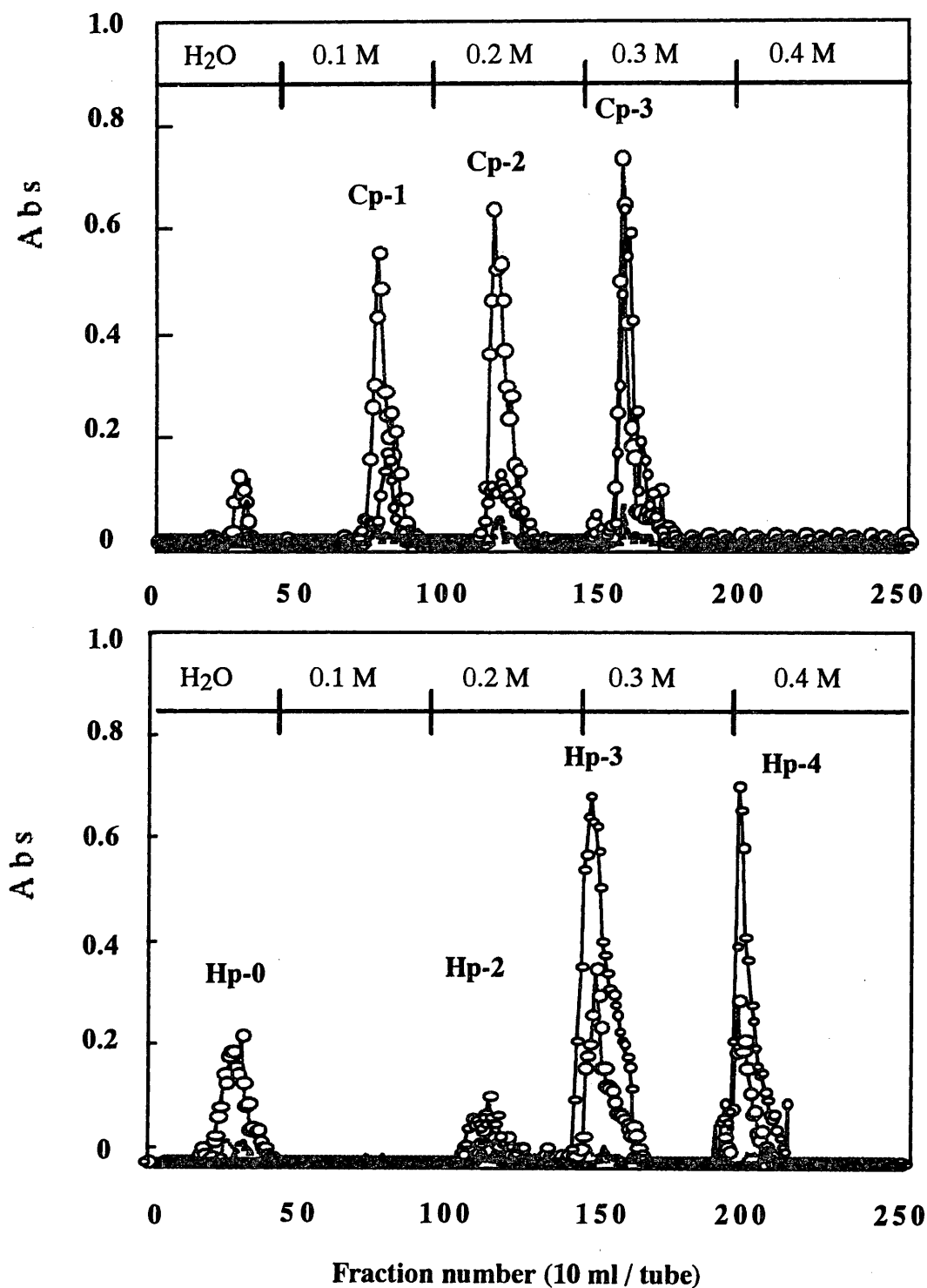


Fig.1 Elution profile of polysaccharides from *Lycium chinense* Mill. fruits on a DEAE-Cellulose column
 The crude polysaccharides were subjected to chromatography on a DEAE-Cellulose column (ϕ 4.0×50 cm, HCO₃⁻ form). After washing with distilled water, the column was eluted with 0.1-0.4 M NH₄HCO₃ solution successively. Fractions were collected and analysed for total sugar (—○—), uronic acid (—●—) and protein (—▲—).

及びHp-4については、いずれの画分においてもガラクトuron酸含量が高く（それぞれ68.4%、71.7%及び89%）、中性糖の含量が少ないことからペクチン質多糖であることが推定される。

4. ゲル濾過による重量平均分子量の測定

各画分の重量平均分子量を調べるため、HPLCでゲル濾過クロマトグラフィーを行った。即ち、0.1Mの

NH₄HCO₃溶液で溶解した2mgの各画分を予め平衡安定化させたShodex OHPak KB-805カラムに供し、同溶媒を用いて前記の条件で分析した。なお、標準物質としてPharmacia製Dextran T-500 (Mw = 48.7×10⁴), T-110 (Mw = 10.5×10⁴), T-70 (Mw = 7.0×10⁴), T-40 (Mw = 4.35×10⁴), T-20 (Mw = 2.0×10⁴), T-10 (Mw = 1.05×10⁴)を同一条件で流し、標準曲線を作成した。その標準曲線から各画分の重量平均分子量を算出し、その結果をTable 2に示した。

Table 2. Some properties of polysaccharides isolated from Cp and Hp

Fraction	NH ₄ HCO ₃ (M)	Yield %	Mw (x10 ⁴)	Sugar %	GalA %	Methoxyl %	Protein %	Neutral sugar %	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Cp-1	0.1	45.2	2.0	92.4	5.5	0	5.2	87.9	n.d.	7.9	50.6	4.3	2.8	20.3	2.0
Cp-2	0.2	18.2	8.0	93.0	13.0	0	6.7	80.0	1.6	6.0	34.2	2.8	3.4	25.1	1.1
Cp-3	0.3	31.6	10.4	90.2	68.4	2.0	4.3	21.8	0.6	4.1	6.1	2.4	1.6	3.3	0.3
Hp-0	0	6.3	1.2	93.1	3.7	0	4.6	89.4	n.d.	n.d.	67.2	n.d.	0.8	1.5	15.9
Hp-2	0.2	15.4	5.2	89.0	22.3	0	7.4	66.7	1.4	6.2	29.4	2.5	2.5	17.2	0.4
Hp-3	0.3	30.8	3.5	90.3	71.7	8.0	6.3	18.5	1.7	3.1	7.0	1.6	0.8	2.4	n.d.
Hp-4	0.4	43.2	7.0	94.3	89.0	2.8	2.8	5.3	0.4	0.7	1.9	0.6	0.2	0.6	0.1

考 察

クコ果実には冷水で抽出される低分子糖が約40%含まれ(対乾燥クコ果実)、その量は水溶性多糖のおおよそ30倍量に相当することが分かった。また、主成分がフルクトースとグルコースであるということはクコ果実が疲労回復に有効であるということと関係しているものと考えられる。

クコ果実より冷水及び熱水にて抽出した多糖成分の収量は1.2%及び1.4%であり、その含量はきわめて少ないことが判る。これらはクコ果実多糖の様々な生理機能と対照的であるのは興味深いことである。Cp(冷水抽出多糖)及びHp(熱水抽出多糖)をDEAE-セルロースカラム(HCO₃⁻型)に供したところ、Cpは3つの画分を、Hpは4つの画分を与えた。得られた各画分の性質及び化学組成を検討した結果、炭酸水素アンモニウム濃度が高くなるにつれガラクトン酸含量が高くなり、中性糖含量が低くなる傾向が認められた。また、Cp-2とHp-2、Cp-3とHp-3はイオン交換クロマトグラフィーでの挙動及び糖組成から、同じような多糖と判断するのは難しく、さらなる精製を試みる必要がある。以上の結果から、クコ果実に含まれる多糖成分は数種の多糖よりなることが分かった。

各画分の構成糖をみると、HP-0はアラビノース及びグルコースであるので、HP-0はアラバンとグルカンの混合物であると推測した。Cp-3、Hp-3及びHp-4については、ガラクトン酸含量が高く、ペクチン質多糖であると推定した。Cp-1、Cp-2及びHp-2は全糖量90%以上、ガラクトン酸含量5-22%、蛋白質含量5-7%を含んでおり、いずれの画分においてもアラビノースとガラクトースが比較的多く含まれていた。これらは大根、コーヒ豆などの植物から抽出されたアラビノガラクトン-プロテイン(Arabinogalactan-protein, AGP)²⁴⁾と同じような多糖複合体ではないかと推定している。このように、クコ果実の多糖成分は主にアラバン、グルカン、アラビノガラクトン-プロテイン及びペクチン質多糖であり、非常に複雑であることが示唆された。

HPLCで分子量分布を測定する際、各多糖画分は溶出溶媒と関係なく、ほぼ単一のピークを与えた。蒸留水を溶出溶媒として用いると、重量平均分子量はいずれも200万以上であるが、0.1MNH₄HCO₃溶液で溶出させると、各多糖の平均分子量はTable 2に示したように小さくなった。ニンジン、アズキ²⁵⁾など由来のアラビノース、ガラクトース及びガラクトン酸を構成糖とする多糖も類似の現象を報告している。従って、各多糖画分はゲル濾過によりほぼ単一のピークを与えたが、それらはまた混合物である可能性が高いと考えられる。また、複数の画分として得られた前述のアラビノガラクトン-プロテインの構造上の差異などについて詳細に検討中である。

参 考 文 献

- 1) 伊沢 凡人：日本薬用植物事典（原色版），誠文堂新光社：176，（1980）。
- 2) He, J. and Zhang, S.: Research of Lycium and Lycium Polysaccharides I. Food Sci., 16: 15-21, (1995).
- 3) 堀田 満他：世界有用植物事典・植物編，平凡社：640-641，（1989）。
- 4) Dharmananda, S.: Lycium Fruit for HIV/ AIDS. Tradition Med., 10: 23-24 (1995).
- 5) Liu, J., Zhang, L. and Qian, Y.: Immune Tumor-inhibition of Lycium Barbarum Polysaccharide on S180-bearing Mice. Chin. J. Immunol. 12: 115-117, (1996).
- 6) Liu, J. and Cheng, B.: Effect of Lycium Polysaccharide on Immune Responses of Cancer Patients Following Radiotherapy. Chin. J. Radiol Med. Prot., 16: 18-20, (1996).
- 7) Du, S. and Qian, Y.: Effect of the Extraction of Lycium Barbarum on the IL-2R. Expression of Human Lymphocytes. Chin. J. Microorg. Immunol. 6: 176-178, (1995).
- 8) Liu, Y., Zhou, H., Bai, X. and Yin, J.: The Regulation of Lycium Barbarum polysaccharide on Apoptosis of Mouse Thymocytes in Vitro. J. Beijing Med. Univ., 28: 111-133, (1996).
- 9) Dai, S. and Wang, M.: Effects of Lycium barbarum L. and its Polysaccharide on Life Spans in Mouse and Drosophila Melanogaster. J. Old People 10: 94-96, (1990).
- 10) Tao, M. and Zhao, Z.: Research on Response to Genetic Wounding of Lycium in Vitro. Chin. Herbs, 23: 474-476, (1992).
- 11) Sun, W., Sui, D. and Yu, X.: Preliminary Pharmacological Studies of Polysaccharide Proteins from Lycium Barbarum. J. N. Bethune Univ. Med. Sci., 22: 486-487, (1996).
- 12) Ren, B., and Ma, R.: Effect of Lycium on RBC Membrane Lipid Peroxidation Derived by H₂O₂. J. Chin. Herbs, 20: 303-304, (1995).
- 13) Sheng, B. and Zhang, S.: Regulation to Immune Function of Lycium Barbarum on Old People above 60 Years (Chinese). Pharm. Clinic. Med. Chin. Herbs, 4: 43-45, (1998).
- 14) He, J., and Zhang, S.: Isolation and Composition of Lycium Barbarum Polysaccharide. Chin. Pharm. J., 31: 716-717, (1996).
- 15) Li, Z. and Zhang, S.: Research of Lycium and Lycium Polysaccharides II. Food Sci., 17: 9-12, (1996).
- 16) Sun, Z. and Zhang, S.: Study on the Extraction and Isolation of Fructus Lycii Polysaccharides and its Physical and Chemical Characteristics. J. Huazhong Agric. Univ., 15: 603-607, (1996).
- 17) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance. Anal. Chem., 28: 350-356, (1956).
- 18) Dische, Z.: Methods in Carbohydrate Chemistry (ed. R. L. Whistler, M. L. Wolfrom). Academic Press, 1488, (1962).
- 19) Snell, F. D., and Snell, C. T.: Colorimetric Methods of Analysis 3. George S. Ferguson, Co. Philadelphia: 41, (1957).
- 20) Millar, G. C.: Protein Determination for Large Number of Samples. Anal. Chem., 31: 964, (1959).
- 21) Bailry, R. W., and Bourne, E. J.: Colour Reactions Given by Sugars and Diphenylamine-aniline Spray Reagents on Paper Chromatograms. J. Chromatog., 4: 206-210, 1960.
- 22) Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J., and Stonl, B. A.: A Simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis. Carbohydr. Res., 113: 291-299, (1983).
- 23) Tsumuraya, Y. and Hashimoto, Y.: An L-Arabino-D-galactan and an L-arabino-D-Galactan-Containing Proteoglycan from Radish (Raphanus sativus) Seeds. Carbohydr. Res., 161: 113-126, (1987).
- 24) Clarke, A. E., Anderson, R. L and Stone, B. A.: Form and Function of Arabinogalactans and Arabinogalactan-proteins. Phytochem. 18: 521-540, (1979).
- 25) Wei, B. Y., Yamauchi, R., and Kato, K. J.: Chemical Structure of Arabinogalactan Isolated from Cotyledon of Azuki Bean (Phaseolus Angularis). J. Applied Glycoscience. 41: 157-163, (1994).