

《様式B》

研究テーマ	「 亜臨界水処理による酒粕からの機能性オリゴ糖製造 」
研究責任者	所属機関名 静岡県立大学 官職又は役職 助教 氏 名 村上 和弥 メールアドレス murakami@u-shizuoka-ken.ac.jp
共同研究者	所属機関名 静岡県立大学 官職又は役職 助教 氏 名 本田 千尋

(令和6年度募集) 第37回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

※ 産業技術として社会実装の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

本研究は、清酒製造の副産物である酒粕を豊富な炭水化物源として、沸点である 100 °C を超えて加圧された高温高压の亜臨界水処理を適用することで、機能性を持つオリゴ糖の製造を実現することを目的とした。自作の流通式亜臨界水抽出システムを用いて、抽出カラムに酒粕を充填し、温度 140–180 °C、圧力 20 MPa で昇温、加圧された水を流通させることで抽出を実施した。抽出は 120 分間連続で実施し抽出物を回収した。また従来法との比較として、100 °C の湯浴での抽出も実施した。各条件により得られた抽出液に含まれる糖の同定は液体クロマトグラフ質量分析計を用いて行った。更に蒸発光散乱検出器を用いて同定された糖の定量を行うことで、抽出温度が抽出物中の糖の組成に及ぼす影響を評価した。

抽出液中の全糖濃度と還元糖濃度から求められた平均重合度は 140 °C の亜臨界水抽出条件で最も小さく 1.83 で、100 °C の湯浴での抽出条件で最も高く 3.15 であり、亜臨界水により多糖やオリゴ糖が分解されて、より重合度の小さい糖が抽出された可能性が示唆された。高速液体クロマトグラフを用いた糖組成の分析結果より、抽出液中には単糖のグルコース、二糖のニゲロース、マルトース、イソマルトース、三糖のマルトトリオースが主に含まれていることが明らかとなった。グルコースやイソマルトースは従来法である 100 °C の湯浴での抽出で抽出物中の含有量が最大となり、抽出温度の上昇に伴い減少した。一方で、マルトースやマルトトリオースは 160 °C の亜臨界水抽出で含有量が最大となり、更に、ニゲロースは抽出温度の上昇に伴い増加し、抽出温度 200 °C で最大となり、酒

粕 1 g あたり 8.5 mg 生成された。各糖の抽出量の違いは、多糖である澱粉から分解することで生成および抽出される一方で、それらも分解するため、生成速度と分解速度のバランスに起因することが考えられる。更に、高温で抽出量が増加したニゲロースについては、通常澱粉に含まれていない α -1,3 結合の二糖であり、抗う蝕性および免疫賦活・調節作用等の生理活性が報告されていることから、亜臨界水処理により酒粕から機能性オリゴ糖を生成できることが裏付けられた。今後は、亜臨界水処理の温度と時間、圧力の条件を更に変化させることで、ニゲロースやその他の機能性オリゴ糖の生成量が最大となる条件を探索していく必要がある。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

研究背景

酒粕は、清酒製造に伴う副産物であり、国税庁の調査(令和 6 酒造年度)によると全国では年間 35,364 トン生成されたことが報告されており、これは年間の清酒総製造量の約 1.1 割に相当する。[1] 現状では、その多くが産業廃棄物として処理されるか、付加価値の低い飼料・肥料等の利用、あるいは粕漬け、甘酒の原料として用いられている。酒粕には、100 g あたりに炭水化物が 23.8 g、脂質が 1.5 g 含まれており、豊富な炭水化物源としての利用が期待できる。清酒の製造過程では、酵素による米澱粉の分解とアルコール発酵が同時に行われるが、この酵素の作用により通常の原料米には存在しないオリゴ糖が製造され、近年共同研究者らにより清酒内から発見された。[2,3]ここで、オリゴ糖は最小単位である単糖が 2-10 個重合した炭水化物の総称であり、ヒトが摂取した際の健康増進効果を意味するプレバイオティクス作用を示すものが複数存在する。近年では、機能的付与を目的とした食品添加物としての使用に留まらず、食品や医薬品業界など様々な分野で広く使用されており、新規のオリゴ糖の発見や製造プロセス開発が求められている。酒粕に含まれる炭水化物も同様に、このような新規のオリゴ糖で構成されている可能性が十分に考えられるが、検討した例はほとんどない。申請者は、酒粕を豊富かつ未知のオリゴ糖の供給源としての利用可能性を仮説立て、亜臨界水抽出によるオリゴ糖の新規製造プロセスを提案する。ここで、水の臨界点は 374 °C、22.1 MPa であり、水の沸点 (100 °C) を超えて加圧された液体状態の水は亜臨界水と呼ばれ、亜臨界水は 200 °C 以上の高温では、誘電率が低下し有機溶媒と類似した特性を示す他、イオン積が増加することにより加水分解反応が進行する。この特性を利用することで、酒粕から亜臨界水を用いてオリゴ糖の抽出、製造が期待される。そこで本研究では亜臨界水抽出を用いた酒粕からのオリゴ糖製剤の製造プロセスを提案するため、温度 140-180 °C、圧力 20 MPa で酒粕から亜臨界水抽出を行い、得られた抽出物中の糖濃度や平均重合度、更に得られた抽出物中の糖の組成を明らかにし、従来法として 100 °C の湯浴と比較を行った。

研究方法

亜臨界水抽出

本実験では自作の流通式亜臨界水抽出システムを使用した。抽出装置の概略図を図 1 に示す。本装置は、高圧ポンプ(LC-20AT, 株式会社島津製作所)、試料を加熱するための送風定温乾燥器(DKM301, ヤマト科学株式会社)、および反応容器としての容量 25 mL の手締め式高圧容器

(Thar Process 社)により構成される。反応容器の下部および上部には、容器内の空隙を埋め、流路を安定させる目的でガラスビーズを充填し、その間に試料を 4.0 g 程度充填した。システム内の圧力は抽出容器下流に設置した背圧レギュレーター(HPB-450, 株式会社 AKICO)によって制御し、圧力計により常時監視を行った。

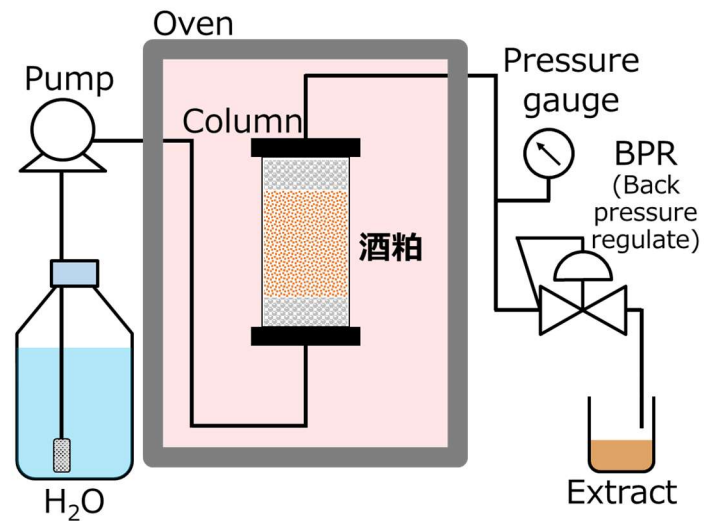


図 1 亜臨界水抽出装置概略図

亜臨界水抽出は、温度 140, 160, 180 °C、圧力 20 MPa 一定で行われた。蒸留水を送液ポンプにてカラムに流通させ、背圧レギュレーターの開度を調節することで所定の圧力まで昇圧した。その後、乾燥機の加熱を開始し、30 分間の予備加熱後、送液を再開することで亜臨界水抽出を行った。高温高压の亜臨界水により、酒粕中の糖をはじめとした成分が亜臨界水中により溶解または分解しながら溶解し抽出が行われる。背圧レギュレーターから抽出液を 120 分連続で回収し、各温度における抽出液中の糖の組成を分析することで、抽出条件がおよぼす影響を評価した。亜臨界水抽出と比較するために、100 °C の湯浴での抽出を従来法として実施した。

得られた抽出液中の全糖量はフェノール硫酸法を用いて、グルコース相等量として評価した。また還元糖量をソモギー・ネルソン法を用いて測定し、全糖量と比較することで抽出液中に含まれる糖の重合度を評価した。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)分析

抽出液中に含まれる糖の同定を行うため、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いて分析を行った。装置は Thermo Scientific TSQ Fortis Plus トリプル四重極質量分析計を使用した。分離用のカラムは HILICpak VG-50 4E カラム (4.6 mm× 250 mm、粒子径 5 μm; 昭和電気株式会社)を用いた。溶離液は 50 μM 塩化リチウム水溶液 (A) とアセトニトリル (B) とし、グラジエント分析を行った。グラジエント条件は B: 85% (0–5min), 85→70% (5–44min)として分析を行った。カラム温度は 60 °C、流速は 1.0 mL/min とした。試料はポジティブモードの電ロスプレーイオン化法でイオン化させた。

次に同定された糖について定量分析を行うため、蒸発光散乱検出器(ELSD)を使用した。分析は LC-MS 分析と同様の条件を使用し行った。ELSD の設定条件は、エバポレーター温度 75 °C、

ネブライザー温度 50 °C、ガス流量 1.5 L/min とした。

統計解析

抽出は各条件 3 回ずつ実施した。統計的有意差は、一元配置分散分析および Tukey の多重比較検定を用いて評価し、有意水準は $p < 0.05$ とした。解析は Python の statsmodels library (version 0.14.2) の pairwise_tukeyhsd 関数を用いて実施した。

結果および考察

140–180 °C の亜臨界水および 100 °C の湯浴で抽出を行い、得られた抽出液の外観を図 2 に示す。抽出温度が高温になるほど濃褐色を呈する傾向が確認されたことから、高温ほどメイラード反応が進行していることが示唆される。

次に、各抽出液中に含まれる全糖量、還元糖量を評価した。結果を図 3 に示す。酒粕 1 g あたりから抽出された全糖量は、湯浴(100 °C)で最も多く 280 mg であった。亜臨界水抽出においては、抽出温度 140, 160, 180 °C でそれぞれ 224, 249, 244 mg であり、亜臨界水抽出では温度による違いが確認されなかった。還元糖量は亜臨界水抽出 140 °C で最大値となり温度の上昇に従って低下する傾向が確認された。全糖量を還元糖量で除することで平均重合度を算出した

ところ、湯浴(100 °C)で 3.15、亜臨界水抽出については 140, 160, 180 °C でそれぞれ 1.83, 2.12, 2.82 であった。湯浴抽出物中には重合度の大きい糖が多く含まれており、140 °C の亜臨界水抽出物中には重合度の小さい糖が多く含まれる可能性が示唆された。

次に、LC-MS により抽出液中に含まれている糖の質量を調べ同定した後、同定された糖について定量を行った。図 4 に各抽出液の HPLC-ELSD のクロマトグラムと同定された各糖の構造式および該当するピークを示す。LC-MS の結果から各ピークの質量を測定し、糖の標準物質を分析し保持時間を比較することで、各糖の同定を行った。図 4 の結果から、本研究では単糖で

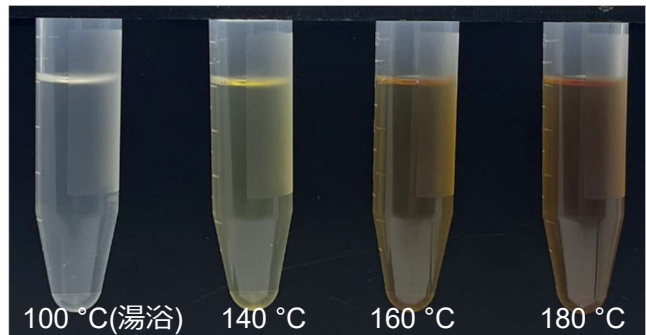


図 2 抽出液外観

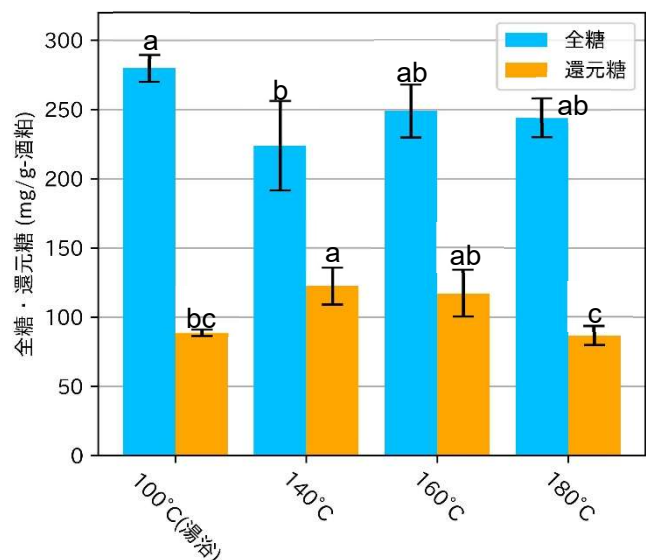


図 3 全糖・還元糖比較

異なる小文字のアルファベットは全糖または還元糖間において有意差 ($p < 0.05$) があることを示す

あるグルコースと二糖であるマルトース、イソマルトース、ニゲロース、三糖としてマルトトリオースが同定された。ここで、マルトースとマルトトリオースはグルコースが α -1,4 結合した構造であり、イソマルトースはグルコースが α -1,6 結合した構造である。これらは酒粕の原料である米を構成する澱粉のアミロース(α -1,4 結合)および α -1,6 結合で分岐したアミロペクチンに由来すると考えられる。一方で、ニゲロースはグルコースが α -1,3 結合した構造である。

次に、これら同定された糖について、HPLC のピーク面積に基づいて定量した結果を図 5 に示す。各糖の含有量には条件間で違いが確認された。どの条件においてもグルコースが最も多く含まれており、特に 100 °C の湯浴の条件で最大値となった。グルコースとイソマルトースは抽出温度の増加に伴い減少する傾向がみられ、どちらも 180 °C で最小値となった。マルトースおよびマルトトリオースは抽出温度の上昇に伴い増加し、160 °C で最大値となり、減少する傾向が確認された。一方でニゲロースは

抽出温度の上昇に伴い増加し、180 °C で最大となった。本研究における糖組成の変化は、原料である酒粕中の澱粉の加水分解と生成した糖の熱分解、あるいは転移反応等の影響を含んだ反応の結果であると考えられる。酒粕中の澱粉に含まれるアミロースおよびアミロペクチンが、亜臨界水抽出条件でランダムに加水分解されることで、中間生成物としてマルトースやマルトトリオース、イソマルトースが生成する。マルトースおよびマルトトリオースが 160 °C で最大値を示した一方で、イソマルトースが 100 °C から減少したことは、 α -1,6 結合が α -1,4 結合よりも熱分解されやすく、低温域で速やかにグルコースへと低分子化した可能性が考えられる。

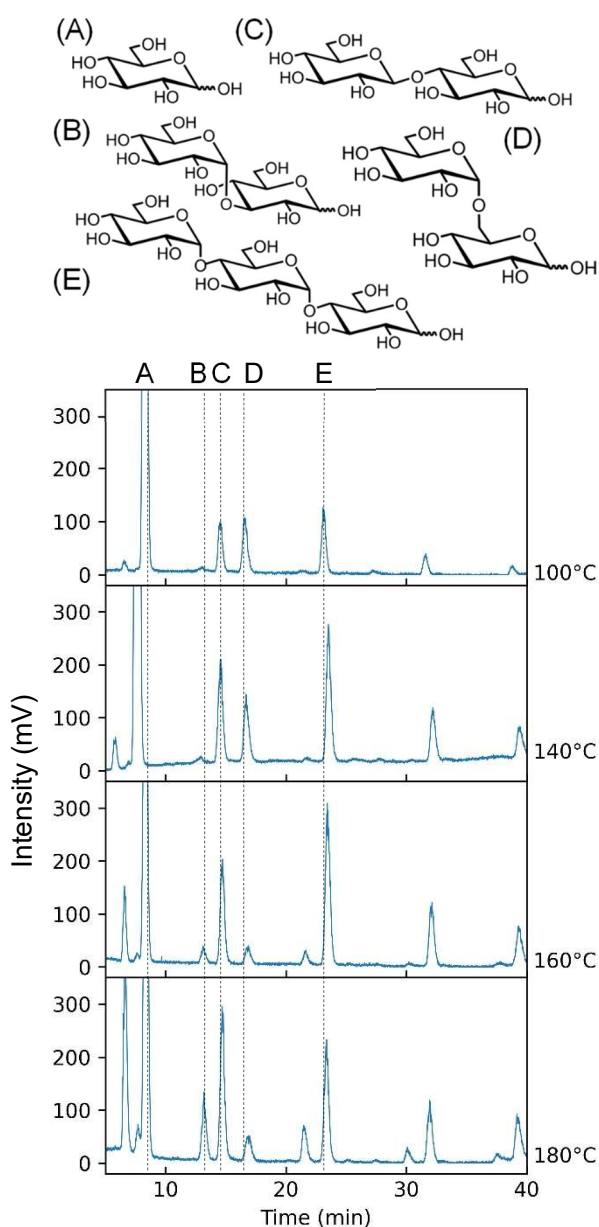


図 4 同定された各糖の構造式と各抽出液の HPLC-ELSD クロマトグラム. (A)グルコース、(B)ニゲロース、(C)マルトース、(D)イソマルトース、(E)マルトトリオース

また、これに加えて澱粉構造内における各結合の存在割合が影響していると考えられる。澱粉の主鎖を構成する α -1,4 結合は分岐部の α -1,6 結合に比べて多く存在する。そのため、高温域において α -1,4 の分解が進行したとしても高分子からの供給速度が分解速度を上回り、結果としてマルトースおよびマルトトリオースの抽出量が維持されたと推察される。一方、グルコースは温度上昇に伴い減少

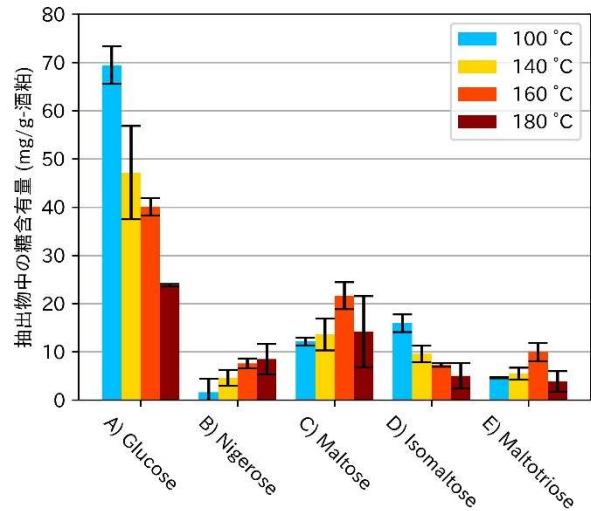


図 5 抽出液中に含まれる各糖の含有量

した。これは、亜臨界水条件下においてグルコースの分解反応が生成速度を上回ったためと考えられる。また、ニゲロース(α -1,3 結合)は温度上昇に伴い増加した。原料の澱粉構造内に α -1,3 結合は存在しないことから、これは単なる加水分解産物ではなく、亜臨界水中で生成した高濃度のグルコース分子間で起こる逆合成あるいはマルトースの配糖体転移反応によって二次的に生成したものと推察される。更にニゲロースは、抗う蝕性および免疫賦活・調節作用等の生理活性が報告されていることから、亜臨界水処理により酒粕から機能性オリゴ糖を生成できることが裏付けられた。以上より本研究では、亜臨界水処理を用いることで、従来法(湯浴)と比較して異なる糖の組成の抽出物が得られることが明らかとなり、抽出条件を変化させることで様々な糖の組成へと変化することが確認された。更に、機能性オリゴ糖であるニゲロースの回収量が増加したことから、亜臨界水処理を用いることで酒粕の有効利用につながる可能性が示唆された。今後は、亜臨界水処理の温度と時間、圧力の条件を更に変化させることで、酒粕からニゲロースやその他の機能性オリゴ糖の生成量が最大となる条件を探索していく必要がある。

参考文献

- [1] 国税庁.: 清酒の製造状況等について (令和 6 酒造年度) . <https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/seizojokyo/07.htm> (accessed 2026-01-15).
- [2] Honda, C., Katsuta, R., Yamada, M., Kojima, Y., Mamiya, A., Okada, N., Kawamura, T., Totsuka, A., Shindo, H., Hosaka, M., Nukada, T. and Tokuoka, M.: Novel glucoamylase-resistant gluco-oligosaccharides with adjacent α -1,6 branches at the non-reducing end discovered in Japanese rice wine, sake. *Carbohydr. Polym.*, **251**, 116993 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116993>.
- [3] Honda, C., Kosuge, M. (Takehisa), Katsuta, R., Yamada, A., Yaguchi, A., Kobayashi, I., Tanaka, M., Tanaka, H., Kanemoto, Y., Gomi, K. and Tokuoka, M.: Formation of branched oligosaccharides during sake brewing via transglycosylation by *Aspergillus oryzae* α -glucosidases. *Food Chem.*, **493**, 145845 (2025) <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145845>.