

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780100

研究課題名（和文）環状糖類による機能性香気成分の包接特性の理論化に関する研究

研究課題名（英文）Theoretical estimation for the complexation behavior of functional volatile compounds with cyclic dextrans

研究代表者

石川 洋哉（HIROYA ISHIKAWA）

九州大学大学院・農学研究院・助教

研究者番号：00325490

研究成果の概要：

本研究では、種々の機能性を有する香気成分を食品加工、貯蔵過程において安定且つ効率的にデリバリーシステムすることを目的として、環状構造を有する糖類を用いた包接安定化とその挙動解析を試みた。その結果、新規環状四糖・五糖に対するモデル香気成分の包接挙動を市販のシクロデキストリンとの比較により明らかにするとともに、包接挙動が疎水的相互作用と分子サイズにより解析可能であることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：食品分析学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：(1) 機能性香気成分、(2) 環状四糖、(3) 環状五糖、(4) シクロデキストリン
(5) 分子包接、(6) 粉末安定化

1. 研究開始当初の背景

近年食品成分の機能性が脚光を浴びる中、食品香気成分にも種々の機能性が見出されており、現在までに、香辛料、ハーブ類、ラズベリー、醤油等の香気成分が、抗菌活性、抗酸化活性、抗がん活性等の機能性を有することが報告されている。機能性香気成分に対

する関心は高まるばかりであるが、香気成分の食品における安定性は低く、利用効率が極めて悪いため、機能性香気成分の利用に関する実用例はほとんど見あたらないのが現状であり、機能性香気成分を安定な状態で消費者へ供給可能な技術開発が強く望まれている。

環状の糖であるシクロデキストリン(CD)は分子内部に空洞を持ち、疎水的相互作用や分子間力などで、ゲスト分子を包接し、徐放する働きを有している。この性質を利用したCDによるマイクロカプセル化が、食品、化粧品、医薬品、包装材料、繊維分野といった多岐にわたる分野で利用されている。食品分野では、グルコース分子が6, 7, 8個からなる α, β, γ CDが使用されており、食品加工中や貯蔵過程における香気成分の分解劣化や揮発の防止を目的とした粉末安定化を初めとして、異味異臭成分の除去、溶解性や分散性の向上を目的とした利用が種々検討されている。研究代表者は、平成17-18年度科学研究費補助金若手研究Bにおいて、機能性を有する香気成分の安定且つ効率的なデリバリーシステムの構築を目的として、環状糖類による機能性香気成分の分子包接を試みてきた。本研究では、独自に入手した新規化合物である環状四糖Cyclic nigerosyl-nigerose(CNN)(未市販品)を用いることにより、従来のCDのみでは達成できなかった機能性香気成分の分子選択的な包接化を試みている。現在機能性を有する芳香族化合物をターゲットとして環状糖類による包接挙動を蛍光スペクトル測定により検討するとともに、得られたデータを解析することにより個々のターゲット香気成分に対する結合定数を算出し、最適環状糖の提示を行っている。しかしながら、本研究で得られたデータは、一部の香気成分に限定されたものであった。今後様々な香気成分に新たな機能性が発見されることが予測されることから、多種多様な香気成分に対応するため、包接特性の理論化が急務となっている。すなわち、これまでのCDによる包接では、対象化合物に対して経験に基づく個別対応が行われてきたが、環状糖類による機能性香気成分の効率的デリバリーシステムの確立には、分子構造の異なる種々の香気成分を対象とした包接挙動の系統的検討と、得られた知見に基づく包接理論の構築が必要不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、環状糖類による分子選択的な包接挙動の詳細な検討を行い機能性香気成分に対する包接理論の確立を目指した。環状糖類と包接香気成分との親和性を基にして包接挙動の解析が出来、包接理論を確立(包接理論式の設定)が可能になれば、香気成分包接挙動の理論予測が可能となる。結果として、最適包接法の提示が容易になり、本技術にブレークスルーを与えると予測される。さらに、新規環状四糖を含めた環状糖類の包接

性を理論的に解析できれば、複数成分からなる試料中の香気成分を目的に応じて選択的に包接することが可能となる。

そこで本研究では、対象香気成分として、分子サイズ、官能基、化学ポテンシャル(沸点)等の異なる化合物を選択し、構成糖数の異なる環状糖類を用いて香気成分の包接挙動を検討した。すなわち、新規環状糖類である新規環状四糖CNNによるモデル香気成分の包接挙動を検討し、既存のCDによる包接挙動との比較を行った。得られた包接挙動を香気成分と環状糖類間での親和性にに基づき解析するとともに、包接時間、温度等の包接関連因子の影響を検討した。さらに、新規環状四糖Cyclic maltosyl-maltose(CMM)及び新規環状五糖Isocyclo-maltopentaose(ICG5)の包接力の評価も併せて行った。

以上の研究を行うことにより、環状糖類による機能性香気成分の包接を総合的に評価し、各香気成分に対する最適環状糖の提示を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試薬

環状四糖 CNN、CMM 及び環状五糖 ICG5 は、林原生物化学研究所より提供して頂いた。 α, β, γ CD はナカライテスク社製の市販品を用いた。モデル揮発性成分として、以下の炭素数 4, 6, 8, 10 の直鎖状アルコール類、アルデヒド類、エステル類、炭化水素類を用いた。

アルコール類 ; 1-Butanol、1-Hexanol、1-Octanol、1-Decanol、以上ナカライテスク社製

アルデヒド類 ; *n*-Butanal、*n*-Octanal、*n*-Decanal、以上ナカライテスク社製、*n*-Hexanal (東京化成工業製)

エステル類 ; Ethyl Acetate、Ethyl Hexanoate、Ethyl Octanoate (ナカライテスク社製) Ethyl *n*-Butyrate (片山化学工業社製)

炭化水素類 ; *n*-Hexane (片山化学工業社製)、*n*-Octane (東京化成工業社製)、*n*-Decane (ナカライテスク社製)

また、芳香族類のモデル化合物としてシナムアルデヒド、オイゲノール、ラズベリーケトンを用いた(全てナカライテスク株式会社製)

抽出用の溶媒として Diethyl Ether (シグマアルドリッチジャパン社製)を用い、その他試薬類は全て特級試薬を使用した。

(2) 方法

直鎖状モデル香気成分の包接実験は、CNN あるいは CD 水溶液(5 mL)に対して香気成分を添加後、室温で一定時間攪拌することに

より行った。得られた溶液を凍結乾燥により粉末化した。包接された香気成分の定量は、粉末から香気成分をエーテル抽出した後、濃縮し GC 分析 (カラム ; DB - 5 , 0.32 mm × 60 m, 50 - 230°C 昇温分析 3°C/min) に供することにより行った。

芳香族化合物の包接挙動の検討は、蛍光スペクトル測定により行った。すなわち、モデル香気成分を 0.4 mM となるように溶解させた水溶液に対して、3-100 mM の濃度で調製した環状糖溶液を等量添加し、ボルテックミキサーで 1 分攪拌後、励起波長 360 nm、蛍光波長 400-450 nm で蛍光スペクトル測定を行った。コントロール (環状糖無添加) に対する糖添加溶液の蛍光強度の増加により包接挙動の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 環状糖類による直鎖状低分子化合物の包接挙動の解明

まず、CNN を用いて包接濃度条件の設定を行った。1-Hexanol, *n*-Hexanal, Ethyl *n*-Butyrate (5 mM) を用いて、包接率に及ぼす CNN 濃度の影響を 5 mM から 30 mM の濃度で検討した。その結果、図 1 に示すように、いずれの香気成分においても CNN 濃度の増加に伴い包接率の増加が認められたものの 20 mM 以上の濃度の増加は緩やかであった。

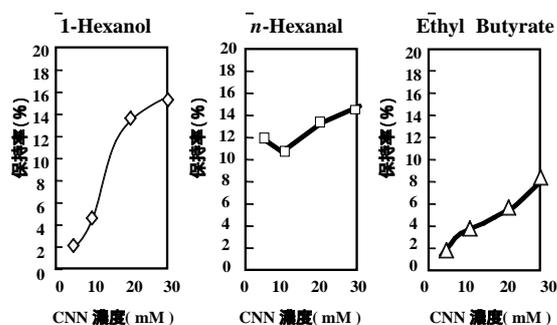


図1 香気成分の包接に及ぼすCNN濃度の影響

さらに、CNN 濃度 20 mM の条件下で、香気成分濃度を変えて包接率を確認した結果、5 mM を境に減少もしくは一定という傾向が認められた (図は示していない) ことから、本条件 (CNN 濃度 20 mM、香気成分濃度 5 mM) を以後の包接実験で採用した。さらに、同濃度条件下でグルコース及び直鎖状四糖 (マルトテトラオース) を用いて粉末化試験を行った結果、これらの糖では香気成分が保持されないことが判明し、環状糖の有用性が確認された。

続いて、CNN による包接挙動を炭素数 4-10

の化合物を用いて詳細に検討した (図 2)。

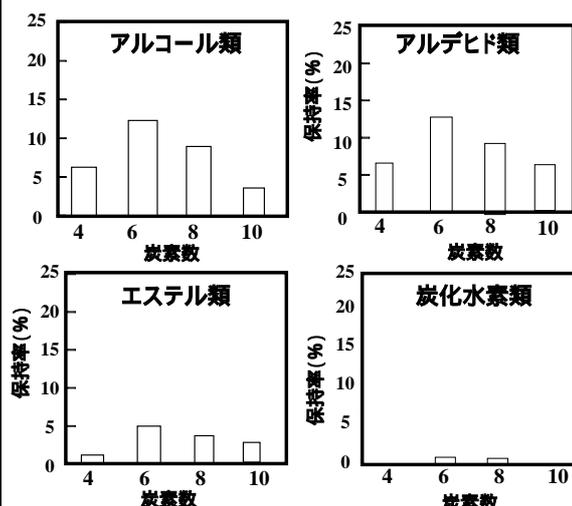


図2 CNN による香気成分の保持率の比較

その結果、アルコール、アルデヒド類では高い保持率が認められたものの、エステル類、炭化水素類の保持率が低いこと、また炭素数の増加により保持率が低下することが判明した。一方、β-CD による包接では、CNN とは異なり炭素数の増加に伴い包接率が増加する傾向が認められた (図 3)。

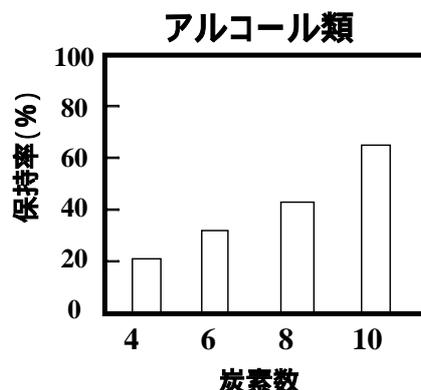


図3 β-CD によるアルコール類の包接挙動

さらに、各香気成分の log P 値 (1-オクタノール/水分配係数) を化学計算ソフトにより算出し包接挙動を解析した結果、β-CD では包接率と log P 値との間に良好な正の相関 ($r > 0.99$) が認められたのに対して、CNN では相関が得られなかった (図は示していない)。

以上の結果から、CNN と β-CD では異なる包接特性を有することが判明した。一般に、CD はファンデルワールス力や疎水的相互作用などを駆動力としてゲスト分子を包接し、包接複合体を形成する。β-CD の場合には、ゲスト分子の分子量増大に伴う疎水性の増加により保持率の増加が認められたと考えられる。一方、CNN の包接では、疎水的相互作用の影響は少なく、分子サイズが小さいほど

保持効率が高くなる傾向を示した。この結果は、CNN が低分子の揮発成分を特異的に包接する可能性を示唆しており、新たな包接挙動解析法の必要性が示唆された。またこの結果から、CNN では複数成分存在下においても低分子化合物を優先的に包接可能であること、すなわち食品マトリックス中の低分子化合物を分子選択的に粉末安定化することが可能であることが示唆された。

続いて、環状四糖（CNN、CMM）、環状五糖（ICG5）、 α -CD、 β -CD を用いて、その包接能力の比較を行った。図 4 はヘキサノール、エチルブチレートの包接率を示している。

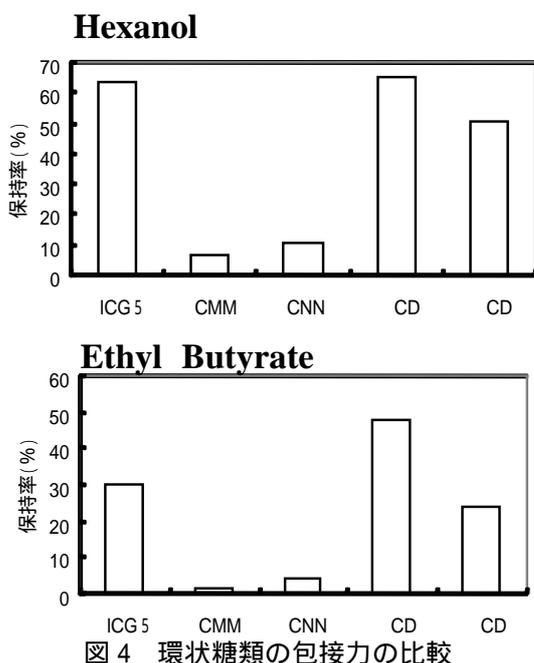


図 4 環状糖類の包接力の比較

図に示したように、環状四糖の包接力は、他と比較するとかなり弱いものであったが、この包接力の弱さが逆に低分子に対する特異性を生み出しているものと考えられた。一方、新規環状糖である ICG5 はシクロデキストリンに匹敵する包接力を有していることが判明した。本実験では、ICG5 の包接特性を十分に評価できなかったが、ICG5 は低分子に対する特異性を有しつつ、且つ包接能力に優れた素材である可能性があるため、今後の研究で明らかにする予定である。

(2) 環状糖類による芳香族化合物の包接挙動の解明

平成 17-18 年度の科学研究費補助金若手研究 (B) の研究に引き続き、本研究において芳香族化合物に対する CNN の包接特性を詳細に検討した。

まず、CNN の包接挙動に及ぼす温度、時間の影響を検討した。その結果、室温と 5 条件下では差が認められず、また包接時間の延長 (20 時間) によっても包接率の増加は認められなかった。次に、包接溶媒 (エタノール) 濃度の影響を検討した結果、芳香族化合物ではその影響が顕著に現れ、30% 以上のエタノール存在下では包接が極めて困難であることが示された。

続いて、CNN に対する芳香族香気成分の結合定数の算出を試みた。本実験では、CD とゲスト分子との結合性の評価に用いられる Benesi-Hildebrand plot (BH plot) による結合定数の算出を試みた。ゲスト分子と CD が 1:1 の包接化合物を形成する場合、下記の式が成り立つことが報告されており、BH plot では CD の初濃度の逆数に対して蛍光強度の変化量 ($I-I_0$) の逆数をプロットすることにより近似直線が得られ、得られた直線の y 切片を傾きで割ることによって CD に対する各化合物の結合定数 (K) を簡便に見積もることが出来る。

$$1/(I-I_0) = 1/(I'-I_0) + 1/K(I'-I_0)[CNN]_0$$

その結果、シナムアルデヒド、オイゲノール、ラズベリーケトンの結合定数は以下のように算出された。

表 1 CNN に対する芳香族化合物の結合定数

Cinnamaldehyde				
Guest : CNN	y-intercept	slope	r	K (M ⁻¹)
1 : 1	1.5×10^{-2}	3.7×10^{-4}	0.991	4.1×10^1
Eugenol				
Guest : CNN	y-intercept	slope	r	K (M ⁻¹)
1 : 1	2.3×10^{-2}	3.6×10^{-6}	0.997	6.3×10^2
Raspberry ketone				
Guest : CNN	y-intercept	slope	r	K (M ⁻¹)
1 : 1	4.9×10^{-2}	1.3×10^{-4}	0.996	3.8×10^2
1 : 2	1.9×10^{-2}	5.2×10^{-4}	0.999	3.7×10^1

表から明らかなようにラズベリーケトンでは、1:1 包接体の K 値が 1:2 の包接体のものよりも 1 オーダー高い結果となった。1:1 包接体では、疎水性の高い butanone 鎖が四糖に包接されるために結合定数が大きくなるものと考えられた。また、各化合物の 1:1 包接体の K 値を比較した場合、K 値はシナムアルデヒド < ラズベリーケトン < オイゲノールの順となったことから、四糖による包接ではシクロデキストリンによる包接の場合と同様にゲスト分子の疎水性が大きく影響を及ぼすものと推察された。そこで、各化合物の疎水性の指標となる log P 値 (1-octanol/H₂O 分配係数) を Viswanadhan らの方 (J.Chem. Inf. Comput. Sci., 1989, 29, 163-172

)に基づく化学計算ソフト(Marvin software, Chem Axon Ltd.)を用いて求め、環状四糖による包接に及ぼすゲスト分子の疎水性の影響を検討した。その結果、log P の増加に伴いK値が増加する傾向が認められ、両者の間に良好な正の相関($r=0.998$)が認められた。この結果から、本実験で用いた化合物に関しては、log P すなわち化合物の疎水性を考慮することにより環状四糖に対する包接性を評価可能であることが明示された。

(3) まとめ

以上本研究では、環状糖類の包接特性の理論化に必須な関連因子の影響を明らかにした。すなわち、新規環状四糖であるCNNの場合、芳香族香気成分の場合には疎水的相互作用力による解析が可能なことを示すとともに、低分子の直鎖状化合物に対しては分子サイズを考慮した評価が必要なことを示した。さらに、溶媒極性が重要な包接関連因子であることを明示した。また、新規環状五糖であるICG5が今後期待される有効な包接剤であることを示した。以上、本成果は香気成分の包接のみならず、食品中の有害物質の選択的抽出・除去技術の開発、あるいは環状糖を利用するクロマトグラフィー技術の開発に対しても有用な知見を与えられ、環状糖類の利用技術に新たな展開をもたらすと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

著者;H. Ishikawa, A. Kuwano, K. Matsumoto,

題名;Complexation of Some Aromatic

Compounds with Cyclic

Nigerosyl-(1-6)-Nigerose 掲載誌; *J. Fac.*

Agr., Kyushu Univ. 査読無, 巻号;**54(1)**,

印刷中, 発表年; 2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 洋哉 (HIROYA ISHIKAWA)

九州大学大学院・農学研究院・助教

研究者番号: 00325490

(2)研究分担者

なし