

# サイクロオリゴ糖の包接作用に対する各種修飾剤の影響

延永真実・清野友香・高田理会・森麻紀子・荒木紀美・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

Effects of various chemical reagents on the inclusion by cyclic-oligosaccharides

Mami NOBUNAGA, Yuka SEINO, Rie TAKADA, Makiko MORI, Motomi ARAKI  
and Mikihiko KOBAYASHI

*Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University*

Among the monosaccharides and oligosaccharides, maltooligosaccharides containing 6~8 glucoses showed high reactivity when incubated with 4 types of surfactants. In the presence of cetavlon (CTAB) or sodiumborate (borax), which were known to modify the structure of sugar, guest molecules of catechin, and glucosamine (GlcNH) showed high reactivity with cyclodextrin (CD) molecules, indicated by significant spectral changes of the reaction products. TLC and HPLC analyses of the reaction products with chitosan-oligomer showed that several forms of the reaction products were detected besides the donor substrate of the CD molecules. Cyclodextran (CI) having  $\alpha$ -1,6- linked cyclic structure of glucose molecule, showed somewhat different reactivity with catechin, compared with the case of CD. Based on these results, reactivity of cyclic-oligosaccharide for the inclusion reaction in the presence of various chemical reagents was discussed.

**Key words :** cyclic-oligosaccharides (サイクロオリゴ糖), inclusion (包接反応),  
surfactant (界面活性剤), CTAB (セタブロン), borax (ホウ酸ナトリウム)

## 1. 諸言

サイクロデキストリン (CD、サイクロマルトオリゴ糖) は  $\alpha$ -1,4- 結合のグルコース (Glc) からなる環状オリゴ糖で、高い包接能をもつことが知られており、実用的な応用例も数多く見られる<sup>1)</sup>。CD はデンプンから作られ、Glc が 6 ~ 8 残基連結した、 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD がよく知られている<sup>2)</sup>。CD はワサビの辛み成分であるアリルイソチオシアネートを包接し、辛みを長時間持続させる効果<sup>3)</sup>がある。さらに CD では、色素や水に難溶性の分子を包接する作用が広く研究されている<sup>4)</sup>。

サイクロデキストラン (CI、サイクロイソマルトオリゴ糖) は  $\alpha$ -1,6- 結合の Glc からなる環状オリゴ糖で、極めて高い水溶性を示し、抗う蝕性を示すことが大きな特徴である<sup>5)</sup>。

CI が色素の包接能をもつことも報告<sup>6,7)</sup>されている。

本報告では、CD や CI などのサイクロオリゴ糖の包接反応に対して、界面活性剤や糖鎖修飾剤の作用性の有無を検討した。また、CD とカテキンの反応では複合体形成の分析を行い、数種の複合体と見られる生成物を検出した。

## 2. 実験方法

### 1) 試薬類

グルコース (Glc)、グルクロン酸 (GlcUA)、グルコサミン (GlcNH)、Tween 80、Triton X-100、セタブロン (CTAB)、ホウ酸 (borate)、ホウ酸ナトリウム (borax)、カテキンは和光純薬から購入した。ショ糖脂肪酸エステル (SFA・O-170、SFA・S-170) は三菱化成、 $\alpha$ -CD ~  $\gamma$ -CD は塩水港精糖、フジオリゴ FG67 は日本食品化工、キトサンオリゴ糖 (chitosan-oligomer) は焼津水産化学工業、CIplus (CIp) はシーアイバイオ (沖縄) 製のものをを用いた。

## 2) 包接の反応系

反応に使用した糖液 (Glc, GlcUA, GlcNH, FG67, chitosan-oligomer,  $\alpha$ -CD  $\sim$   $\gamma$ -CD, Clp) は 2.5% 濃度のものを 2ml 取り、これに修飾剤 (Tween 80, Triton X-100, SFA  $\cdot$  O-170, SFA  $\cdot$  S-170, CTAB, borate, borax, borax の中和品 (pH7.4) の各 20mM 濃度のもの 0.5ml を混合し、室温にて一晩、振盪して反応させた。次いで、反応液中に不溶物があればこれを遠心分離で除去後に、上清のスペクトル測定を行った。ゲスト分子の包接を見る実験では、0.1% カテキン、1% GlcNH、1% chitosan-oligomer の各 0.5ml を上記の反応液に加え、さらに室温にて一晩、振盪して反応させたものについて、上と同じくスペクトル測定を行った。反応生成物のクロマトグラフィーによる分析には、反応液を減圧濃縮して乾固したものを水で再溶解し、フィルター処理したものを測定に供した。

## 3) 吸光度およびスペクトルの測定

反応物の吸光度とスペクトルの測定は、分光光度計 (島津製作所、UV-1600) を用いた。

## 4) 複合体の分析

薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析は前報<sup>8)</sup>に準じて行った。TLC の展開溶媒は 70% アセトニトリルを用いた。HPLC 分析は、TSKgel Amide-80 カラム、溶離液は 55% アセトニトリル、流速 1ml/min の条件で行った。

## 3. 実験結果

### 1) 糖質と界面活性剤の反応性の測定

Glc などの単糖 3 種およびオリゴ糖の FG67、 $\alpha$ -CD を界面活性剤の Tween 80、Triton X-100 と混合して、そのスペクトルを測定した (Fig.1)。単糖は界面活性剤との反応性が小さく、対照との差が見られなかったが、オリゴ糖の FG67 と  $\alpha$ -CD では Tween との反応でスペクトルの紫外外部域の吸光度が高くなった。Triton では  $\alpha$ -CD との反応で可視部域の吸光度に幾分の増加が認められた。

ショ糖脂肪酸エステル SFA  $\cdot$  O-170 ではオリゴ糖でスペクトルの増加が見られた (Fig.2、③、④) が、酸性糖、アミノ糖では対照よりも吸光度が低下した。

SFA  $\cdot$  S-170 では単糖との反応性がやや高まり、オリゴ糖でも吸光度の増加が認められた (Fig.2、⑤～⑦)。このように、各種の界面活性剤の添加はオリゴ糖やサイクロオリゴ糖との反応性を増強する効果をもたらすことが示唆され、スペクトル分析によりその効果の強弱を判定することができることが明らかになった。

### 2) CD による包接と糖鎖修飾剤の影響

次に、GlcNH、chitosan-oligomer と CD との反応性を測定した。ここでは糖鎖修飾剤として糖質との相互作用が既に広く知られているセタブロン (CTAB)<sup>9)</sup> と、ホウ酸ナトリウム (borax)<sup>10,11)</sup> およびその酸性型のホウ酸 (borate) を用いた。Fig.3 に示したように、GlcNH では、CTAB と  $\beta$ -CD との反応性が高く (Fig.3、②)、borx では  $\beta$ -CD で紫外外部域に高い吸収が見られた (Fig.3、④) 又、chitosan-oligomer と CD の反応では、 $\alpha$ -CD と CTAB および borate でのパターンは類似しており反応性が小さかった (Fig.3、⑤)

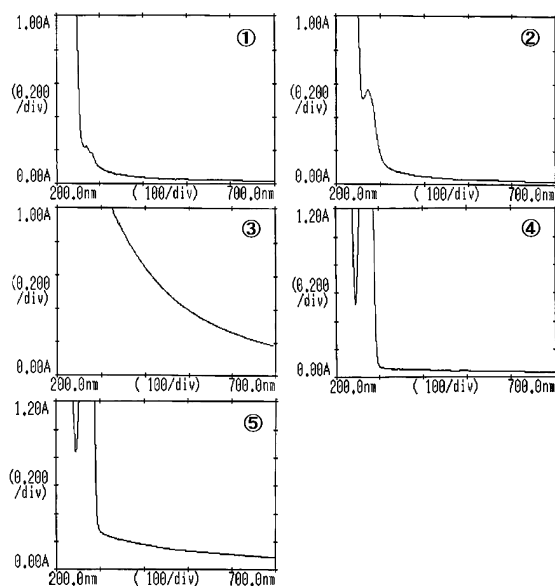


Fig.1 Tween 80, Triton X-100 と各種糖質との反応スペクトル分析

糖質として、Glc, GlcUA, GlcNH, FG67,  $\alpha$ -CD および対照 (水) を用いた。チャートは結果の抜粋を示す。① Tween + Glc、② Tween + FG67、③ Tween +  $\alpha$ -CD、④ Triton + Glc、⑤ Triton +  $\alpha$ -CD。

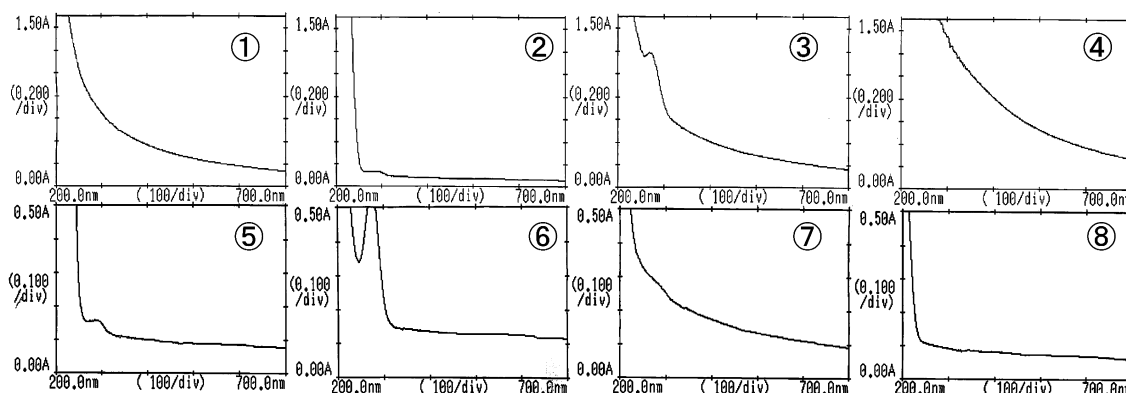


Fig.2 ショ糖脂肪酸エステル SFA・O-170、SFA・S-170 と各種糖質との反応スペクトル分析  
糖質として、Glc、GlcUA、GlcNH、FG67、 $\alpha$ -CD および対照 (水) を用いた。チャートは結果の抜粋を示す。  
① O-170 + Glc、② O-170 + GlcUA、③ O-170 + FG67、④ O-170 +  $\alpha$ -CD、⑤ S-170 + GlcUA、  
⑥ S-170 + FG67、⑦ S-170 +  $\alpha$ -CD、⑧ S-170 + 水 (対照)。

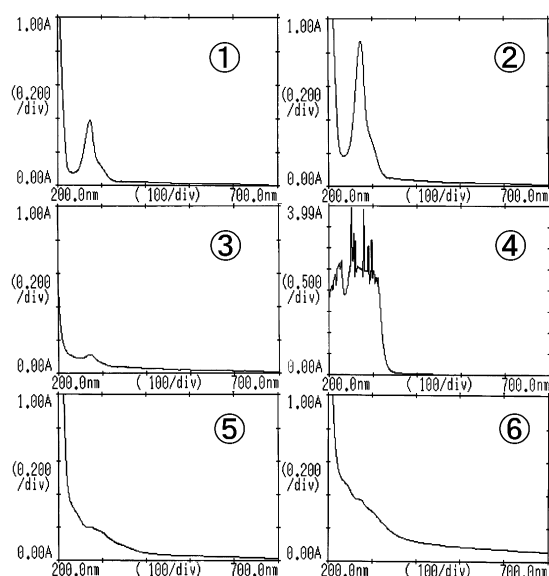


Fig.3 GlcNH、chitosan-oligomer と CD の反応に対する糖鎖修飾剤の CTAB、borate および borax の影響  
GlcNH : ①  $\alpha$ -CD + CTAB、②  $\beta$ -CD + CTAB、③  $\beta$ -CD + borate、④  $\beta$ -CD + borax  
chitosan-oligomer : ⑤  $\alpha$ -CD + CTAB、⑥  $\alpha$ -CD + borax。

が、borax では 300nm 付近のピークがやや大きくなった (Fig.3、⑥)。このように chitosan-oligomer と CD の反応はスペクトル分析ではあまり大きな差が得られなかったが、後述の TLC、HPLC 分析では糖鎖修飾剤の違いにより反応性に差があることが分かった。

さらに、カテキンをゲスト分子として、3種類の CD による包接能を測定した。修飾剤なしの系では  $\gamma$ -CD との反応性が高く、440nm 付近に高い吸収が現れた (Fig.4)。CTAB の添加により  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD でもこの領域の吸光度が高まった。ホウ酸は酸性を呈し、CD との相互作用は弱いと推定されたが、 $\gamma$ -CD では包接作用が亢進された。borax は  $\alpha$ -CD との反応で  $\beta$ -、 $\gamma$ -CD よりもカテキンのスペクトルを増強した。

### 3) CD と chitosan-oligomer との複合体形成の分析

上の Fig.3 に示した CD と chitosan-oligomer の反応で得られた反応生成物を濃縮して、TLC、HPLC により分析した。Fig.5 には TLC の結果を示したが、CTAB と borax (pH7.4) との反応では、原糖の CD 以外に数種のスポットが検出された。 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD では原糖より下の位置にも生成物が見られた。結果は示さないが、Glc を用いた別の実験では原点に強いスポットが得られ、より高分子の複合体の生成が示唆された。

Fig.6 には HPLC の結果を CD3 種についてまとめたものを示した。標準糖の  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD のピークはそれぞれ、相対保持時間 Rt が 5.6min、6.1min、6.7min であったが、修飾剤との反応生成物では TLC の結果と同様に多数の原糖以外のピークが検出された。特に borax (pH7.4) ではピーク数の多さが際立っていた。borax は糖の水酸基と結合錯体を形成<sup>11)</sup>

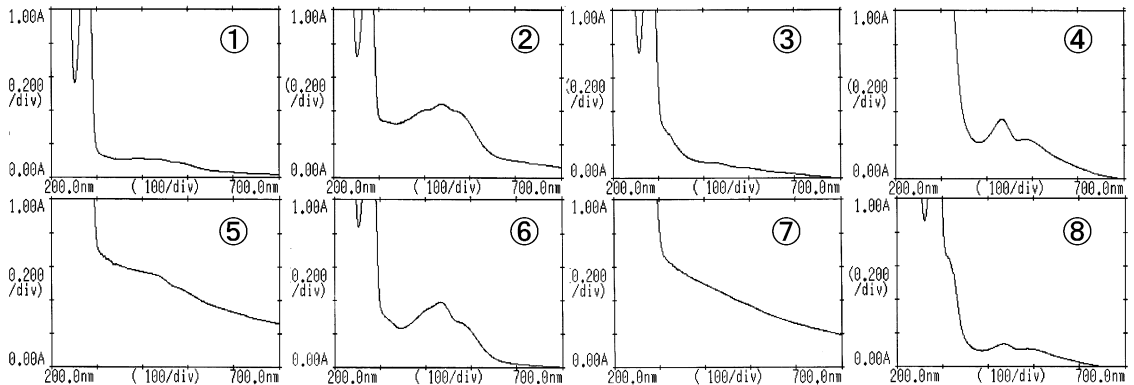


Fig.4 カテキンとCDの反応に対する糖鎖修飾剤のCTAB、borateおよびboraxの影響  
 ① $\alpha$ -CDのみ、② $\alpha$ -CD + CTAB、③ $\alpha$ -CD + borate、④ $\alpha$ -CD + borax、⑤ $\beta$ -CD + CTAB、  
 ⑥ $\gamma$ -CDのみ、⑦ $\gamma$ -CD + borate、⑧ $\gamma$ -CD + borax。

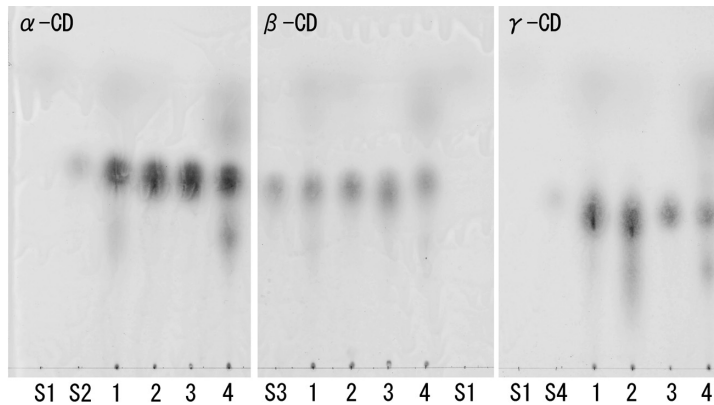


Fig.5 chitosan-oligomerとCDの反応生成物複合体のTLC分析  
 chitosan-oligomerとCDの反応性に対する糖鎖修飾剤のCTAB、borateおよびboraxの影響を測定した。  
 標準糖：S1 Glc、S2  $\alpha$ -CD、S3  $\beta$ -CD、S4  $\gamma$ -CD。試料：1 CTAB、2 borate、3 borax、4 borax (pH7.4)。

することが知られており、CDの場合にはGlc残基が6～8個もあるために分子内に複数のホウ酸分子が結合して多様な複合体を生成するものと推測された。

#### 4) CIによるカテキンの包接と各種修飾剤の影響

先に述べた界面活性剤および糖鎖修飾剤の作用を $\alpha$ -1,6-結合の環状オリゴ糖であるサイクロデキストランを用いて測定した。この実験では不純物としてイソマルトオリゴ糖を含む粗標品のCIpを用いた。Fig.7のようにカテキンとCIの反応では、特に界面活性剤のSFA・O-170、S-170でスペクトルの吸光度の増加が見られ、TweenとTritonでも反応性が高くな

る傾向が見られた。CTAB、borate、boraxではCDと比較して289nm付近の吸光度が著しく低下しており、CDとは別の形で何らかの相互作用が起こっているものと考えられる。反応物のHPLC分析からもCIが各種の修飾剤の存在下でゲスト分子のカテキンと反応していることが示唆された。

#### 4. 考察

サイクロオリゴ糖は分子内部の空洞が疎水性に富み、ゲスト分子との包接化合物を形成することが知られている。本報告では、糖分子との相互作用を呈するCTABとboraxおよびその関連物質や界面活性剤の

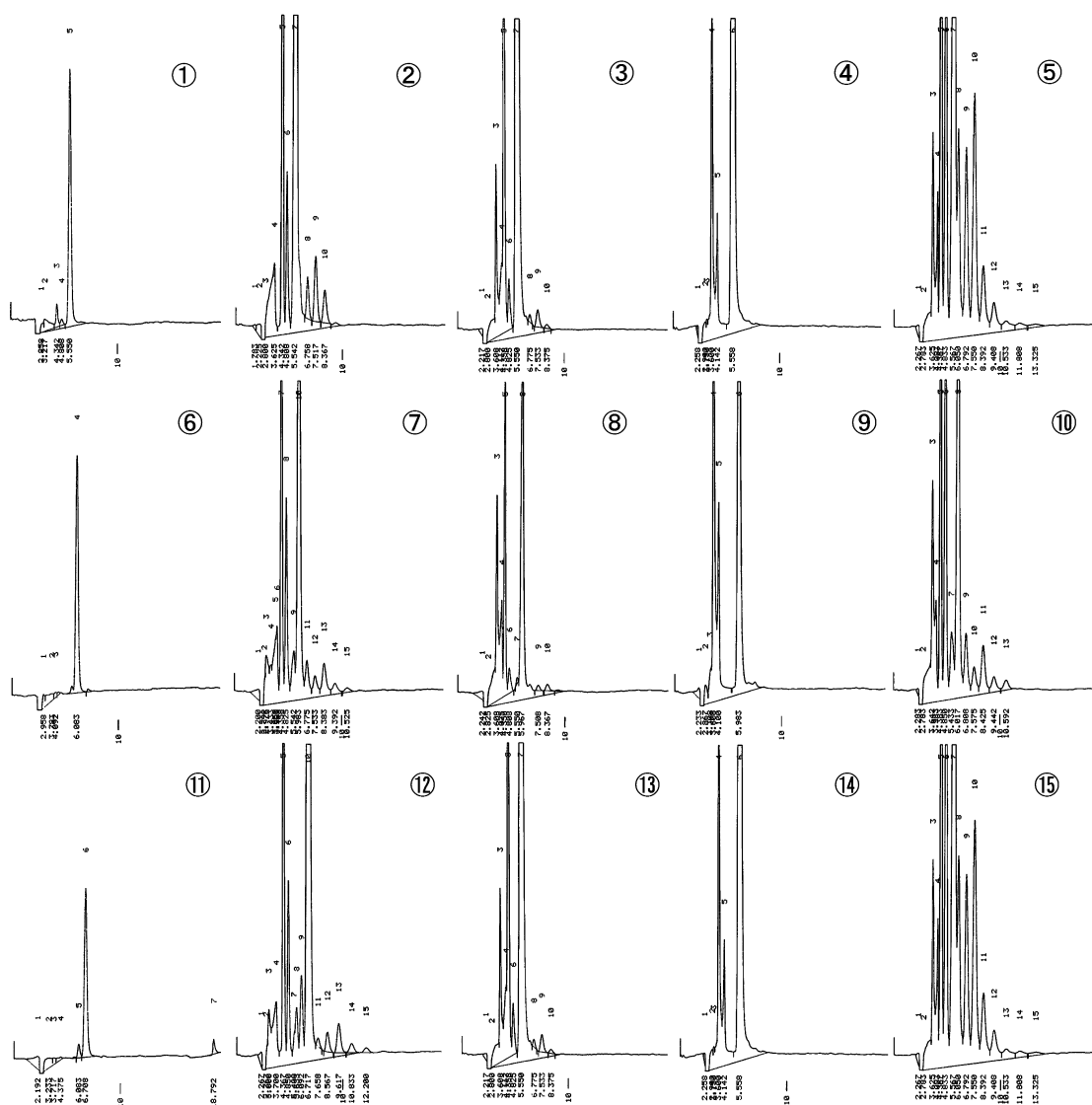


Fig.6 chitosan-oligomer と CD の反応生成物複合体の HPLC 分析

chitosan-oligomer と CD の反応性に対する糖鎖修飾剤の CTAB、borate および borax の影響を測定した。

- ①  $\alpha$ -CD のみ、②  $\alpha$ -CD + CTAB、③  $\alpha$ -CD + borate、④  $\alpha$ -CD + borax、⑤  $\alpha$ -CD + borax (pH7.4)、
- ⑥  $\beta$ -CD のみ、⑦  $\beta$ -CD + CTAB、⑧  $\beta$ -CD + borate、⑨  $\beta$ -CD + borax、⑩  $\beta$ -CD + borax (pH7.4)、
- ⑪  $\gamma$ -CD のみ、⑫  $\gamma$ -CD + CTAB、⑬  $\beta$ -CD + borate、⑭  $\gamma$ -CD + borax、⑮  $\gamma$ -CD + borax (pH7.4)。

存在下で、サイクロオリゴ糖の包接性の変化を測定した。単糖と FG67、CD による測定で、界面活性剤の Tween 80、Triton X-100、SFA・O-170 および S-170 は単糖には効果がなく、FG67 と  $\alpha$ -CD のみで明瞭な吸収スペクトルの増加が見られた (Fig.1、Fig.2)。

カテキンと CD の反応では、添加した糖鎖修飾剤に

よる相互作用の充進が認められた (Fig.3)。カテキン単独では現れない 350nm 付近のスペクトルの増大が生じたことはゲスト分子と糖鎖修飾剤が CD による包接効果に大きな影響を及ぼしていることを示している。ゲスト分子が糖の場合として、GlcNH についても同様の測定を行った (Fig.3)。この系でも、CD、

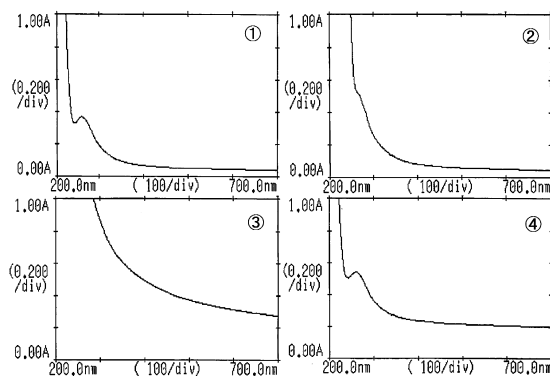


Fig.7 カテキンとClpの反応に対する糖鎖修飾剤のCTABおよび、界面活性剤のTween 80、SFA · O-170、SFA · S-170の影響  
① CTAB、② Tween 80、③ SFA · O-170、④ SFA · S-170。

ゲスト分子、修飾剤の3者間に相互作用の増幅が生じる場合があることが確認された。このように修飾剤が包接作用を亢進する効果をもたらすことは極めて興味深い。

CDとchitosan-oligomerの反応の生成物のTLC分析では、もとのCDとは異なる位置に複数のスポットが検出され (Fig.5)、生成物が単一ではないことが示された。HPLC分析の結果 (Fig.6) はこれと対応し、TLC分析の場合よりも多数の成分の存在が明らかとなった。今回のHPLCの分析条件ではchitosan-oligomerはAmide-80カラムに強く保持されて、図に示した20分間の分析時間内には溶離されないことから、Fig.6のCD以外のピークはいずれもchitosan-oligomerが包接体又は、複合体の形で溶離されたものと考えられる。この部分をさらに精査できれば、より興味深い知見が得られるものと期待できる。

CIとカテキン、各種修飾剤の反応では、CDとはやや異なる結果 (Fig.7) が得られた。大半の反応ではカテキンの287nmのピークが大きく減少していた。これに加えて、界面活性剤の添加では、吸収スペクトルの増加が見られ、糖鎖修飾剤よりも作用が大きい可能性も示唆された。CIによるビクトリアブルーの包接は、CDよりも大きいこと<sup>6)</sup>、大環状のCI-12がこの色素の包接能がそれ以外の鎖長のCIよりも大きいこと<sup>7)</sup>が報告されている。大環状のCIは疎水性環境などの違いから、包接の研究には有用なものになる可

能性も期待される。

最近の論文では、CDによるトコフェロールの包接が報告されている。これは難水溶性のトコフェロールを包接により可溶化したもの<sup>12)</sup>で、極めて斬新な方法として注目される。現在、我々は、食品中の色素の包接に関する検討を進めており、興味深い結果が得られているので、次の機会に報告したい。

## 文献

- 1) 住吉秀幸、大石真奈美、中村信之：ナノマテリアル・シクロデキストリン、シクロデキストリン学会編、米田出版、203-218 (2005)
- 2) M.L. ベンダー、M. コミヤマ：シクロデキストリンの化学、平井英史、小宮山真訳、学会出版センター、17-47 (1979)
- 3) 塩水港精糖 HP <http://www.ensuiko.co.jp/index.php> <商品情報>
- 4) 寺尾啓二：食品開発者のためのシクロデキストリン入門、服部憲治郎監修、日本食糧新聞社、9-14 (2004)。
- 5) M. Kobayashi, K. Funane and T. Oguma: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 861-1865 (1995)
- 6) T. Oguma and H. Kawamoto: Production of cyclodextran and its application. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 91-99 (2003)
- 7) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, T. Miyagi, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y-M. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi: A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomalto-decaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins. *J. Biotechnol.*, **130**, 188-192 (2007).
- 8) 荒木紀美・竹内梓・小林唯・柳田彩乃・河野祥子・関澄恵・池和田恵・小林幹彦：エリンギ (*Pleurotus eryngii*) のトレハラーゼ：酵素の分布、精製および性質について。実践女子大学生生活科学部紀要, **48**, 19-25 (2011)。
- 9) 松田和雄：多糖の分離。「多糖の分離・精製法」生物化学実験法 **20**、学会出版センター、47-71 (1987)。
- 10) 松田和雄：電気泳動法。「多糖の分離・精製法」生物化学実験法 **20**、学会出版センター、106-114 (1987)。
- 11) 三崎旭：ゾーン電気泳動。「生物化学実験法 XI 糖質実験法」、別冊蛋白質核酸酵素、共立出版、60-69 (1968)。
- 12) 三国克彦・原浩司・三輪章志・小林昭一：日本食品科学工学会誌, **52**, 74 -79 (2005)。