

アルカリ蒸解処理黒液から回収したタケキシランのビフィズス菌増殖促進効果

下川知子・真柄謙吾 (森林総研)

要旨: タケパルプ製造時に排出されるアルカリ性の黒液から得られるタケキシランの機能性について検証を行った。蒸解助剤のアントラキノン添加しないソーダ蒸解より得られた黒液から沈殿を回収し、脱リグニン処理を行い、水洗で塩類を除いたタケキシランは、キシロオリゴ糖をほとんど含まないほぼ不溶性の多糖であった。ビフィズス菌増殖培地 (GAM 培地) にタケキシラン、粉末セルロース又は市販のキシロオリゴ糖を添加して各種ビフィズス菌の増殖促進効果試験を行った。タケキシラン、粉末セルロースは水不溶性であるため、37°C、24 時間の反応後に TOS プロピオン酸寒天培地上で生菌数の測定を行い、菌の増殖を評価した。評価を行ったビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* JCM1192, *B. infantis* JCM1210, *B. longum* JCM1217, *B. bifidum* JCM1254, *B. adolescentis* JCM1275 全てに対してタケキシランはビフィズス菌増殖に効果のあることが確認され、特に *B. bifidum* JCM1254, *B. adolescentis* JCM1275 は増殖促進効果が高く、検討を行った反応 12 時間後から 48 時間までの間、常にタケキシランを含まない対照区よりも多いビフィズス生菌数を維持していた。以上の結果から、タケキシランは何らかのビフィズス菌増殖促進効果を有することが明らかになり、健康補助食品としての可能性が示された。

キーワード: タケ、キシラン、ビフィズス菌

Abstract: The functionality of bamboo xylan, recovered from an alkaline black liquor discharged from pulp manufacturing process, is verified to further advance the utilization of bamboo and bamboo xylan. Bamboo xylan in this study, prepared without using anthraquinone which promotes delignification but with a flush process, was an almost insoluble polysaccharide which hardly contained xylo-oligosaccharide. The bamboo xylan, commercial xylo-oligosaccharide, and microcrystalline cellulose were added to the culture media to examine the proliferative activity on bifidobacteria. Since the bamboo xylan and cellulose powder were insoluble in the medium, the viable bifidobacteria numbers were counted on the TOS propionate agar plates to evaluate proliferation after an incubation period of 24 hours at 37°C. Bamboo xylan showed proliferative effect on all five examined bifidobacteria strains: *Bifidobacterium breve* JCM1192, *B. infantis* JCM1210, *B. longum* JCM1217, *B. bifidum* JCM1254, and *B. adolescentis* JCM 1275. In particular, *B. bifidum* JCM 1254 and *B. adolescentis* JCM 1275 showed higher proliferative activities than the controls after adding bamboo xylan, and the proliferative effects were maintained during a 48-hour examination period. These results support the potential of bamboo xylan, which has a certain bifidobacterium proliferative effect, as a health supplement.

Keywords: Bamboo, Xylan, *Bifidobacteria*

I はじめに

竹はアジアを中心に広く分布する植物であり、その成長の早さから有望な資源として注目されている。竹林を適正に管理するためにはその利用用途の拡大が急務であり、製紙原料としての利用はその潜在的な需要量から今後推進されていく分野と考えられる。パルプ製造工程で用いられるアルカリ蒸解法は大量処理が可能であり、竹にも適用可能である。よって、我々はアルカリ蒸解法により生産されるタケパルプの利用を中心に、竹資源の全体的な有効利用について幅広い検討を行っている。タケパルプの製造過程

で、アルカリ性の黒液中にタケヘミセルロース成分の一部が沈殿し、容易に回収可能であることが明らかになった(6)。また、回収されたタケヘミセルロース成分のうち、水不溶性画分は純度の高いキシランであることも明らかとなった(10)。しかし、タケキシランの食品利用を想定する場合、蒸解補助剤としてアントラキノンを使用した前回までの調製条件では、アントラキノンの残留が問題になっている現状(3)のため、使用を控える動きとなっている。そこで、これを使用しない調製条件に変更した。

ビフィズス菌はヒトを始めとする動物の腸管内に広く

Tomoko SHIMOKAWA, Kengo MAGARA (Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687), Proliferative activity of bifidobacteria by bamboo xylan obtained from soda cooking process

生息し、整腸作用などの有益な作用をもたらす、健康維持に重要な役割を果たしていると考えられている。ビフィズス菌を腸管内で増殖させることを目的として、様々な種類の増殖促進成分が報告されており(9)、キシロオリゴ糖(7)をはじめとする各種の成分が食品添加物として実用化されている。アルカリ蒸解法によって調製したタケキシランからキシロオリゴ糖を調製可能なことは既に明らかにしたが(10)、今回は調製されたキシランをそのまま用いることがビフィズス菌の増殖に与える影響について、市販のキシロオリゴ糖及び結晶性セルロース粉末との比較検討を行った。

II 実験方法

1. アルカリ蒸解タケキシランの調製 モウソウチクのチップを活性アルカリ 18%、液比 3、温度 155℃で3時間蒸解した後、生じた黒液に残留するリグニンを亜塩素酸ナトリウムで弱酸性化して分解除去し、残存する沈殿を再度水に分散させ、ろ紙により回収し乾燥させ、得られた粉末をタケキシランとした。タケキシランは、ビフィズス菌増殖試験に供する前に、乳鉢中で均一となるように混合した後、使用した。

2. 成分分析 タケキシラン中のリグニン含量は、121℃、60分間、1 N 硫酸による酸加水分解後に酸不溶性リグニン含量を求めた。また、酸加水分解した後の分解液をパルスドエレクトロケミカル検出を用いた HPLC (CarboPac PA 1 カラム)により分析して、構成糖成分を分析した。また、タケキシランに含まれるオリゴ糖成分についても HPLC による分析を行った(11)。

3. ビフィズス菌培養試験 供試菌株として、いずれもヒト腸管由来の *Bifidobacterium breve* JCM1192, *B. infantis* JCM1210, *B. longum* JCM1217, *B. bifidum* JCM1254, *B. adolescentis* JCM1275 の5株を用いた。培地は GAM ブイヨン「ニッスイ」(日水製薬)液体培地を用い、アネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いた嫌気状態で37℃での静置培養を行った。凍結保存してある菌株を、GAM 培地で2回培養した後、培養液の濁度を 660 nm で測定し、滅菌生理食塩水で適宜希釈し、培養試験に用いた。ピアースバイアルを反応容器とし、GAM 試験培地に、タケキシラン、結晶性セルロース粉末(セオラス PH-101, 旭化成ケミカルズ)、キシロオリゴ糖(和光純薬工業)を終濃度 1.0%となるように添加(全容 1 ml)してオートクレーブにて 115℃ 15分間滅菌し、冷却後に希釈菌液を添加することで培養を開始した。培養中の過度な水分蒸散を抑えるために、バイアルの口をガス透過性のフィルム(Breathe-easy)によってシールした。キシラン及びセルロースは不溶性であるため、

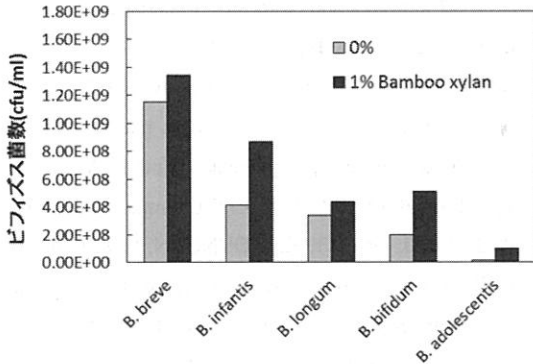
培養後の菌の生育状況を濁度の測定により評価することは困難であった。そのため、培養終了後の培養液内の生菌数を、TOS プロピオン酸寒天培地(ヤクルト薬品工業)を用いて測定(1)し、colony forming unit (cfu)として無添加の GAM 培地を対照とした評価を行った。すべての実験は3連で行い、その平均値を示した。

III 結果と考察

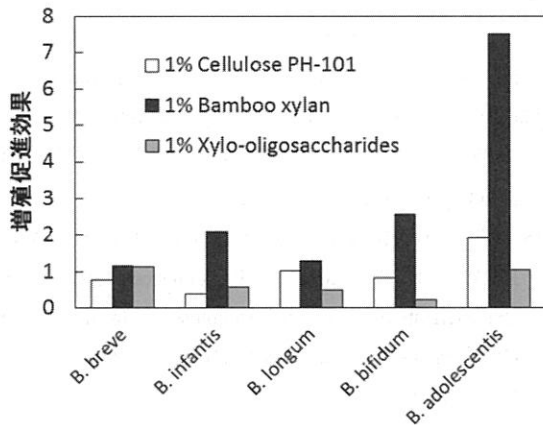
1. 成分組成 今回の実験では3時間の蒸解処理によって得られる黒液からのタケヘミセルロースを使用した。得られたタケヘミセルロースは、灰分が 6.44%、灰分を補正した酸不溶性リグニン含量が 0.74%と、リグニン含量は低かったが、脱リグニンに使用した亜塩素酸ナトリウム由来する塩類の残存が示唆された。また、酸加水分解後の糖液を分析して得られた各単糖の濃度から、無水糖換算することによって計算される多糖の含有量は、キシラン 69.4%、グルカン 26.4%、アラビナン 4.1%、ガラクトン 0.1%、となり、マンナンは検出されなかった。多糖の含有量として表示するためにアラビナン、ガラクトンの名称を用いたが、モウソウチクの主なヘミセルロースはアラビノキシランであり、アラビノース、ガラクトースもそれぞれアラビナン、ガラクトンとして存在するよりは側鎖として存在していると考えられる(8)。

2. ビフィズス菌培養試験 5株のビフィズス菌を24時間、1%の試験物質を含む GAM 培地で培養し、増殖菌数を対照培地と比較した。図-1にタケキシランを添加した場合の生菌数について示した。いずれのビフィズス菌に対しても対照区より高い生菌数を示しており、ビフィズス菌に対する何らかの成長促進因子が存在することが明らかになった。タケキシランと同じく不溶性である結晶性セルロース粉末 PH-101 と、既に増殖促進効果を有することが明らかであるキシロオリゴ糖(7)についても同様の実験を行い、増殖促進効果を数値化するため、試験物質を含む培養液内の生菌数を、試験物質を含まない対照培地に含まれる生菌数で除した数値を図-2に示した。対照培地よりも生菌数が少ない場合、1より低い値を示すことになるが、タケキシランは *B. adolescentis* JCM1275 に対して顕著な増殖活性を示し、対照培地に比べて7.5倍の生菌数となった。*B. bifidum* JCM1254 に対しても2.6倍と高い増殖活性を示すことが確認された。一方、同様に試験したセルロース粉末は、タケキシランほど目立った効果が確認されなかった。キシロオリゴ糖については、ビフィズス菌に対する増殖活性が既に報告されている。しかし、図2に示した24時間培養の実験においては増殖効果が低かった。この原因として、24時間では既にビフィズス菌が不活化してしまってい

ることが予想された。培養時間の影響を調べるため、増殖効果の高かった2菌株、*B. bifidum* JCM1254, *B. adolescentis* JCM1275 について、培養時間と生菌数の関係について検討を行った。



図一. タケキシラン添加による 24 時間培養後のビフィズス菌数の変化
Fig. 1 Changes in viable bifidobacteria number by the addition of bamboo xylan after 24 hours of incubation

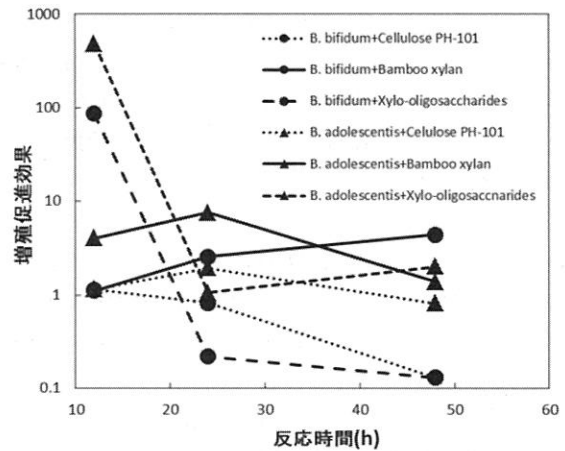


図二. セルロース粉末, タケキシラン, キシロオリゴ糖の添加による 24 時間培養後のビフィズス菌増殖促進効果 (増殖促進効果値は無添加培地を 1 としたときの生菌数の比)
Fig.2 Proliferative effects of micro crystalline cellulose, bamboo xylan, and xylo-oligosaccharides on bifidobacteria after 24 hours of incubation (Proliferative effect indicates the ratio of the viable bifidobacteria number in the tested culture media to the control)

濁度によって菌体量を測定した結果、既報と同様にキシロオリゴ糖の添加によるビフィズス菌の増殖促進、菌体量増加が確認された。特に *B. adolescentis* JCM1275 株はキシ

ロオリゴ糖添加による増殖効果が著しく高く、添加後 12 時間の時点で、対照区の吸光度がブランク値と変わらない値であったにも関わらず、良好な生育を示した。*B. bifidum* JCM1254 株も同様に培養開始から 12 時間で対照区よりも高い生育を示し、その 12 時間後、培養を開始してから 24 時間まで急速に増殖し、平衡状態に至った。

培養時間ごとの生菌数を、それぞれの対照区との比較で図一 3 に記載した。キシロオリゴ糖添加区は、培養 12 時間後、活発な生育を示したが、対照区はほとんど生育していなかった。生菌数での比較となる増殖促進効果において、*B. bifidum* JCM1254 株が 484, *B. adolescentis* JCM1275 が 86 と高い数値を示したために、図一 3 では数値を対数目盛で表示している。キシロオリゴ糖添加区はその後、反応 24 時間で生菌数が低下し、みかけの増殖促進効果は低下した。一方、タケキシラン添加区では、キシロオリゴ糖添加区ほど急激な増殖促進効果は確認されなかったが、今回実験を行った培養開始後 48 時間の間、常にゆるやかな増殖促進効果を維持し、対照区よりも多いビフィズス菌数を維持していた。不溶性の結晶性セルロース PH-101 添加区では、タケキシランほどの効果は得られず、とくに反応 48 時間後では、試験を行った 2 株ともに対照区よりも生菌数が低下しており、不溶性のセルロースにビフィズス菌増殖効果は確認できなかった。



図三. ビフィズス菌増殖促進の経時変化 (増殖促進効果値は無添加培地を 1 としたときの生菌数の比)
Fig.3 Time course of proliferative effects on bifidobacteria (Proliferative effect indicates the ratio of the viable bifidobacteria number in the tested culture media to the control)

植物細胞壁由来の繊維がビフィズス菌の生育に及ぼす影響については、未だ不明な点が多いものの、ビフィズス

菌が高重合度の多糖類を積極的に直接分解するのではなく、他の菌によって分解されたオリゴ糖を利用している可能性がある、と考えられており(4)、*B. adolescentis* ATCC15703 (JCM1275)にはキシロオリゴ糖を分解する酵素として、性質の異なる2種類の β -xylosidase (EC 3.2.1.37)と reducing-end xylose-releasing exo-oligoxyranase (EC 3.2.1.156)の存在が報告されている(5)。一方、今回調製したタケキシラン中には、キシロビオース、キシロトリオースは検出されなかった。アルカリ抽出及びタケキシランを調製する際の水処理により、可溶性の低分子オリゴ糖は、除去されたと考えられる。不溶性のキシランであっても、すべての構造が酵素分解され難いのではなく、分解されやすい構造を随所に有していると思われる。そのため、増殖促進効果を示した*B. bifidum* JCM1254株や*B. adolescentis* JCM1275株がタケキシラン中の分解されやすい構造を分解、利用した可能性はある。

今回使用したタケキシランは、調製にあたり苛性ソーダと亜塩素酸塩のみを用いて調製しているため、食品への応用が可能と考えられる。一般的な植物細胞壁由来の食物繊維は腸の働きを助け、血中コレステロール値の抑制に役立つなどの特性が示されており、これらの特性は繊維としての多糖の性質や粘性が関係するとされている(2)。今回調製されたタケキシランは、水不溶性の食物繊維であり、上述の食物繊維としての特性を有していると考えられる。本研究により、タケキシラン自体に機能性が示された。このタケキシランは、市販のキシラナーゼ製剤を用いた部分分解でキシロオリゴ糖を含有した製品とすることも可能であり、ビフィズス菌の増殖活性を生かした健康補助食品としての可能性が示された。

IV まとめ アルカリ蒸解処理によりタケパルプを生産する過程で排出される黒液より回収したタケキシランの有効利用方法として、酵素処理によってキシロオリゴ糖を生成させる材料としてではなく、タケキシランそのものの機能性を検討し、ビフィズス菌増殖活性について示した。タケキシランはほぼ不溶性の多糖類であり、キシロビオース、キシロトリオースなどのキシロオリゴ糖は含まれていないにもかかわらず、ビフィズス菌増殖のためのGAM培地に1%添加し、24時間培養することで対照区よりもビフィズス菌数が多くなり、何らかの増殖促進効果を有することが明らかになった。

謝辞 本研究は森林総合研究所交付金プロジェクト「バイオオリファイナリーによる竹資源の総合利用技術の開発」の一環として行われた。

引用文献

- (1) ビフィズス菌検査法検討委員会 (2000) はっ酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌の菌数測定法. 社団法人全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会, 東京, pp. 15
- (2) EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z. (1999) Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol Genetic Engineer Rev*:**16**,pp.325-346
- (3) EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for anthraquinone according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*: **10**,pp.2761
- (4) FLINT, H.J., SCOTT, K.P., DUNCAN, S.H., LOUIS, P., FORANO, E. (2012) Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*:**3**,pp.289-306
- (5) LAGAERT, S., POLLET, A., DELCOUR, J.A., LAVIGNE, R., COURTIN, C.M., VOLCKAERT, G. (2011) Characterization of two β -xylosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their contribution to the hydrolysis of prebiotic xylooligosaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*: **92**,pp.1179-1185
- (6) 真柄謙吾・下川知子・池田努 (2013) 竹ソーダ・アントラキノ蒸解黒液からのヘミセルロース回収. 第80回紙パルプ研究発表会講演要旨集, pp. 144-145
- (7) 岡崎昌子・藤川茂昭・松元信也 (1990) キシロオリゴ糖のビフィズス菌増殖効果. *日本栄養・食料学会誌*:**43**,pp.395-401
- (8) PENG, H., HU, Z., YU, Z., ZHANG, J., LIU, Y., WAN, Y., RUAN, R. (2012) Fractionation and thermal characterization of hemicelluloses from bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel) culm. *BioResources*, : **7**,pp.374-390
- (9) 清水俊夫 (2004) 特定保健用食品の開発戦略. 日経BP社, 東京, pp. 159-166
- (10) 下川知子・真柄謙吾 (2013) アルカリ蒸解から得られる竹キシランの分解特性. 第8回バイオマス科学会議発表論文集 : pp. 166-167
- (11) SHIMOKAWA, T., SHIBUYA, H., IKEDA, T., MAGARA, K., SHINAGAWA, S., SHINAGAWA, H., NOJIRI, M., OHARA, S. (2013) Ethanol production from sugi pulp under simultaneous saccharification and fermentation using a cocktail enzyme of *T. reesei* and *A. tubingensis* produced by solid-state fermentation. *J Wood Sci*, :**59**,pp.171-178