環状ニゲロシルニゲロースの結晶特性と α -トコフェロール、コレカルシフェロールおよびEPAの粉末化への応用

奥 和之[§], 工藤尚樹, 黒瀬真弓, 渋谷 孝, 茶園博人, 福田恵温

株式会社林原生物化学研究所 研究センター糖質研究部門

The Crystal Properties of Cyclic Nigerosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-nigerose (CNN) and Powdering of α -Tocopherol, Cholecalciferol and EPA Using CNN

Kazuyuki Oku[§], Naoki Kudou, Mayumi Kurose, Takashi Shibuya,
Hiroto Chaen and Shigeharu Fukuda

Glycoscience Institute, Research Center, Hayashibara Biochemical
Laboratories, Inc., 675-1 Fujisaki, Okayama 702-8002

Cyclic nigerosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-nigerose (CNN) has a unique structure consisting of four glucose residues connected by alternate α -(1 $\rightarrow$ 3)- and α -(1 $\rightarrow$ 6)-linkages. We investigated the crystal properties of CNN and the stability of powdered functional oils using CNN. As a result of thermal analysis, we found that CNN takes 3 crystal forms, 5H₂O, 1H₂O and anhydrous crystals. The alcohol retention capacity of variously cyclic saccharides, such as α -, β - and γ -cyclodextrin (CD), was also examined. Ethanol and propanol retention capacities were observed in the order β -CD > CNN > β -CD > γ -CD. We then examined the stability of powdered fat-soluble vitamins, vitamin D₃, vitamin E and eicosapentaenoic acid, by using anhydrous CNN; CNN-functional oil powders showed the highest residual values. These results indicate that CNN is useful for powdering easily oxidized fat-soluble substances. (Received Feb. 2, 2007; Accepted Mar. 24, 2007)

Keywords : cyclic nigerosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-nigerose, crystal properties, fat-soluble vitamins, EPA, powdering

キーワード : 環状ニゲロシルニゲロース, 結晶特性, 脂溶性ビタミン, EPA, 粉末化

環状ニゲロシルニゲロース (以下 CNN; *cyclo* { $\rightarrow$ 6)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$)) は, グルコース 4 分子が α -1,3 結合と α -1,6 結合を交互に繰り返して環状化した糖質であり, その存在は, 特殊なデキストランであるアルタナンに, 加水分解酵素を作用させることにより生成することが報告されている¹⁾²⁾. 我々は, *Bacillus globisporus* が産生する 2 種の酵素 (1,6- α -グルコシルトランスフェラーゼ, 1,3- α -イソマルトシルトランスフェラーゼ) を用いて, 澱粉から 62% の高生成率で CNN を製造することを明らかにし, その製造法を確立した^{3)~5)}. CNN は非還元性, 難消化性, 非う蝕性, 非メイラード反応性であり, pH 3 から 10 の広い範囲で安定な糖質である⁶⁾⁷⁾. また CNN は, シクロデキストリン (CD) と比べ, 分子内径が小さく浅い窪み構造をとることから⁸⁾, 従来 CD では包接困難であった低級アルコール類 (メタ

ノール, エタノールなど) の保持または包接作用を示すことが期待される.

一方, 脂溶性ビタミンのビタミン D₃ (V.D) とビタミン E (V.E), 機能性油脂であるイコサペンタエン酸 (EPA) は, 生体内でのカルシウムやリンの吸収促進, 血行促進, 血液粘度の低下等の様々な生理作用を有し, 健康食品や各種健康食品用素材として注目されている. しかしながら, 脂溶性ビタミン類や EPA は, 容易に酸化されやすく, 保存安定性が悪い. そこで, 脂溶性油脂の食品素材としての操作性や保存安定性の向上を目的に, 様々な基材を用いての粉末化・錠剤化が検討されている^{9)~12)}.

本研究では, CNN を粉末化用基材として評価する目的で, まず種々の乾燥条件にて CNN 乾燥粉末を調製し, その物理的性質を調べた. 次に, CNN と各種アルコール類との凍結乾燥粉末を調製し, その作用性を各種 CD と比較した. さらに CNN 乾燥粉末を粉末基材として, 脂溶性油脂の粉末試料を調製し, その保存安定性を評価した.

〒702-8006 岡山県岡山市藤崎 675-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), okukaz@hayashibara.co.jp

実験方法

1. 実験材料

CNN は既報に従い調製した 5 水和物結晶 CNN を用いた^{1)~3)}。また粉末化基材として、 α 、 β および γ 型の各種 CD (いずれも林原生物化学研究所製)、2 水和物結晶トレハロース (商品名：トレハ、林原商事販売)、無水結晶マルトース (商品名：ファイントース、林原商事販売)、分岐 CD (商品名：イソエリート P、CD 含量 80% 以上、マルトシル CD 含量 50% 以上の混合品、塩水港精糖製)、セルロース微粉 (商品名：フナセル SF、フナコシ製)、および可溶性デンプン (片山化学製) を使用した。アルコール類は、炭素数 1-5 の直鎖アルコール (メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノールおよび *n*-ペンタノール (すべて試薬特級、和光純薬工業製) を使用した。脂溶性ビタミン類は、コレカルシフェロール (V.D, 試薬特級、和光純薬工業製)、 α -トコフェロール (V.E, 試薬一級、和光純薬工業製) を、多価不飽和脂肪酸としてイコサペンタエン酸 (EPA, 95% 以上含有、東京化成製) を用いた。予め 99.5% エタノール (試薬特級、和光純薬工業製) にて、V.D は 3%、V.E は 10%、EPA は 3% (いずれも w/w) 濃度になるように調整した。

2. CNN 5 水和物結晶の熱分析

CNN 5 水和物結晶の熱分析 (TG/DTA 分析) を行った。試料 5 mg を Al パンに採取し、熱分析用試料とした。TG/DTA は、装置 TG/DTA220 (SHI ナノテクノロジーズ(株)製) を使用し、30℃ から 350℃ の昇温条件 (10℃/min)、窒素ガス気流下 (30 ml/min) で熱重量変化を調べた。

3. CNN 乾燥粉末の調製

CNN 5 水和物結晶を 130℃、3 時間の常圧乾燥または 80℃、6 時間の真空乾燥したもの、CNN 20% (W/V) 水溶液を凍結真空乾燥したものを調製し、それぞれの結晶形を粉末 X 線回折 (RAD-IIB, Rigaku 製、X 線ビーム; Cu-K α , 電圧; 35 kV, 電流; 25 mA) により調べた。

4. CNN 粉末の吸湿性と安定性

CNN 5 水和物結晶および 3. CNN 乾燥粉末の調製の項で調製した各 CNN 粉末 0.5 g をアルミ秤量缶に採取し、各種飽和塩類溶液を用いて調湿した相対湿度 (RH) 33.0 から 97.3% のデシケーター中に 25℃ で 1 週間静置し、重量変化を経時的に測定した。また、1 週間静置後の各試料の粉末 X 線回折を行い、RH と結晶形の変化について調べた。

5. CNN-アルコール混合粉末の調製

CNN-アルコール混合粉末の調製は、Hashimoto らの方法⁹⁾ に準じて行った。すなわち CNN の 20% (w/v) 水溶液に、糖質の 3 倍モル量のアルコールを添加し、ホモジナイザー (Ika 製) を用いて、2 分間ホモジナイズした。これを、0.45 μ m のメンブランフィルターを用いて濾過後、この濾液を 16 時間凍結真空乾燥し、CNN-アルコール混合粉末

を調製した。また、各種 CD を対照として同様に操作を行い、各種 CD-アルコール混合粉末を調製した。

6. 糖質-アルコール混合粉末中のアルコール、糖質量測定

各種糖質-アルコール混合粉末中のアルコール含量、糖質含量および水分量を測定し、保持されているアルコールと糖質基材とのモル比を求めた。アルコール量は、粉末 0.5 g を 10 ml の脱イオン水に溶解したものを直接ガスクロマトグラフィー (GLC) に供して求めた。CNN 含量は、常法に従い¹³⁾¹⁴⁾ トリメチルシリル (TMS) 誘導体化したものを GLC 分析に供した。各種 CD 含量は、混合粉末からアルコール含量および水分量を差し引いて算出した。また粉末中の水分量はカールフィッシャー法により求めた。

アルコール含量および CNN 含量測定のための GLC 分析条件を以下に示した。アルコール分析: GLC 装置; GC-14A (水素炎イオン化検出器、島津製作所)、カラム; TC-5 キャピラリーカラム (0.53 mmID $\times$ 15 m, df=1.5 mm, GL サイエンス)、カラム温度; 40℃ $\rightarrow$ 300℃ (昇温 7.5℃/min)、キャリアガス; ヘリウム (流速 1 ml/min)、試料注入量 2 μ l (スプリット, 1/30)。CNN 含量: GLC 装置; GC-14A (水素炎イオン化検出器、島津製作所)、カラム; 2% OV-17 Chromosorb W-AW-DMCS (3.0 mmID $\times$ 2 m, GL サイエンス)、カラム温度; 160℃ $\rightarrow$ 320℃ (昇温 7.5℃/min)、キャリアガス; 窒素 (流速 35 ml/min)、試料注入量; 3 μ l (TMS 誘導体化物)。

7. 機能性油脂の粉末化とその安定性試験

機能性油脂の粉末化試料の調製概略を以下に示した。機能性油脂のエタノール溶液を真空乾燥により無水化した各種糖質に分散した。その後、エタノールを減圧乾燥により除去し、各種糖質を基材とした機能性油脂粉末を調製した。

まず、CNN、トレハロース、マルトース、分岐 CD およびセルロースを 80℃ で 6 時間真空乾燥し、水分量を 0.5% 以下に調整した。この乾燥糖質 4 g に機能性油脂を溶解したエタノール溶液を 0.75 g 添加・混合して粉末基材中に均一に分散した。これを五酸化リン入りデシケーター中で 5 時間減圧乾燥してエタノールを除去し、乳鉢を用いて粗粉砕したものを機能性油脂粉末試料とした。この試料を用いて、以下の条件で保存試験を行った。粉末試料 1 g を 20 ml 容バイアル瓶に採取し、ブチルゴム栓で密栓した。V.D および V.E 試料は 60℃、EPA 試料は 40℃ のインキュベーター中にそれぞれ 1 週間静置した。試料をバイアル瓶ごと経時的にサンプリングし、各試料中の機能性油脂含量を分析した。

8. 機能性油脂の抽出および分析

V.D は、保存試料を 70% (v/v) エタノール溶液で懸濁後、50 ml に定容した。これを 3000 rpm、10 分間の遠心分離後、上清を ϕ 0.45 μ m のフィルターで濾過したものを V.D 抽出液とした。V.D の測定は、分光光度計 (UV-2400PC 島

津製作所製)を用いて吸光度(Abs. 265 nm)を測定し、既知濃度のV.D標準液を用いた検量線よりV.D含量を求めた。V.EおよびEPAは、保存試料に脱イオン水6 mlを添加して懸濁したものに、ヘキサン10 mlを添加して転倒混和し、V.EおよびEPAを抽出した。抽出液中のV.E量は直接GLC法により、EPA量はメチルエステル化後GLC法により測定した¹⁵⁾。EPAは、抽出液3 mlをねじ口試験管に採取し、五酸化リン入りデシケーター中で減圧して乾固した。これに内部標準物質として*n*-トリコサン・エチルエーテル溶液(1 mg/ml)1 mlを添加し、再度乾固した。三フッ化ホウ素メタノール溶液(14% (w/v) 三フッ化ホウ素含有, GLサイエンス製)0.5 mlを加え、80℃5分間加熱してEPAをメチルエステル化後、脱イオン水1 mlを加え未反応の三フッ化ホウ素を分解した後、*n*-ヘキサン1 mlを加えてEPA-メチルエステル化物を抽出した。V.EおよびEPA-メチルエステル化物抽出液のGLC分析条件を以下に示す。V.E: GLC装置; GC-14A (水素炎イオン化検出器, 島津製作所製), カラム; TC-5 キャピラリーカラム(0.53 mmID×15 m, df=0.25 μm, GLサイエンス社製), カラム温度; 200℃→320℃(昇温7.5℃/min), キャリアガス; ヘリウム(流速1 ml/min), 試料注入量; 2 μl (スプリット, 1/30)。EPA: GLC装置; GC-14B (水素炎イオン化検出器, 島津製作所製), カラム; TC-FFAP キャピラリーカラム(0.53 mmID×30 m, df=0.25 μm, GLサイエンス社製), カラム温度; 180℃→240℃(昇温7.5℃/min), キャリアガス; ヘリウム(流速1 ml/min), 試料注入量; 4 μl (スプリット, 1/30)。

実験結果および考察

1. CNNの熱分析

CNN5水和物結晶のTG/DTA曲線をFig. 1に示す。熱重量変化から、100℃付近に9.5% (CNN 5水和物結晶1分子に対し水4分子)、210℃付近に3.2% (水1分子)の重量減少が検出された。また、300℃以上で熱分解に伴う急激な重量減少が見られ、それぞれにDTA分析による吸熱ピークが観測された。この結果から、CNNには5水和物結晶のほかに、1水和物および無水物の2つの形態を取ることが示唆された。

2. CNN乾燥粉末の調製

CNN 5水和物結晶を130℃で3時間常圧乾燥した粉末、80℃で6時間真空乾燥した粉末をそれぞれ調製し、その水分量と粉末X線回折による結晶形を調べた。その結果、130℃で3時間常圧乾燥した粉末の水分は2.8%となり、CNN 1分子に対し水1分子が存在した。一方、80℃で6時間真空乾燥した粉末の水分は0.2%となり、CNN分子と水分子との比は1:0.07であった。

これらのCNN乾燥物のX線回折パターンを調べたところ、いずれもCNN 5水和物結晶のものとは異なる回折

Fig. 1 TG/DTA curve of CNN · 5H₂O crystal

Fig. 2 X-ray diffraction patterns of dried CNN powders

パターンを示した (Fig. 2)。130℃で3時間常圧乾燥した粉末はCNN 1水和物結晶、80℃で6時間真空乾燥した粉末はCNN 無水結晶と考えられる。またCNN水溶液を凍結真空乾燥した粉末を調製したところ、この粉末は結晶回折パターンを示さず、アモルファスであると示唆された (水分9.7%)。

Bradbrookらは、X線によるCNNの結晶構造解析を行い、CNNはその分子内に1分子の水を保持し、周囲に4分子の水が弱く水素結合していることを報告している⁸⁾。またFurihataらは、水溶液中でのCNN分子と水分子との相互作用について、DMSO溶媒下での2次元NMR (ROESY) 解析を行い、CNN分子内部の水酸基が水1分子との相互作用 (水素結合) に関与していることを確認した¹⁶⁾¹⁷⁾。調製したCNN 無水結晶およびCNN 1水和物結晶のTG/DTA分析をしたところ、5水和物結晶で観察された100℃付近での重量減少は認められず、無水結晶では分解のみが、1水和物結晶では分解ピークと分解点前の210℃付近に水1分子分の重量減少が検出された (データ未掲載)。以上の結果から、210℃付近に観察された水1分子分の重量減少は、CNN分子内部に保持された水の離脱によるものと示唆された。また、CNN 5水和物結晶や1水和物結晶では、300℃に分解点が観測されたが、無水物では271.5℃と約

Fig. 3 Hygroscopicity of dried CNN powders placed at Various RH conditions at 7days for 25°C.

A ; CNN · 5H₂O crystals, B ; CNN · H₂O crystals, C ; CNN anhydrous crystals, D ; amorphous CNN.

● ; RH 33.0%, ▲ ; RH 52.8%, ○ ; RH 60.0%, □ ; RH 75.2%, ■ ; RH 84.2%, △ ; RH 97.3%.

30°C 低温側にシフトした。すなわち、CNN 分子内部に保持される水分子は、CNN 構造の安定化に重要な役割を果たしていることが推察された。CNN 分子と水分子とのダイナミクスについて、分子動力学シミュレーションによる理論解析を行い、CNN の構造特性と水分子との相互作用について明らかにする必要がある。

3. CNN 粉末の吸湿性と安定性

次に、各 CNN 粉末の粉末化基材としての特性を調べるため、4 種の CNN 粉末を相対湿度 (RH) 33.0 から 97.3% の調湿デシケーター中に 25°C で 1 週間静置した際の、水分量の変化と粉末 X 線回折像を調べた。各 CNN 粉末の水分量変化を Fig. 3 に示した。CNN 5 水和物結晶は、RH 33.0 から 97.3% の範囲で水分量に変化がなく、安定な粉末であることがわかった。CNN 1 水和物結晶は、RH 60.0% 以下では水分量に変化がなかったが、RH 84.2% 以上の保存条件では水分値が 14% まで増加し、X 線回折の結果、5 水和物結晶に変化していることがわかった。一方、CNN 無水結晶は、全ての相対湿度において静置 1 日目で吸湿し、水分 9~10% (RH 33.0~60.0%) と水分 14% 前後 (RH 75.2~97.3%) の 2 グループに分かれた。それぞれの結晶形を粉末 X 線回折より調べたところ、前者は無水結晶形を、後者は 5 水和物結晶形を示した。CNN アモルファスでも、水分 9~14% (RH 33.0~60.0%)、および水分約 14% (RH 75.2~97.3%) に分かれ、結晶形は、前者はアモルファス、後者は 5 水和物結晶形をそれぞれ示した。以上の結果から、CNN 5 水和物結晶 CNN は水分を保持した安定な構造であるのに対し、1 水和物結晶、無水結晶およびアモル

ファス CNN は、RH 60.0% 以下で各々の構造を維持するが、RH 75.3% 以上の高湿度下では吸湿して 5 水和物結晶となることがわかった。また、CNN 1 水和物結晶、無水結晶およびアモルファス CNN は、含水試料の粉末化に利用できると考えられる。

4. CNN-アルコール粉末の調製とアルコール保持能

機能性油脂の粉末化には、混練法による CD や無水結晶マルトースを用いた例が報告されているが¹⁸⁾¹⁹⁾、これら糖質基材と油脂を均一に混合させることは困難である。その対処策として、油脂を有機溶媒に溶解して添加混合する方法が考えられ、粉末化基材と有機溶媒との作用性が重要である。

そこで、炭素数 1 から 5 の低級アルコールと CNN との凍結真空乾燥粉末を調製し、CNN のアルコールに対する保持能を各種 CD と比較した (Table 1)。CNN では、粉末中のアルコールと CNN のモル比は、C3 アルコールのプロパノールが最も高く、CNN 1 モルにプロパノール 0.53 モルが保持されていた。次いでエタノール (0.40 モル)、ブタノール (0.24 モル) となった。一方、CNN のメタノールやペンタノール保持量はわずかであった。プロパノールまたはエタノールの保持能は、 α -CD > CNN > β -CD > γ -CD となり、CNN は低級アルコールに対し比較的高い保持能を有することがわかった。

5. 無水 CNN による機能性油脂の粉末化とその保存安定性

CNN は低級アルコール類を強く保持することから、これを粉末化基材として用いることにより、安定な機能性油

Table 1 Alcohol content of the cyclic sugar-alcohol preparations

Alcohol	CNN		α -CD		β -CD		γ -CD	
	Content (mg/g)	Molar ratio*	Content (mg/g)	Molar ratio	Content (mg/g)	Molar ratio	Content (mg/g)	Molar ratio
Methanol	5.4	0.11	16.7	0.52	2.3	0.07	0.0	0.00
Ethanol	26.2	0.40	36.7	0.85	13.7	0.36	6.8	0.20
<i>n</i> -Propanol	44.3	0.53	66.8	1.22	22.2	0.49	10.9	0.27
<i>n</i> -Butanol	26.8	0.24	79.5	1.17	37.9	0.51	26.6	0.35
<i>n</i> -Pentanol	11.2	0.08	78.6	0.99	63.1	0.72	37.7	0.42

* Alcohol/Sugar.

Fig. 4 Effect of CNN on the stability of fat-soluble vitamins and fatty acid, as compared with the other saccharides

A ; Vitamin D, B ; Vitamin E, C ; Eicosapentaenoic acid.
 ● ; CNN, ■ ; trehalose, ▲ ; maltose, □ ; cellulose, ○ ; branched CD.

脂の粉末化が期待された。そこで、機能性油脂のエタノール溶液を乾燥した粉末化基材に均一に分散し、その後、エタノールを減圧乾燥により除去する方法を用いて、各種糖質基材による機能性油脂粉末を調製し、その保存安定性を評価した (Fig. 4)。

粉末化 V.D では、CNN を除く糖質を基材にした場合、試料調製直後において残存率が約 15~30% となり、顕著な低下がみられた。一方、CNN 系では、保存初期の顕著な残存率の低下はみられず、保存 7 日後の V.D 残存率も約 50% と高値を示した。粉末化 V.E の場合、保存 3 日後において、CNN 系およびトレハロース系で約 95% の残存率を示し、安定であることがわかった。

粉末 EPA の場合、CNN 以外の糖質系では、試料調製直後において残存率が顕著に低下したが、CNN 区では約 85%、保存 7 日後で 55.1% と高い残存率を示した。一方、分子内に油脂などを包接して安定化するとされる分岐 CD での作用は弱かった。CNN の分子モデリングを、分子力学法 (MM3) によるエネルギー最小化計算および *ab initio* 分子軌道計算 (B3LYP/6-31G** レベル) を用いて行ったところ、分子内径は約 2 Å となり、脂溶性ビタミンや EPA を直接包接しうる環状径ではない。一方、Oku らはトレハロースが不飽和脂肪酸の *cis*-型二重結合に CH·····O および OH····· π 型の水素結合して抗酸化作用を示していることを、NMR を用いた実験的解析および量子化学計算により理論解析から明らかにした²⁰⁾²¹⁾。CNN においても同様の作用が考えられる。CNN のラジカルに対する作用も含めた抗酸化作用について検討する予定である。

また、これらの結果から、CNN は酸化されやすい脂溶性物質を粉末化する糖質基材として有用であると考えられた。

要 約

本研究では、CNN を粉末化基材として評価する目的で、まず種々の乾燥条件にて CNN 粉末を調製し、その物理的性質を調べた。次に、CNN を基材に用いて、各種アルコール類の凍結乾燥粉末を調製し、そのアルコール保持能を各種 CD と比較した。さらに CNN 無水物を粉末基材として、脂溶性油脂の粉末試料を調製し、その保存安定性を評価した。

(1) CNN 5 水和物結晶の熱分析より、CNN には 5 水和物結晶のほかに、1 水和物結晶および無水結晶物の 2 つの形状を取ることが示唆された。凍結真空乾燥によりアモルファス CNN の調製が可能であった。

(2) 各種 CNN 乾燥物を調製し吸湿性を調べたところ、

CNN 5 水和物結晶は、非吸収性であることがわかった。一方、1 水和物結晶、無水結晶およびアモルファス CNN は、RH 75% 以上の高湿度下では吸湿して 5 水和物結晶となることがわかった。

(3) CNN を基材とした低級アルコールの凍結真空乾燥粉末を調製し、アルコール保持能を各種 CD と比較したところ、プロパノールまたはエタノールの保持能は、 α -CD > CNN > β -CD > γ -CD となり、CNN は比較的高い低級アルコール保持能を示した。

(4) CNN 無水結晶による機能性油脂の粉末を調製し、その保存安定性を調べたところ、CNN-油脂粉末で高い残存率を示した。CNN は酸化されやすい脂溶性物質を粉末化する糖質基材として有用であると考えられた。

文 献

- 1) Cote, G.L. and Biely, P., Enzymically produced cyclic α -1,3-linked and α -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 641-648 (1994).
- 2) Biely, P., Cote, G.L. and Burgess-Cassler, A., Purification and properties of alternanase, a novel endo- α -1,3- α -1,6-D-glucanase. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 633-639 (1994).
- 3) Aga, H., Higashiyama, T., Watanabe, H., Sonoda, T., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y., Production of cyclic tetrasaccharide from starch using a novel enzymes system from *Bacillus globisporus* C11. *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 336-342 (2002).
- 4) Aga, H., Nishimoto, T., Kuniyoshi, M., Maruta, K., Yamashita, H., Higashiyama, T., Nakada, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y., 6- α -Glucosyltransferase and 3- α -isomaltosyltransferase from *Bacillus globisporus* N75. *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 215-224 (2003).
- 5) Nishimoto, T., Aga, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y., Production of cyclic tetrasaccharide with 6- α -glucosyltransferase and α -isomaltosyltransferase. *J. Appl. Glycosi.*, **51**, 135-140 (2004).
- 6) 西本友之, 奥 和之, 向井和久, デンプンを基質とした 2 種類の環状四糖生成系の発見, 化学と生物, **44**, 539-550 (2006).
- 7) 奥 和之, 渡邊 光, 環状ニゲロシルニゲロースの酵素的生成とその機能, FFI ジャーナル, **211**, 854-862 (2006).
- 8) Bradbrook, G.M., Gessler, K., Cote, G.L., Momany, F., Biely, P., Bordet, P., Perez, S. and Imbert, A., X-ray structure determination and modeling of the cyclic tetrasaccharide. *Carbohydr. Res.*, **329**, 655-665 (2000).
- 9) Hashimoto, H., Preparation and application of cyclo-dextrins, Handbook of amylases and related enzymes, **233**, Pergamon Press (1988).
- 10) Minemoto, Y., Fang, X., Hakamata, K., Watanabe, Y., Adachi, S., Kometani, T. and Matsuno, R., Oxidation of linoleic acid encapsulated with soluble soybean polysaccharide by spray-drying. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1829-1834 (2002).
- 11) Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R., Suppressive effect of saturated acyl L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3984-3987 (2002).
- 12) 小暮靖夫, 分岐サイクロデキストリンについて, 食品の包装, **19**, 104-118 (1988).
- 13) 奥 和之, 澤谷郁夫, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司, 食品中のトレハロース含量, 食科工, **45**, 381-384 (1998).
- 14) Watanabe, H., Nakano, M., Oku, K., Aga, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y., Cyclic tetrasaccharide in sake lees. *J. Appl. Glycosci.*, **51**, 345-347 (2004).
- 15) 奥 和之, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司, 不飽和脂肪酸の加熱分解に及ぼすトレハロースの影響, 食科工, **46**, 749-753 (1999).
- 16) Furihata, K., Fujimoto, T., Tsutsui, A., Machinami, T. and Tashiro, M., Identification of bond water molecules in the cyclic tetrasaccharide, *cyclo* { $\rightarrow$ 6)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$)}. *Carbohydr. Res.*, **340**, 2060-2063 (2005).
- 17) Furihata, K., Fujimoto, T., Tsutsui, A., Machinami, T. and Tashiro, M., Practical aspects of ROESY experiments for identification of bound waters in the cyclic tetrasaccharide. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 1044-1048 (2005).
- 18) Yoshii, H., Furuta, T., Kawasaki, K., Hirano, H., Morita, Y., Shiina, C. and Nakayama, S., Quantitative analysis of α -cyclodextrin inclusion complexes with fatty acid methyl/ethyl esters by X-ray diffractometry. *Oyo Toshitsu Kagaku*, **42**, 243-249 (1995).
- 19) 齊藤典行, 無水結晶マルトースの特性とその利用, ジャパンフードサイエンス, **1**, 80-83 (1988).
- 20) Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y. and Sakurai, M., NMR and quantum chemical study on the OH $\cdots\pi$ and CH $\cdots$ O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12739-12748 (2003).
- 21) Oku, K., Kurose, M., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Okabe, A. and Sakurai, M., 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**, 3032-3040 (2005).

(平成 19 年 2 月 2 日受付, 平成 19 年 3 月 24 日受理)