

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：27103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780129

研究課題名（和文）環状糖包接香気成分の機能発現挙動とそのメカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Clarification of the biological activity profiles inclusion complex of aroma compounds with cyclic dextrins.

研究代表者

石川 洋哉 (ISHIKAWA HIROYA)

福岡女子大学・人間環境学部・准教授

研究者番号：00325490

研究成果の概要（和文）：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することを目的として、環状糖類を用いた包接安定化を試み、その包接状態での機能解析を試みた。その結果、各種シクロデキストリン(CD)類に対するオイゲノール、バニリン、チモール等化合物の包接挙動を示すと同時に、包接状態での抗酸化活性（活性酸素吸収能）を明らかにした。特に、 $\gamma$ -CD包接では $\gamma$ -CDが香気成分の抗酸化能を増強する可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：The complexation of some aromatic compounds, vanillin, eugenol, and tymol with cyclodextrins were investigated to maintain the aroma and/or their functional property during the storage of food products. We revealed the antioxidative activity (oxygen absorbance property) of inclusion complex of aroma compounds with CD. It suggested that the complexation with  $\gamma$ -CD would enhance the activity of aroma compounds.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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) シクロデキストリン、(4) 抗酸化活性  
(5) 分子包接

## 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。そのため、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 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -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。研究者は、機能性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いる(平成17-18年度若手研究B)。本研究では、市販品のシクロデキストリン(CD)とともに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、機能性香気成分の分子サイズに応じた分子選択的な包接化を試みてきた。本研究では、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Benesi-Hildebrand式を用いて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きた。しかしながら、得られたデータは、構造が類似した一部の香気成分に限定されたものであったことから、平成19-20年度若手研究B「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」において、その対象化合物を広げるとともに包接条件等の詳細な研究を行い包接特性の理論化を試みている。本研究では、構造の異なる種々のモデル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を試みることにより、これまで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CD包接に対して、分子構造に基づく包接挙動の理論予測法の提示を試みている。

これまでの研究により、香気成分の包接挙動に関しては様々な知見が得られているが、包接された香気成分のその後の機能特性に関する知見に関してはほとんど得られていないのが現状である。すなわち、包接状態での機能性分子は、遊離状態と異なる機能特性を示す可能性があるにもかかわらず、詳細な検討は行われていない。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、包接香気成分の機能性評価も含めた総合的な判断が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、環状糖類により包接された香気成分の機能特性とそのメカニズムを詳細に検討することにより、個々の機能特性に応じた最適包接化法を提示し、機能性香気成分の効率的デリバリーシステムの構築を目指した。特に、本研究では香気成分の有する抗酸化活性に着目し、各種環状糖類により包接化された状態での活性変化を詳細に検討した。環状糖類による機能性香気成分の包接挙動と上記抗酸化活性の発現挙動を総合的に評価・解析し、各香気成分に対して最適な環状糖の提示を試みた。本研究では、従来行われてきた環状糖類の包接挙動の解析だけでなく、香気成分-環状糖複合体の機能特性評価とそのメカニズムの検討を行うことにより、機能性香気成分に対する最適包接法を多面的に検討することを特徴とし、得られた成果は本技術にブレークスルーを与えると予測される。

## 3. 研究の方法

### (1) 試薬

$\alpha$ -CD および  $\gamma$ -CD はナカライテスク(株)より、メチル- $\beta$ -CD (met- $\beta$ -CD)は純正化学(株)より、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD)は和光純薬(株)より購入した。抗酸化物質であるトロロックス(標準物質)はシグマアルドリッチ社より、各種香気成分は和光純薬より購入した。蛍光試薬であるFluorescein disodium salt (FL)、2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)はシグマアルドリッチ社より購入し使用した。

### (2) 方法

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、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。

抗酸化能測定は、Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC: 活性酸素吸収能)法により行った。ORAC法は、2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)から発生するペルオキシラジカル(2-amidinopropane-2-peroxy radical)存在下で、蛍光プローブが分解され、蛍光強度が減弱する過程を経時的に測定する方法である。実験は、蛍光プローブFL溶液1.8 mL

および試験溶液 300  $\mu\text{L}$  を混和し、37°Cで 15 分間、遮光条件下でプレインキュベートした。終了後、AAPH 溶液を 900  $\mu\text{L}$  添加し、37°Cでインキュベートしながら 40 分間蛍光強度を測定した(励起波長: 485 nm、蛍光波長: 520 nm)。蛍光強度の測定には日本分光(株)Jasco FW-6500 を用いた。得られた蛍光強度をもとに、各試料溶液の曲線下面積(AUC)を求めた。次に、試験溶液の蛍光強度の AUC と、ブランクの AUC との差(net AUC)を算出した。トロロックスの netAUC<sub>trolox</sub> を X 軸に、Y 軸にトロロックス濃度を取り一次回帰式( $Y = aX + b$ )を求めた(6.25-50  $\mu\text{mol/L}$ )。netAUC 試料溶液とトロロックスの一次回帰線を用い、相対 ORAC 値( $\mu\text{mol-TE}/\mu\text{mol-sample}$ )を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) トロロックスの ORAC 値に及ぼす CD 添加の影響

まず、CD 単体での抗酸化活性を確認した結果、本実験での濃度域では、いずれの CD も抗酸化活性を示さないことが確認された(データ省略)。続いて、ORAC 法の標準物質として用いるトロロックスに対す CD 添加の影響を検討した。

表1 各種CD添加によるトロロックスの一次回帰式への影響

	一次回帰式	相関係数 r
糖添加なし	$Y=0.4499X-2.6182$	0.9958
$\alpha$ -CD	$Y=0.5049X-2.6498$	0.9966
met- $\beta$ -CD	$Y=0.4493X-2.1409$	0.9973
HP- $\beta$ -CD	$Y=0.5286X-1.5886$	0.9981
$\gamma$ -CD	$Y=0.4712X-2.6054$	0.9949

トロロックス(測定濃度 25  $\mu\text{mol/L}$ )の netAUC を CD 無添加時(糖添加なし)と添加時(終濃度 0.7%)で比較した結果、met- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD では糖添加なしの netAUC と同程度の netAUC が得られた。 $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD では、わずかに低い傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。さらに、トロロックス濃度 6.25 - 50 $\mu\text{M}$  濃度で検量線を作成し、各 CD 添加条件下で一次回帰直線を求めた結果、いずれも良好な一次回帰式が得られた(表 1)。以上の結果、今回の CD 添加 0.7% (終濃度)では、トロロックスの ORAC 値すなわち活性酸素吸収能にほとんど影響を与えないことが確認された。この結果から、トロロックスが疎水性抗酸化物の ORAC 測定時にも基準物質として機能し得ることが示唆された。

##### (2) オイゲノール及びバニリンの ORAC 値に

##### 及ぼす各種 CD 包接の影響

オイゲノールとバニリン(図 1)を対象として、両者の ORAC 測定に及ぼす各種 CD による包接化の影響を検討した。

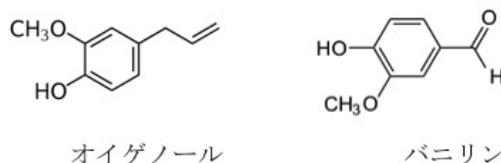


図 1 オイゲノールおよびバニリンの構造式

オイゲノールはクローブなどの香辛料に含まれる精油成分であり、疎水性の性質を持つ。糖無添加条件ではリン酸緩衝液に溶解することができず、測定不可能であった。CD 添加により、両化合物の溶解性が向上し、ORAC 測定が可能となった(図 2)。各種 CD 添加時のオイゲノール(測定濃度 10  $\mu\text{mol/L}$ )の ORAC 値を比較した結果、空洞内径の最も小さい $\alpha$ -CD を添加した条件下での測定値が、他よりわずかに高い傾向を示した。一方、バニリンでは(測定濃度 10  $\mu\text{mol/L}$ )、その疎水性が低いため、糖無添加時でも測定は可能であったが、CD を添加により ORAC 値の増加傾向が確認された。

オイゲノールやバニリンなどの低分子化合物では、 $\alpha$ -及び $\gamma$ -CD の場合と比較して ORAC 値がわずかに低値を示す傾向が認められた。その原因として、CD の空洞サイズの影響が考えられた。 $\beta$ -CD の空洞内径は 6.0 $\times$ 6.4 $\text{\AA}$ であり、ベンゼン環が 1 つ入る程度の大きさである。したがって、 $\beta$ -CD 包接により化合物の活性部位がブロックされ、ORAC 値が低下するものと推察された。より空洞内径が大きい $\gamma$ -CD 添加時も、オイゲノールで同様の傾向が確認されたが、バニリンでは確認されなかったことから、バニリンとオイゲノールでは包接構造が若干異なる可能性があることが考えられた。

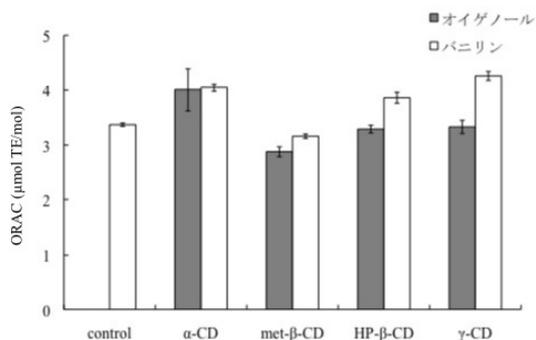


図 2 オイゲノールおよびバニリンの ORAC 値に及ぼす各種 CD 添加の影響

オイゲノール, バニリン; 10  $\mu\text{mol/L}$ , CD 濃度; 0.7%(終濃度)

##### (3) オイゲノール及びチモールの CD 包接挙

動（結合定数の算出）と ORAC 値への影響

抗酸化測定条件下での各種 CD による揮発性化合物の包接状態を蛍光スペクトル測定により確認した。対象化合物は、オイゲノール及びチモールを選択した。なお、蛍光スペクトル測定は、励起波長 264 nm, 蛍光波長 550-700 nm で行った。図 3 は、チモールの蛍光スペクトルに及ぼす  $\gamma$ -CD 包接化の影響を示している。図に、示したように CD 添加濃度の増加に伴い蛍光スペクトルの増加が確認された。 $\alpha$ -CD および  $\beta$ -CD においても同様の増加傾向が認められている。オイゲノールにおいても同様であった。この蛍光スペクトルの増加は CD 包接に伴う化合物の周囲の環境変化に起因するものである。

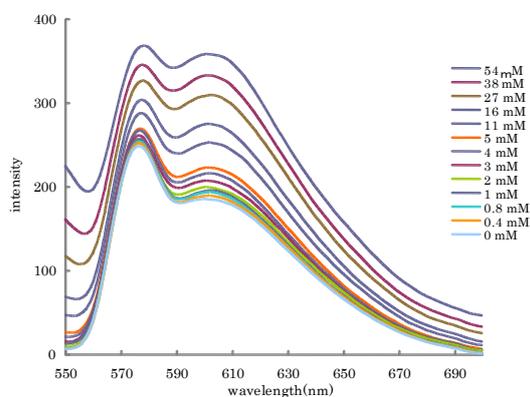


図 3 チモールの蛍光スペクトルに及ぼす  $\gamma$ -CD 包接の影響

図の蛍光スペクトルの 602 nm における蛍光強度の増加挙動を示したのが図 4 である。

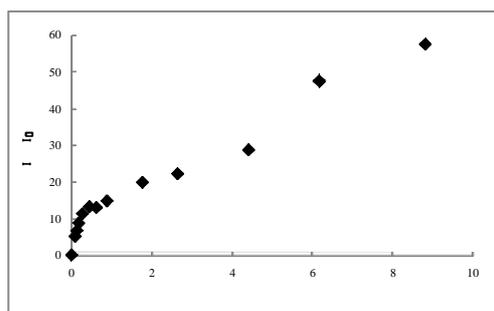


図 4 チモールの 602nm における蛍光強度に及ぼす  $\gamma$ -CD 包接の影響

続いて、上記蛍光強度の増加挙動を基に、CD に対する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。

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

チモールの  $\gamma$ -CD 包接時の BH plot を図 5 に示す。

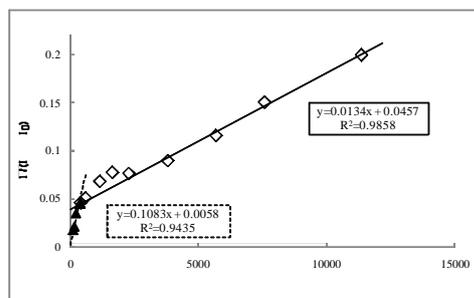


図 5 チモールの  $\gamma$ -CD 包接時の BH plot

同様のプロットをオイゲノールについても行い、各種 CD に対する結合定数を算出した。結果を表 2 にまとめて示した。

表 2 オイゲノール及びチモールの  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CD に対する結合定数のまとめ。

#### オイゲノール

Guest: CD	CD	y-intercept	slope	r	K (M <sup>-1</sup> )
1:1	$\alpha$ -CD	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$	0.95	$3.46 \cdot 10^3$
	$\beta$ -CD	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$0.9 \cdot 10^{-3}$	0.97	$11.67 \cdot 10^3$
	$\gamma$ -CD	$1.7 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	0.97	$1.63 \cdot 10^3$
1:2	$\alpha$ -CD	$3.0 \cdot 10^{-3}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	0.99	$0.12 \cdot 10^3$
	$\beta$ -CD	$4.2 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-3}$	0.92	$0.66 \cdot 10^3$
	$\gamma$ -CD	$7.6 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	0.95	$0.05 \cdot 10^3$

#### チモール

Guest: CD	CD	y intercept	slope	r	K (M <sup>-1</sup> )
1:1	$\alpha$ -CD	$3.3 \cdot 10^{-2}$	$3.6 \cdot 10^{-2}$	0.99	$0.93 \cdot 10^3$
	$\beta$ -CD	$5.8 \cdot 10^{-2}$	$0.8 \cdot 10^{-3}$	0.92	$73.00 \cdot 10^3$
	$\gamma$ -CD	$4.6 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	0.99	$3.41 \cdot 10^3$
1:2	$\alpha$ -CD	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	0.99	$0.11 \cdot 10^3$
	$\beta$ -CD	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-3}$	0.98	$0.28 \cdot 10^3$
	$\gamma$ -CD	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	0.97	$0.05 \cdot 10^3$

表で明らかのように、いずれの化合物においても  $\beta$ -CD と包接体を形成した場合に最も高い結合定数 (K 値) が得られた。(1:1 結合物の場合; オイゲノール:  $11.67 \times 10^3$ 、チモール:  $73.00 \times 10^3$  M<sup>-1</sup>)。いずれの場合にも、分子サイズの  $\beta$ -CD の空洞と最もフィットしやすいと考えられた。また、いずれの化合物においても、結合性は弱いものの、高濃度領域において 1:2 包接物が形成されることも明

らかになった。

続いて、各化合物の CD 包接状態での抗酸化能を ORAC 法により確認した。図 6 にチモールの ORAC 測定に及ぼす  $\gamma$ -CD 包接の影響を示した。図には、蛍光プローブ FL の蛍光強度の経時変化 (蛍光退色挙動) を示している。

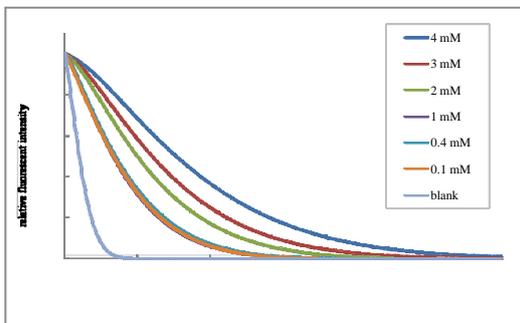


図 6 チモールの ORAC 測定に及ぼす  $\gamma$ -CD 包接の影響

図より明らかなように、 $\gamma$ -CD 濃度の増加に伴い蛍光強度の減少が緩やかになること、すなわち  $\gamma$ -CD 濃度の増加に伴い抗酸化能が見かけ上増大することが判明した。なお、この挙動は  $\alpha$ -及び  $\beta$ -CD では認められなかった。なお、この  $\gamma$ -CD による変化はオイゲノールでも認められており、 $\gamma$ -CD が化合物の抗酸化能に影響を与える可能性が示唆された。図 7 は、チモールの ORAC 値に及ぼす CD 包接の影響を示している。

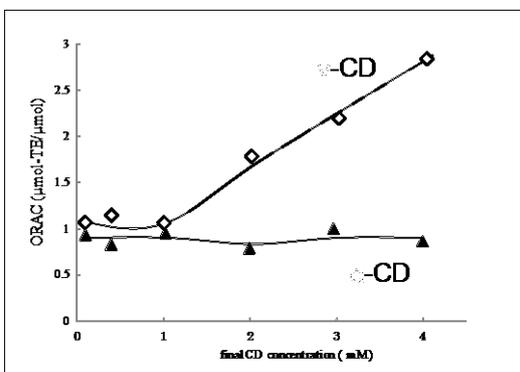


図 7 チモールの ORAC 値に及ぼす CD 包接の影響  $\alpha$ -CD と  $\gamma$ -CD の比較

チモールの  $\gamma$ -CD 包接では、CD 終濃度 1 mM を超えた条件下で顕著な ORAC 値の増加 (抗酸化能の増大) が認められている。この濃度条件下では、チモールと  $\gamma$ -CD が 1:2 包接物を形成している可能性が高く、この複合体形成による活性部位領域の環境が変わることが抗酸化能の変化に大きく関与している可能性が示唆された。

(4) まとめ

以上本研究では、抗酸化能を有する揮発性化合物に対する環状糖類包接の影響を示した。すなわち、本実験では化合物の CD に対する結合性評価 (結合定数の算出) 結果と ORAC 測定による機能評価を併せて行うことにより、CD 包接体の機能発現挙動を詳細に明らかにした。その中で、 $\gamma$ -CD 包接が化合物の抗酸化活性を増大させる可能性があることが新たに判明した。この成果は、今後の CD 包接技術の活用に新たな展開をもたらす可能性があると考えられた。さらに、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ると考えられ、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; 山元涼子・古田祥子・西村奈保子・中村 強・石川洋哉 題名; 活性酸素吸収能測定に及ぼすシクロデキストリンの影響 掲載誌; 福岡女子大学人間環境学部紀要 査読無, 巻号;42, 印刷中, 発表年; 2011

[学会発表] (計 1 件)

発表者; 山元涼子、西村奈保子、于 銀萍、中村 強、石川洋哉 題名; 抗酸化物の Oxygen Radical Absorbance Capacity に及ぼすシクロデキストリン包接の影響 学会名; 日本農芸化学会 2011 年度大会 発表年月日; 2011 年 3 月 27 日 場所; 京都女子大学 (京都)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 洋哉 (ISHIKAWA HIROYA)  
福岡女子大学・人間環境学部・准教授  
研究者番号: 00325490

(2) 研究分担者

なし