

# リノール酸の酸化に対するサイクロオリゴ糖の影響

庄司紗都美・篠崎小記・清野友香・延永真実・荒木紀美・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

## Effects of cyclic-oligosaccharides on the oxidation of linoleic acid

Satomi SHOJI, Saki SHINOZAKI, Yuka SEINO, Mami NOBUNAGA, Motomi ARAKI and  
Mikihiko KOBAYASHI

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

Effects of cyclic-oligosaccharide (CD, CI), trehalose (Tr) and other sugars on the oxidation of unsaturated fatty acid of linoleic acid were evaluated. Oxidation reaction of linoleic acid was done with various oxidizing reagents (AAPH, FeCl<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>) under the various conditions (UV, 40°C, room temperature, in the light or dark). Oxidation of linoleic acid was measured by the POV method, TBA method, amount of radical produced, NEFA method, and spectral evaluation. Effects of added sugars were varied under the oxidation conditions. However, among the 12 sugars tested, cyclodextran CIp gave the best results of suppression of oxidation of linoleic acid. Moreover,  $\gamma$ CD and Tr also gave some effective prevention of oxidation. Because cyclic-oligosaccharides have high ability of forming the inclusion complex with various compounds, current results may be ascribed to the masking of fatty acid and/or oxidizing reagents decreasing the reactivity of oxidation.

**Key words :** cyclic-oligosaccharides (サイクロオリゴ糖), linoleic acid (リノール酸),  
anti-oxidation (抗酸化), trehalose (トレハロース), POV (過酸化価)

## 1. 諸言

不飽和脂肪酸の酸化反応を抑制する抗酸化剤に関する研究が数多く行われている中で、近年、糖質の関わりが注目されている。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 (GL) からなる環状オリゴ糖で、高い包接能をもつことから実用的な応用例が数多く見られる<sup>1)</sup>。CD はリノール酸などの不飽和脂肪酸の酸化防止作用をもつことも報告されている<sup>2)</sup>。最近では、トレハロース (Tr) の抗酸化作用が注目され、ラジカル生成反応の抑制、ハイドロペロキシド (HPO) 生成量や TBA 値の低減が報告されている<sup>3,4)</sup>。また、Tr がアスコルビン酸 2-グルコシドの抗酸化性を高めることも認められている<sup>5)</sup>。

我々は、サイクロデキストリン (CI、サイクロイソマルトオリゴ糖) がカテキンとの複合体形成反応において CD とは異なる結果を与え、界面活性剤などの各種修飾剤がゲスト分子の包接に効果的であることを報

告した<sup>6)</sup>。CI は  $\alpha$ -1,6-結合の GL からなる環状オリゴ糖で、極めて高い水溶性を示し、抗うつ性を示すことが大きな特徴であり<sup>7)</sup>、さらに、CI が各種色素の包接能をもつことも報告<sup>8,9)</sup>されている。

本研究では、リノール酸の酸化反応の進行を、良く知られているいくつかの方法を用いて測定し、CD や CI などのサイクロオリゴ糖および、それ以外の糖質による酸化反応の抑制効果について検討した。

## 2. 実験方法

### 1) 試薬

リノール酸、酸化剤 (AAPH (2,2'-アゾビス (2-メチルアミジノプロパン) 二塩酸塩)、FeCl<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>)、各種糖類 (trehalose、Tr ; glucose、GL ; dextrin、SD)、遊離脂肪酸 (NEFA) 量の測定キットおよび、その他の試薬は和光純薬製のものをを用いた。サイクロデキストリンの  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CD ( $\alpha$ C、 $\beta$ C、 $\gamma$ C) は塩水港精糖の製品、部分精製品のサイクロデキストラ

ンCI plus (Cp)、CI mix (Cm) はシーアイバイオ (沖縄) の製品、分子量約 2 万のデキストラン (DX) は名糖産業の製品を用いた。精製品の CI-7、CI-8、CI-9 (C7、C8、C9) は野田産業科学研究所の小熊哲哉博士からご恵与頂いたものを使用した。

## 2) 酸化反応の条件

酸化反応には、リノール酸をエタノールで 200 倍希釈し、酸化剤 (AAPH、FeCl<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>)、各種糖類 ( $\alpha$ C、 $\beta$ C、 $\gamma$ C、Cm、Cp、C7、C8、C9、Tr、GL、SD、DX、25mg/ml 濃度に調製) を加えて種々の条件 (UV、40℃、常温、暗所または明所) で行った。以下に主な反応系の条件を示す。条件検討ではここに挙げた酸化剤以外にも 5 種類の試薬を用いて酸化反応の条件を検討したが詳細は割愛した。

(1) FeCl<sub>3</sub>、40℃系 16mM リノール酸のエタノール溶液 1ml、蒸留水 0.5ml、糖液 0.5ml、4mM FeCl<sub>3</sub> を順次、混合し、40℃、暗所で反応させ、経時的にサンプリングした試料について酸化反応の進行を後述の方法で測定した。

(2) AAPH、40℃系 16mM リノール酸のエタノール溶液 0.25ml、蒸留水 1.0ml、糖液 0.5ml、100mM AAPH 0.25ml を順次、混合し、40℃、暗所で反応させ、経時的にサンプリングした試料について酸化反応の進行を後述の方法で測定した。

(3) 40℃、UV 系 16mM リノール酸のエタノール溶液 0.5ml、エタノール 2.0ml、糖液 1.0ml、4mM CuSO<sub>4</sub> 1.0ml を順次、混合し、40℃、暗所で反応させ、経時

的にサンプリングした試料について酸化反応の進行を後述の方法で測定した。

## 3) 酸化反応の測定

(1) POV 法による過酸化価の測定 サンプル 0.3ml に飽和ヨウ化カリウム 0.5ml 加え、1 分間混合してから、暗所で 5 分間放置した。その後、蒸留水 1ml、1%デンプン溶液を加えて混合し、1mM チオ硫酸ナトリウムで滴定した<sup>10)</sup>。

(2) TBA (TBARS) 法による脂肪酸酸化生成物量の測定常法により A532nm の吸光度を測定した<sup>11)</sup>。

(3) ラジカル (HPO) 生成量の測定 HPO 生成量はサンプル 200 $\mu$ l に 80%エタノールを 1.5ml 加えて混合し、A233nm の吸光度を測定した<sup>12)</sup>。

(4) NEFA キットによる遊離脂肪酸量の測定 非エステル結合型脂肪酸キット「NEFA C- テストワコー」を用いて A546nm<sup>13)</sup> の吸光度を測定した。

(5) 酸化反応のスペクトラム測定 各種の酸化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。

## 3. 実験結果

### 1) POV 法による測定

GL など 8 種類の糖質をリノール酸と混合し、40℃、72h の酸化反応に供し、POV 値を測定した (Fig. 1a)。3 種類の CD ( $\alpha$ C、 $\beta$ C、 $\gamma$ C) は糖質無添加のブランク (BL) と同程度の値であったが、Cm、DX、SD、GL では BL よりも高い値となり、酸化反応生成物の

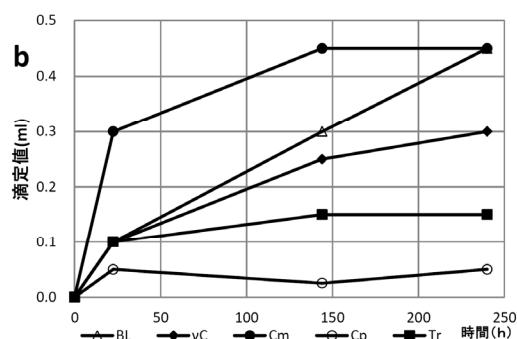
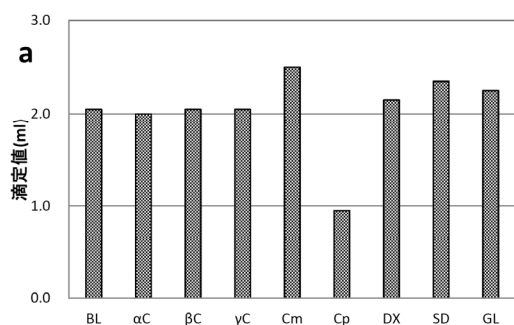


Fig.1 POV 法によるリノール酸の酸化反応の測定

1a、FeCl<sub>3</sub> を酸化剤として 40℃ で反応。本文の実験方法 2-2)-(1)、2-3)-(1) に従い、反応 8 日目の試料について測定。試料の略号は本文中に記載。1b、100mM AAPH をラジカル生成促進剤として 40℃ で経時変化を測定。

増加が見られた。しかし、Cp では BL の半分程度の値となり、酸化生成物の抑制が見られた。この実験とは別に長時間反応での経時変化を測定した (Fig. 1b)。10 日間の酸化反応の結果、Cm は BL と同程度の値となったが、 $\gamma$ C、Tr では明らかな抑制効果が得られた。Cp の場合には反応 24h での POV 値がそのまま継続的に持続され、 $\gamma$ C、Tr よりも高い酸化抑制の効果が見られた。

## 2) TBA 法による測定

6 種類の糖質をリノール酸と混合し、40℃または UV 照射の条件で 72h の酸化反応に供し、TBA 値を測定した (Fig. 2a)。40℃および UV では Cp の添加で TBA 値が最も小さく、それ以外の糖の添加では有効な抑制作用が認められなかった。Cm、 $\gamma$ C、Tr では BL 値よりも大きい結果さえも観察された。次に、

40℃における、より長時間の酸化条件で Cm、Cp、C7、C8、C9 についての測定を行った (Fig. 2b)。この測定でも Cp の抑制効果が最大であったが、Cm も 5 日目までは有効であった。精製品の CI では抑制効果が小さかったが、3 種類の CI の中では C9 の効果が相対的に高かったことから、CI の重合度との関係がある可能性が示唆された。Cm、Cp は粗標品であり、より高重合度の C10 以上のものも混在していることが考えられる。

酸化剤として FeCl<sub>3</sub> を使用し、40℃で経時変化を測定した (Fig. 2c)。この条件でも Cp の高い酸化抑制効果は先の結果と同じく再現されたが、Cm では BL 以上に酸化が促進され高い TBA 値が得られた。また、この測定では  $\gamma$ C と Tr の添加でも酸化反応の抑制が見られた。

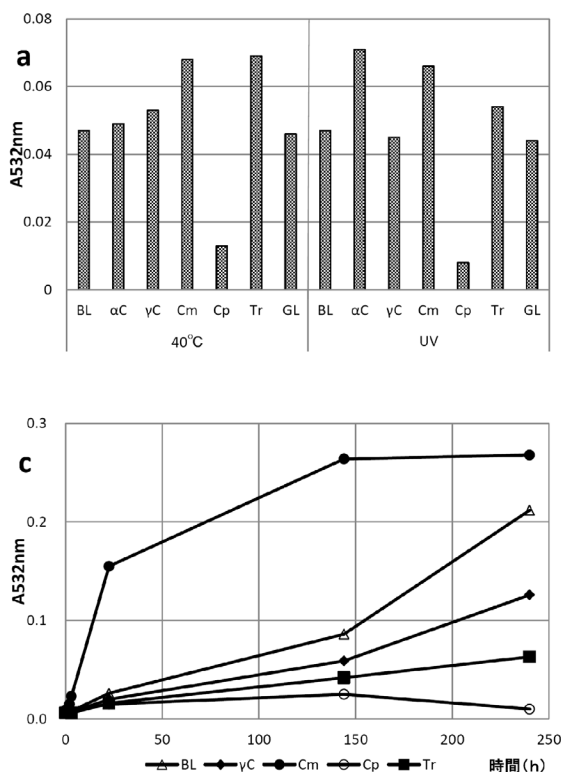


Fig.2 TBA 法によるリノール酸の酸化反応の測定

2a、6 種類の糖質とリノール酸との反応。左側は 40℃ 反応、右側は UV 照射反応。2-2)-(3)、2-3)-(2) に従い、反応 2 日後の試料について測定。2b、2-2)-(1) により CI の種類を変えて反応。2c、2-2)-(2) に従い、100mM AAPH、40℃で経時変化を測定。

### 3) ラジカル (HPO) 生成量の測定

酸化剤として  $\text{FeCl}_3$  を使用し、 $40^\circ\text{C}$  で 1 日目、6 日目に HPO ラジカルの生成量を測定した (Fig. 3a)。1 日目に比べて糖を添加した系では 6 日目にラジカル生成の抑制が見られ、CD や Tr の他に GL でも同程度の効果が見られた。次にラジカル生成促進剤の AAPH を添加し、 $40^\circ\text{C}$ 、3 日目に反応を測定した (Fig. 3b)。この条件では  $\gamma\text{C}$ 、Cm、DX でやや抑制が見られたが、ここでも Cp の効果が最も高く現れた。

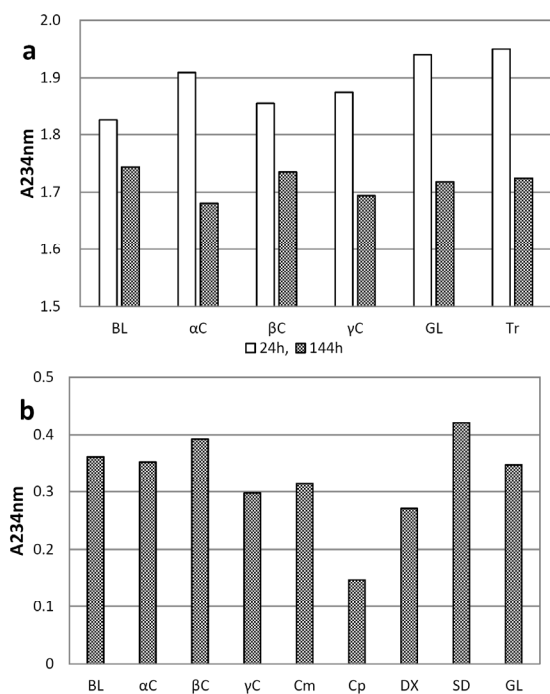


Fig.3 ラジカル生成量に基づくリノール酸の酸化反応の測定

3a、 $\text{FeCl}_3$ 、 $40^\circ\text{C}$  の反応。2-2)-(1)、2-2)-(3) に従い、反応 1 日および 6 日間反応後の試料について測定。  
3b、2-2)-(2) に従い、100mM AAPH、 $40^\circ\text{C}$  で 3 日間反応後の試料について測定。

### 4) NEFA キットによる遊離脂肪酸量の測定

先に示した Fig. 2a の反応系で NEFA キットによる遊離脂肪酸量の測定を行った。ここでは測定値を反応に供したリノール酸の減少量として評価したが、これはカルボキシ基の残存量を表すものとの考え方に基

理条件に応じて変動は見られるものの、3 日間 (72h) の反応に比べて長時間処理の 13 日間の反応では Cp の添加で残存カルボキシ量が最大であった。BL 値は  $40^\circ\text{C}$  反応で UV よりも小さいことからリノール酸の酸化は UV よりも高温により起こりやすいと考えられる。次に、Fig. 2b の反応系で  $40^\circ\text{C}$ 、長時間の酸化条件で Cm、Cp、C7、C8、C9 についての NEFA 測定を行った (Fig. 4b)。この測定では Cp と並んで Cm でもほぼ同等のリノール酸の酸化反応の抑制効果が 12 日間に渡って持続することが分かった。この測定でも C9 が C7、C8 よりも少し有効であることが見られ、CI の重合度が大きい場合ほど効果が高い可能性が再度、示唆された。

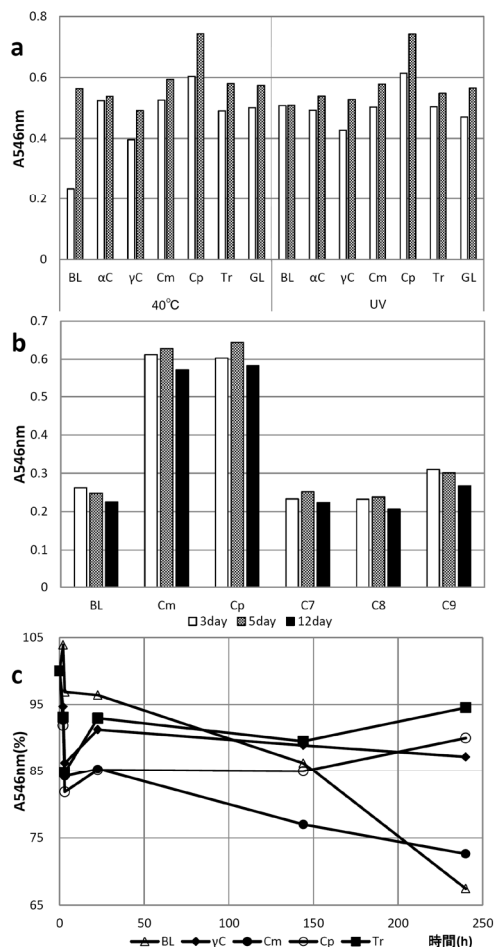


Fig.4 NEFA 法によるリノール酸の酸化反応の測定  
4a、Fig.2a の反応を 2-2)-(4) で測定。4b、Fig.2b の反応を測定。4c、Fig.1a の反応を測定。

酸化剤として  $\text{FeCl}_3$  を使用し、 $40^\circ\text{C}$  で経時変化を測定した実験 Fig. 2c の系についても NEFA 測定による糖の添加効果を測定した (Fig. 4c)。測定結果は先の TBA 法によるものと対応しており、Cm では BL 以上に酸化が促進される一方で、 $\gamma\text{C}$  と Tr の添加で酸化反応の抑制が見られ、Cp の高い酸化抑制効果が再現された。

### 5) 酸化反応のスペクトル測定

リノール酸の酸化をスペクトル変化で測定した実験から、 $\text{FeCl}_3$  の方が  $\text{CuSO}_4$  よりも大きなスペクトル変化を与えることが認められた (Fig. 5-①~④)。金属を加えない BL (Fig. 5-①) と比べて 6 日間反応の (Fig. 5-⑤) では明らかに 200 ~ 500nm 域でのスペクトルがブロードに変化した。

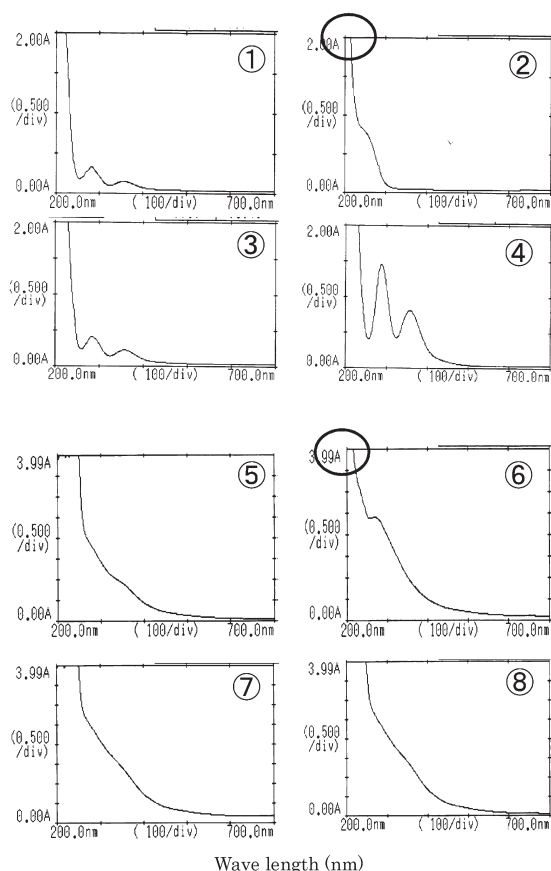


Fig.5 スペクトル分析によるリノール酸の酸化反応の測定  
①~④、2-2)-(1)の系にて室温で測定。① BL・24h、②  $\text{CuSO}_4$ ・24h、③  $\text{FeCl}_3$ ・24h、④  $\text{FeCl}_3$ ・48h。⑤~⑧、 $\text{FeCl}_3$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、6 日間の反応。⑤ BL、⑥ Cp、⑦  $\gamma\text{C}$ 、⑧ Tr。

これに対して Cp 添加の系 (Fig. 5-⑥) では 250nm 以下の波長での吸光度に差が見られ、BL (Fig. 5-⑤) での振り切れる点の波長 248nm に対して、Cp では 213nm と大きな違いが観察された。この差異は上述の Cp の作用と相俟って、Cp の酸化抑制作用を示唆するものと考えられる。一方で、 $\gamma\text{C}$  と Tr では BL と類似のスペクトルが得られた。(Fig. 5-⑦、⑧)。

### 4. 考察

CD、CI に代表される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反応性が高いことが知られている。脂肪酸との反応についても報告がある<sup>14~16)</sup>。本報告では不飽和脂肪酸の例としてリノール酸を用い、この酸化反応におけるサイクロオリゴ糖の添加がどのような影響を及ぼすかについて検討した。

リノール酸の酸化反応では水系の反応液組成にするためにエタノール濃度を約 17% になるように設定した。この条件では高分子多糖の DX と SD は一部が不溶化したが、CD と CI はエタノール濃度が 50% 以下では沈殿が生成せず、溶液状態での反応が可能であった。Tr と不飽和脂肪酸の反応ではエタノール濃度を 40% として測定された<sup>17)</sup> が、今回の検討では Tr より高重合度の CD、CI をも測定の対象としたためにエタノール濃度を下げて不溶性化が起こらないように配慮した。

リノール酸の酸化反応における条件は 3 通りの方法を基本として実施し、この反応に添加する糖質の種類を比較して酸化反応の抑制効果の有無を判定した。酸化反応の進行は 6 種類の方法で測定したが、ここでは主としてスペクトル解析を含む 5 つの方法で評価した。結果として前述のように、糖の添加効果は反応条件によって異なるものが見られたが、酸化の抑制と評価される場合が多く得られた。特に、Cp では反応条件、測定法に拘らず、酸化反応の明らかな抑制が示された (Fig. 1~4)。Cm でも Fig. 2b、Fig. 4b に示したように、反応条件によっては抑制効果を呈したものもあった。

CD は不飽和脂肪酸の酸化反応の抑制に効果的であることが報告されている<sup>2)</sup>。この報告では反応条件によって CD の種類と酸化の抑制効果には差が見られるが、 $40^\circ\text{C}$ 、UV 照射下では特に  $\alpha\text{C}$  の効果が高くなっ



ている。CD は不飽和脂肪酸や酸化剤に対する包接作用がある<sup>14~16)</sup> ため、酸化反応が起こりにくい状態を保持することで酸化を抑えるものと考えられる。今回の結果でも、 $\gamma$ C などで抑制効果が認められた。

CI の場合にも色素の包接作用が報告されており<sup>8,9)</sup>、CD と同様の機序で酸化反応の抑制をもたらすものと考えられている。本報告の結果では Cp の効果が最も高く、各種の酸化条件や測定法で優れた抑制効果が検出された。Cp は C7 ~ C9 に比べて、部分精製品であるために、より高重合度の CI を含んでいる。このことが高い抑制効果をもたらす理由とも推定される。一方で、サトウキビ糖蜜を加熱処理することで、ラジカル消去活性などの高い抗酸化活性が得られることが報告された<sup>18)</sup>。

CI の酸化反応の抑制効果と並んで、Tr の作用にも注目すべき結果が報告されている。Tr は近年、種々の機能性が報告されているが、不飽和脂肪酸の酸化反応の抑制に関しても興味深いラジカル消去能が認められている<sup>4,5,19,20)</sup>。すなわち、Tr は AAPH の存在下にリノレン酸から生成する HPO 量の減少、TBA 値の減少をもたらすとの結果である。Tr には CD、CI に見られる包接作用は見られないが、脂質の酸化抑制に関与する部位が 3 位および 6 位にあることが示唆されている。また、これとは別に、アスコルビン酸 2- グルコシドの抗酸化性が Tr により増強されることも報告されている<sup>6)</sup>。

本研究では中性糖について抗酸化の作用を測定したが、キトオリゴ糖でも抗酸化作用が報告されている<sup>21)</sup>。他にもペクチンや硫酸化糖などで類似の報告があり、糖質の抗酸化作用は未知の部分が数多くあると思われる。糖質は水溶性で、脂質は脂溶性であることから相互作用を測定する際には条件を工夫する必要があるが、ポリフェノール化合物の水酸基と類似の作用が糖質の水酸基でも発揮されるのかは極めて興味深い。

## 文献

- 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)
- 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)
- 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)。
- 奥 和之、黒瀬真弓、茶園博人、福田恵温、辻坂好夫、櫻井実：トレハロースによる不飽和脂肪酸のラジカル酸化抑制作用。 *J.App.Glycosci.*, 52, 381-385 (2005)。
- 奥 和之：糖質の脂質変敗抑制作用メカニズムに関する研究。 *J. Appl. Glycosci.*, 55, 51-59 (2008)。
- 小川智史、道田真帆子、木村英人、中村優子、有福一郎、横田一成：アスコルビン酸 2- グルコシドの抗酸化性に対するトレハロースの増強効果。 *日食工誌*, 60, 193-197 (2013)。
- 延永真実、清野友香、高田理会、森麻紀子、荒木紀美、小林幹彦：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。 *実践女子大学生活科学部紀要*, 51, 1-6 (2014)。
- M. Kobayashi, K. Funane and T. Oguma: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligo-saccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 861-865 (1995)
- T. Oguma and H. Kawamoto: Production of cyclodextran and its application. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 15, 91-99 (2003)
- 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 cyclo-dextrins. *J. Biotechnol.*, 130, 188-192 (2007)。
- 日本油化学協会編：“基準油脂分析試験法”(1967)、朝倉書店。2.4.12.71
- 立花陽子、堀部紗世、田和理市：ピートモス中の腐植物質の抗酸化活性について (1)。 *微量栄養素研究*, 23, 104-108 (2004)。
- 井上尚典、浜崎敦子、日高修二、三浦直良、深堀勝博、丸山真杉、河原聡、太田一良、六車三治男：ブタ肝臓水解物の成分分析及抗酸化活性及びアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の検討。 *YAKUGAKU ZASSHI*, 133, 107-115 (2013)。
- K. Asakura, N. Tanaka, T. Kanauchi, S. Matsumura, and S. Yoshikawa : Affinity of Cyclodextrins to Hydroperoxides. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, 41, 203-206 (1992)。
- 安達修二：脂質の粉末化と酸化抑制。 *日食工誌* 43, 977-982 (1996)。
- H. Yoshii, T. Furuta, M. Fujiwara, and P. Linko: Oxidation stability of powdery ethyl eicosapentanoate included in cyclodextrins and polysaccharide /cyclo-dextrin mixtures. *Japan J. Food Engineering.*, 4, 25-30 (2003)。
- 奥和之、黒瀬真弓、久保田倫夫、福田恵温、栗本雅司、辻坂好夫、櫻井実：水／エタノール系における不飽和脂肪酸の酸化に及ぼすトレハロースの影響。 *日食工誌*。

- 50、133 ～ 137 (2003).
- 18) 氏原邦博、吉元誠、和田浩二、高橋誠、須田郁夫：サトウキビ糖蜜の抗酸化活性に及ぼす加熱加工の影響. 日食工誌、60、159-164 (2013).
- 19) K.Oku, M.Kurose, M.Kubota, S.Fukuda, M.Kurimoto, Y.Tujisaka, A.Okabe, M.Sakurai: Combined NMR and quantum chemical studies on the interaction between trehalose and dienes relevant to the antioxidant function of trehalose. *J Phys Chem B.*, 109, 3032-40 (2005).
- 20) K.Oku, H.Watanabe, M.Kubota, S.Fukuda S.M. Kurimoto, Y.Tsujisaka, M.Komori, Y.Inoue, M.Sakurai: NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH... O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J.Am.Chem.Soc.*, 125,2739-48 (2003).
- 21) A-S.Chen, S.Taguchi, K.Ssakai, K.Kikuchi, M-W. Wang and I. Miwa: Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose. *Biol.Pharm.Butl.* 26, 1326-1330 (2003).

