

An Improved Method for the Quantitative Analysis of Commercial Isomaltooligosaccharide Products Using the Calibration Curve of Standard Reagents

(Received October 19, 2005; Accepted February 23, 2006)

Taisuke Nakanishi,^{1,*} Satoru Nomura¹ and Yasuhito Takeda²

¹Research and Development Center, Kashima Laboratory, Showa Sangyo Co., Ltd.
(6, Higashifukashiba, Kamisu 314-0194, Japan)

²Kagoshima University (1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-8580, Japan)

Abstract: An improved method for the quantitative analysis of isomaltooligosaccharide (IMO) products by HPLC with a polymer-based amino column was developed. The column was much higher in durability than a silica-based amino column used for the conventional method. The column durability enabled us to determine each IMO using the calibration curve of RI-detector response against a concentration of standard IMO and maltosaccharide reagents. The linear relationship between peak height of RI response and concentration of saccharide was found for glucose, maltose, kojibiose, nigerose, isomaltose, maltotriose, panose, isomatotriose, maltotetraose and isomaltotetraose. The linearity was obtained at concentrations of up to 17 mg/mL, and correlation coefficients were ≥ 0.999 . The slope of peak height *versus* concentration differed from saccharides, of which glucose was the highest while isomaltotetraose was the lowest. The relative slope of each saccharide to glucose, (slope for saccharide)/(slope for glucose), referred as a conversion factor, was calculated, and the concentration of each saccharide in commercial IMO products was determined from peak height on a HPLC chromatogram by the following equation: (concentration of saccharide A, mg/mL) = (concentration of standard glucose, mg/mL) \times (peak height of A)/(conversion factor of A)/(peak height of standard glucose). A commercial IMO product was analyzed and the result obtained was as follows: isomaltose (19.2 g), isomaltotriose (10.3 g), panose (4.9 g), nigerose (2.0 g), kojibiose (3.5 g) and isomaltotetraose (2.8 g), respectively. The total amount of the sugars identified by the improved method from IMO was higher than those determined by the conventional method, which may have resulted from the higher resolution of each saccharide. The method showed clearly the presence of nigerose and kojibiose together with four unknown components. A major unknown component was identified to be isomaltotriosylglucose by ¹H- and ¹³C-NMR analyses.

Key words: isomaltooligosaccharide, isomaltooligosaccharide product, quantitative analysis, isomaltotriosylglucose

標準試薬を用いた検量線による市販イソマルトオリゴ糖製品中のイソマルトオリゴ糖の定量改良法

中西泰介^{1,*}, 野村 圭¹, 竹田靖史²

¹昭和産業株式会社総合研究所鹿島研究センター (314-0194 神栖市東深芝 6)

²鹿児島大学 (890-8580 鹿児島市郡元 1-21-24)

イソマルトオリゴ糖 (IMO) は清酒¹⁾, 味噌²⁾, 醤油³⁾といった醗酵食品や蜂蜜⁴⁾に微量に存在し, 食品に旨味やくく味を付与する成分として知られている. IMO はデンプンを原料とし, 糸状菌 α -グルコシダーゼの触媒する転移反応を利用することにより工業的に生産されている^{5,6)}. この酵素はマルトースを基質としたとき, おもに α -1,6 結合への転移反応を触媒してイソマルトースやパノースなどのオリゴ糖を生成する. しかしながら, その転移反応の位置特異性は必ずしも厳密ではなく α -1,6 結合以外に α -1,2 結合や α -1,3 結合も生じる. 本報において, IMO とは糸状菌 α -グルコシダーゼの転移作用により生じるグルコースを構

成糖として α -1,6, α -1,2, α -1,3 結合を分子内に一つ以上有するオリゴ糖の総称を意味する⁷⁾.

IMO の工業生産は 1985 年に確立され, IMO を固形分中に 50% 以上含む製品の生産が始まった. その後, 1990 年には, イオン交換クロマト法でグルコースを除去し, 固形分中の IMO 含量 85% 以上の製品が生産されるようになった⁹⁾. これらの製品は, 水分 25% を含むシラップと粉末製品として市販されている. IMO は熱や酸に対する安定性などの観点から食品素材としての適性が高く, 醗酵食品, 飲料, 菓子などさまざまな加工食品に利用されている. また, 整腸作用⁷⁻⁹⁾, 免疫機能の増強^{10,11)}, 血清脂質の改善作用¹²⁾といった機能も見出されている.

現在, IMO 含量は 1992 年に発行された特定保健用食品試験検査マニュアル¹³⁾に従い分析されている. この分析マ

* Corresponding author (Tel. +81-299-92-1297, Fax. +81-299-93-0464, E-mail: taisuke_nakanishi@showa-sangyo.jp).

マニュアルでは、開発当時一般的なオリゴ糖分析用カラムであったシリカ系アミノカラムが用いられている。しかしながら、本カラムは耐久性が低く経時的に劣化するため、一般的な手法である検量線を用いた定量法は事実上困難である。また、排除型イオン交換カラムを併用して行われるものの、二から四糖のイソマルトオリゴ糖の分離・定量が不可能である。

本報告では、耐久性の優れたアミノカラム単独で、1) 各種イソマルトオリゴ糖やマルトオリゴ糖の分離が可能か、2) 検量線を用いた各糖類の定量が可能か、3) IMO 製品ロット間のわずかな差異が検出できるかどうかを調べて、現行法の改良法となり得るか検討した。その際、標準標品としての糖は実用性を考慮し、試薬として市販されているグルコース、マルトース、イソマルトース、ニゲロース、コージピオース、マルトトリオース、イソマルトトリオース、パノース、マルトテトラオース、イソマルトテトラオースを用いた。また、改良定量法がIMO含有飲料にも対応可能か確認した。さらに、IMO製品中の構造が明らかとなっていない数種のIMOのうち最も含有量が多い成分を単離しNMRにより構造を解析した。

材料と実験方法

1. 試料と試薬

分析に供する試料は固形分中85%以上のIMOを含むIMO-900[®](昭和産業製)を用いた。また、IMO含有飲料のエコライフ(ミル総本社)も用いた。イソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオース、イソマルトペンタオース(いずれも生化学工業)、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、およびマルトペンタオース(いずれも林原生化学研究所)を用いた。また、ニゲロース、コージピオースは和光純薬製生化学用を用いた。インペルターゼは*Candida utilis*由来の酵素を生化学工業より購入した。β-ガラクトシダーゼは*Aspergillus sp.*由来の酵素をフナコシより購入した。シリカ系アミノカラムはTskgel NH₂-60(東ソー)を、ポリマー系アミノカラムはAsahipak NH 2 P-50 4 E(昭和電工)を、ポリマーコート型アミノカラムはCAPCELL PAK NH₂ UG 80(資生堂)を使用した。

2. IMO含有飲料のHPLC試料の調製

IMO含有飲料5gを遠心分離(35,000×g, 30分)し不溶物を沈殿させ上清を回収した。得られた上清液をpH 5.0に調整し、リン酸緩衝液(終濃度20 mM, pH 5.0)、インペルターゼ(100 U)、β-ガラクトシダーゼ(100 U)を添加し飲料中に含まれる可能性のあるスクロースおよびラクトースを分解した。37°Cで4時間の反応後5%シュウ酸0.5 mLを加え酵素反応を停止しイオン交換樹脂(アンバーライトMB-3, オルガノ)9gを加え10分間振盪し脱塩した。回収した溶液を50 mLに定容した後、メンブランフィルター(0.45 μm)によってろ過することにより

HPLC試料とした。

3. HPLC分析

3種のアミノカラム、Tskgel NH₂-60, Asahipak NH 2 P-50 4 EおよびCAPCELL PAK NH₂ UG 80を用いたHPLCでは、カラム温度:室温, 移動相:アセトニトリル-水, 流速:0.8 mL/min, 試料注入量10 μL, 検出器:RI (RI-930, 日本分光)の条件で分析を行った。排除型イオン交換カラムCK 04 S(三菱化学)を用いたHPLCでは、カラム温度:65°C, 移動相:水, 流速:0.35 mL/min, 試料注入量:10 μL, 検出器:RI (Shodex RI 71, 昭和電工)の条件で分析を行った。

4. 未知成分の分取

未知成分の分取はODSカラムクロマトおよびゲルろ過により行った。分取用HPLCはODSカラム:R-3106-50 120 A AQ ODS(φ10 cm×100 cm, ワイエムシイ), カラム温度:室温, 移動相:水, 流速:250 mL/min, にて行った。溶出液を350 mLずつ分取し、相当するフラクションを回収した。ゲルろ過はBioGel P-2(φ2.5 cm×90 cm, BIORAD)を用いて、カラム温度:室温, 移動相:水, 流速:0.3 mL/minで行った。

5. NMRによる構造解析

NMR解析は重水中においてUNITY INOVA 600型(パリアン)を用いて25°Cで測定した。内部標準は軽水(HDO)(¹H:4.80 ppm)およびアセトン(¹³C:30.5 ppm)を用いた。¹H-NMRスペクトル,¹³C-NMRスペクトル,CODYスペクトルとHMBCスペクトルより構成糖の数と種類,結合様式を決定し構造を解析した。

結果と考察

1. HPLC条件の検討

IMOの分析マニュアル¹³⁾ではシリカ系アミノカラムが用いられている。現在、シリカ系アミノカラムよりも耐久性の優れたカラムとして、ポリマー系アミノカラムやポリマーコート型アミノカラムが市販されている。ここでは、これら耐久性の優れた2種類のカラムのIMOに対する定量性について調べた。定量性の検討はIMO-900[®]中に最も多く存在するイソマルトース(5 mg/mL)を4回測定しピーク高の変動係数(CV)を測定することにより行った。その結果、ポリマー系アミノカラムにおけるピーク高のCVは2.1%でありポリマーコート型アミノカラムの2.8%より低い値であった。そこで、IMOの定量にはポリマー系カラムを用いることにした。一方、本カラムでイソマルトースのピーク面積のCVを算出したところ3.6%と、ピーク高の方が面積と比較して定量時の再現性が高かった。また、IMOは複数のオリゴ糖成分から構成されるために、すべてを完全に分離することは難しい。そこで、より定量性を高めるためにピーク高が有効と考え、ピーク高を用いることとした。

次にポリマー系アミノカラムを使用した際の各成分の移

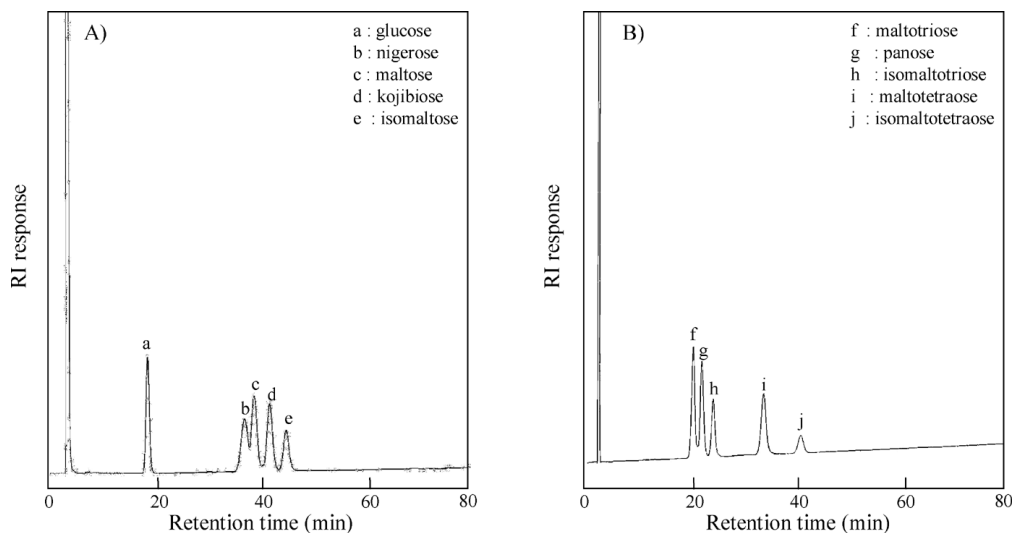


Fig. 1. HPLC chromatograms of each saccharide by a polymer-based amino column.

(A) HPLC chromatogram of glucose and disaccharides, eluted with acetonitrile-water (73 : 27 (w/w)), (B) HPLC chromatogram of tri- and tetra-saccharides eluted with acetonitrile-water (68 : 32 (w/w)).

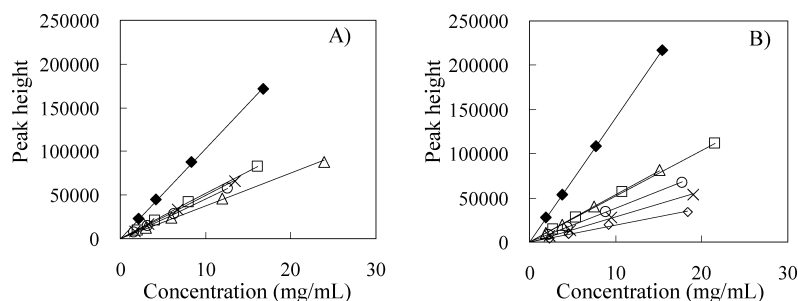


Fig. 2. Calibration curve for glucose and oligosaccharide by a polymer-based amino column.

(A) Calibration curves for glucose and disaccharides. Glucose (◆), maltose (□), isomaltose (△), nigerose (○) and kojibiose (×). (B) Calibration curves for tri- and tetra-saccharides. Glucose (◆), maltotriose (□), panose (△), isomaltotriose (○), maltotetraose (×) and isomalotetraose (◇).

動相について検討した。移動相はアセトニトリル-水の比率を 60 : 40 (w/w) から 80 : 20 (w/w) まで変えて、グルコース、マルトオリゴ糖 (マルトース, マルトトリオースおよびマルトテトラオース), IMO (イソマルトース, ニゲロース, コージビオース, イソマルトトリオース, パノースおよびイソマルトテトラオース) の分離定量に最適な条件を調べた。その結果, グルコース, 二糖類 (マルトース, イソマルトース, ニゲロースおよびコージビオース) の分析に最適なアセトニトリル-水の比率は 73 : 27 (w/w) であった。その際, 三糖以上のオリゴ糖は 50 分間

の分析においてピークの溶出が確認されなかったため, 三・四糖類の分析には 68 : 32 (w/w) のアセトニトリル-水を用いることにした。以上の条件により Fig. 1 に示すように上記標準標品の糖の分離が可能となった。

上記条件を基に各種標品の検量線を作成した。作成に当たり, 試薬標品の純度を確認するために, 各標品を 5 mg/mL に調製し, 前述の HPLC で分析した。各標品のピークの面積より純度を算出したところ, いずれも 95% 以上の値であった (Table 1)。これら標品を用いて, 濃度とピーク高の検量線を作成した (Fig. 2)。ここでは, ピーク高を純度 100% に補正した。いずれの標品においても濃度とピークの高さの間に最小二乗法で相関係数 0.999 以上の高い相関性が認められた。重合度が同一の標品の検量線の傾きを比較すると, 二糖類ではマルトース, コージビオース, ニゲロースおよびイソマルトースの順に勾配はゆるく, 結合様式の差異では α -1,4, α -1,2, α -1,3 および α -1,6 の順であった。三・四糖類でも, α -1,6 結合のみのオリゴ糖の検量線の傾きが, その他の結合を含むオリゴ糖の傾きよりも低かった。

上述のようにポリマー系アミノカラムを用いた際, 単位濃度あたりのピーク高はオリゴ糖標品ごとに差があることが示され, IMO の各成分の定量は成分ごとの検量線を用

Table 1. Purity of glucose and oligosaccharide reagents.

| | | HPLC eluant (acetonitrile-water) | Purity |
|------|-----------------|-------------------------------------|--------|
| DP*1 | Glucose | 73 : 27(w/w) | 100.0 |
| DP 2 | Maltose | 73 : 27(w/w) | 99.3 |
| | Isomaltose | | 96.1 |
| | Nigerose | | 100.0 |
| DP 3 | Kojibiose | 68 : 32(w/w) | 98.6 |
| | Maltotriose | | 97.8 |
| | Panose | | 100.0 |
| DP 4 | Isomaltotriose | 68 : 32(w/w) | 98.9 |
| | Maltotetraose | | 95.0 |
| | Isomalotetraose | | 96.3 |

* Degree of polymerization.

Table 2. Peak height of each saccharide and conversion factor to glucose concentration.

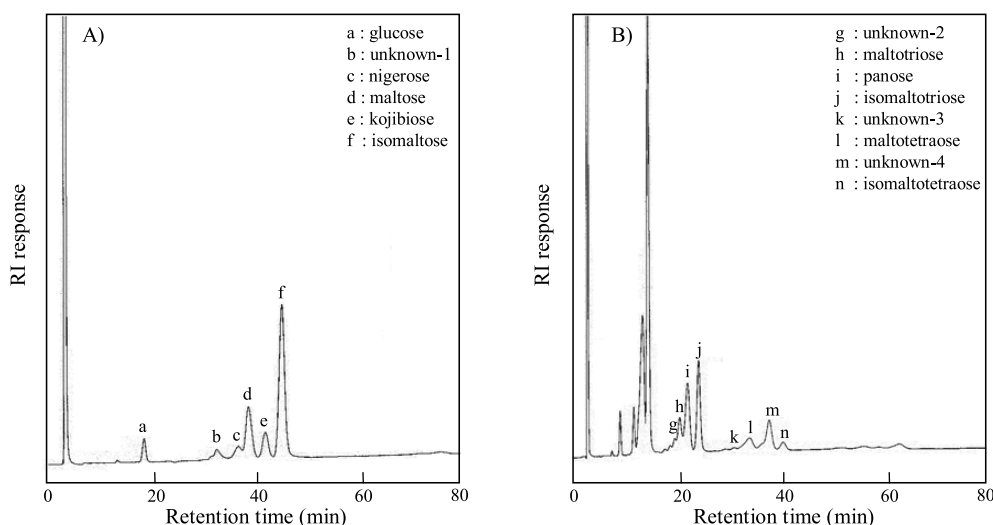
| | HPLC eluant (acetonitrile-water) | Slope* | Conversion factor |
|------------------|-------------------------------------|--------|----------------------|
| Glucose | | 10317 | 1 |
| Maltose | | 5154 | 0.50 |
| Isomaltose | 73 : 27(w/w) | 3736 | 0.36 |
| Nigerose | | 4514 | 0.44 |
| Kojibiose | | 4955 | 0.48 |
| Glucose | | 14083 | 1 |
| Maltotriose | | 5184 | 0.37 |
| Panose | | 5380 | 0.38 |
| Isomaltotriose | 68 : 32(w/w) | 3826 | 0.27 |
| Maltotetraose | | 2857 | 0.20 |
| Isomaltotetraose | | 1635 | 0.12 |

* Slope of peak height *versus* concentration. Values show peak height at 1 mg/mL saccharide.

いることが必要となる。しかし分析ごとに10成分すべての検量線を作成するのはかなりの時間を要するので、簡便にかつ精度よく分析することを目的に、グルコースと各オリゴ糖との間で濃度を換算できないか今回の実験結果を基に調べた。今回確認した各オリゴ糖の検量線はおおの直線性 (Fig. 2) を示したことから、Table 2に示したようにグルコースと各オリゴ糖との間で濃度換算が可能となることを見出し、グルコース濃度換算係数 (各オリゴ糖の傾き ÷ グルコースの傾き) としてまとめた。

ここで得られたグルコース換算係数を用いることで10種類の糖成分の定量は分析する度にすべての検量線を作成する必要はなく、1) 各オリゴ糖の分離確認とピーク高を測定し、2) 検量線によるグルコース濃度を定量することで、グルコースの所定濃度から各オリゴ糖濃度が定量可能になる。すなわち、

$$(\text{各オリゴ糖濃度}) = (\text{グルコース所定濃度}) \times (\text{各オリゴ糖のピーク高}) \div (\text{グルコース濃度換算係数}) \div (\text{グルコース所定濃度時のピーク高})$$

**Fig. 3.** HPLC chromatograms of IMO-900® by a polymer-based amino column.

(A) HPLC chromatogram of glucose and disaccharides, eluted with acetonitrile-water (73 : 27 (w/w)), (B) HPLC chromatogram of tri- and tetra-saccharides eluted with acetonitrile-water (68 : 32 (w/w)).

以上の検討結果により、新しい定量法として各成分の定量を以下の条件で行うことにした。

使用カラム : Asahipak NH 2 P 50 4 E
 温度 : 室温
 流速 : 0.8 mL/min
 移動相 : 単・二糖類分析 73 : 27 (w/w) アセトニトリル-水
 三・四糖類分析 68 : 32 (w/w) アセトニトリル-水
 ピーク高さをを用いた検量線法でグルコース換算係数を用いる
 ただし、HPLCで3回測定しその平均値を測定結果とする

2. IMO含有製品の定量

設定した条件に従い改良定量法でIMOシラップ製品IMO-900®中に含まれる成分を分析した。1 mg/mLに調製したグルコース、マルトオリゴ糖 (マルトース、マルトトリオースおよびマルトテトラオース)、IMO (イソマルトース、コージビオース、ニゲロース、イソマルトトリオースおよびイソマルトテトラオース) を標準としてHPLCの溶出時間の一致により単糖から四糖類の各種成分を同定した (Fig. 3)。同定した成分の定量結果をTable 3に示す。

次に、同一のIMO-900®を従来の分析マニュアル (以下「従来法」) で分析し (Table 4)、改良定量法の定量結果と比較した。その結果、二・三・四糖類で分離ならびに定量

Table 3. Quantitative analysis of IMO-900® by the improved method.

| | Component | Content (g/100 g product) |
|------|------------------|------------------------------|
| DP 1 | Glucose | 1.8 |
| DP 2 | Maltose | 6.9 |
| | Isomaltose | 19.2 |
| | Nigerose | 2.0 |
| | Kojibiose | 3.5 |
| DP 3 | Maltotriose | 2.1 |
| | Panose | 4.9 |
| | Isomaltotriose | 10.3 |
| DP 4 | Maltotetraose | 1.6 |
| | Isomaltotetraose | 2.8 |

Table 4. Quantitative analysis of IMO-900[®] by the conventional method.

| Component | | Content (g/100 g product) |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| DP 1 | Glucose | 1.6 |
| DP 2 | Maltose | 5.5 |
| | Isomaltose | 20.9 |
| | Others* | 7.2 |
| DP 3 | Maltotriose | 1.6 |
| | Panose | 8.9 |
| | Isomaltotriose | 7.3 |
| | Others | 4.1 |
| DP 4 | Isomaltotetraose and others | 11.9 |
| ≥DP 5 | Isomaltopentaose and others | 6.6 |

* Total content of nigerose and kojibiose.

Table 5. Total IMO and identified IMO in IMO-900[®].

| | Total saccharide (g/100 g product) | Total IMO content (g/100 g product) | Identified IMO content (g/100 g product) |
|---------------------|---------------------------------------|--|---|
| Conventional method | 75.6 | 66.9 ^{*1} | 37.1 ^{*2} |
| Improved method | 75.6 | — | 42.7 ^{*3} |

^{*1} Content of total saccharide minus glucose, maltose and maltotriose. ^{*2} Total content of isomaltose, isomaltotriose and panose.

^{*3} Total content of isomaltose, kojibiose, nigerose, isomaltotriose, panose and isomaltotetraose.

性に差がみられた。二糖類および四糖類に関して、定量される成分が異なった。二糖類において改良定量法ではすべての成分が分離されているのに対し、従来法ではニゲロースとコージビオースがその他の成分として定量される。四糖類において改良定量法では成分ごとに定量されているのに対し、従来法ではイソマルトテトラオースと分岐四糖類として定量される。また、マルトース、イソマルトース、マルトトリオース、パノースおよびイソマルトトリオースの定量値に差異がみられた。これらは、使用したカラムの分離能や分析条件の違いによるものと思われる。

上記結果を基に、IMO-900[®]に含まれる全 IMO 含量および個々に定量された IMO の合計値をまとめた (Table 5)。ここで全 IMO 含量とは、全糖量から従来法にて測定した単糖およびマルトオリゴ糖含量を差し引いた値とする¹²⁾。そのため、全 IMO には構造が明確ではない成分も含まれる。全 IMO 含量は製品 100 g 当たり 66.9 g で、そのうち、従来法により個々に定量された IMO (イソマルトース、イソマルトトリオースおよびパノース) の合計値は 37.1 g であった。それに対し、改良定量法によって個々に定量された IMO (イソマルトース、ニゲロース、コージビオース、イソマルトトリオース、パノースおよびイソマルトテトラオース) の合計含量は 42.7 g であり、改良定量法を用いることにより IMO 組成がより詳細に分析可能であることが示された。

続いて、製造ロットの異なる IMO-900[®]に含まれる IMO 含量を測定した (Table 6)。全 IMO 含量は従来法で、個々に定量された IMO の合計含量は改良定量法と従来法で測定した。その結果、全 IMO 含量は 66.3 ± 0.5 g、個々に定

Table 6. IMO contents of various IMO 900[®] products determined by the conventional and improved methods.

| | IMO content (g/product 100 g) | | | | | Average \pm SD ^{*1} |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------------|
| | Lot. A | Lot. B | Lot. C | Lot. D | Lot. E | |
| Total IMO | | | | | | |
| Conventional method ^{*2} | 66.9 | 65.9 | 66.6 | 66.1 | 65.8 | 66.3 \pm 0.5 |
| Identified IMO | | | | | | |
| Conventional method ^{*3} | 37.1 | 33.7 | 32.2 | 36.5 | 37.7 | 35.4 \pm 2.4 |
| Improved method ^{*4} | 42.7 | 40.8 | 42.2 | 44.2 | 44.6 | 42.9 \pm 1.5 |

^{*1} Standard deviation. ^{*2} Content of total saccharide minus glucose, maltose and maltotriose. ^{*3} Total content of isomaltose, isomaltotriose and panose. ^{*4} Total content of isomaltose, nigerose, kojibiose, isomaltotriose, panose and isomaltotetraose.

量された IMO 合計値は従来法で 35.4 ± 2.4 g、改良定量法では 42.9 ± 1.5 g であった。

つぎに、IMO 含有飲料のエコライフに含まれる成分を定量した。前処理した飲料は HPLC において成分ごとの分離が可能であった。全 IMO 含量は飲料 100 g 当たり 22.5 g (従来法) であり、個々に定量された IMO の合計含量は従来法では 12.3 g、改良定量法では 14.6 g であった。成分ごとに定量されたオリゴ糖含量 (g) は、従来法ではイソマルトース 7.0、パノース 3.3、イソマルトトリオース 2.0 となり、改良定量法ではイソマルトース 7.1、ニゲロース 0.5、コージビオース 0.9、パノース 1.7、イソマルトトリオース 3.6、イソマルトテトラオース 0.8 であった。

3. 未知成分の同定

IMO-900[®]中の成分を分析したところ、既知のグルコース、マルトオリゴ糖 (マルトース、マルトトリオースおよびマルトテトラオース) および IMO (イソマルトース、ニゲロース、コージビオース、イソマルトトリオースおよびイソマルトテトラオース) にはない 4 種類のオリゴ糖が検出された (Fig. 3)。それらの含有量を同一重合度のオリゴ糖の検量線の傾きの平均値により推定したところ、製品 100 g 当たり未知成分 1 は 2.7 g、未知成分 2 は 0.8 g、未知成分 3 は 0.4 g および未知成分 4 は 5.1 g であった。そこで、最も多く含まれる未知成分 4 を精製し、NMR を用いて構造解析を行った。

未知成分 4 の分取は所定量が必要なため ODS カラムクロマトおよびゲルろ過により行った。まず、IMO-900[®]を分取用 ODS カラムに供しイソマルトテトラオースと未知成分を主成分とした四糖類画分を回収した。これを濃縮した後、バイオゲル P2 カラムにより未知成分 4 を回収した。バイオゲル P2 カラムの溶出パターンはイソマルトテトラオース、未知成分 4 の順に溶出されており、未知成分 4 の純度が 95% 以上となるまでゲルろ過操作を繰り返し、濃縮・凍結乾燥により白色粉末を得た。精製した未知成分 4 を NMR により構造解析した。

各プロトンおよびカーボンのカップリング定数を

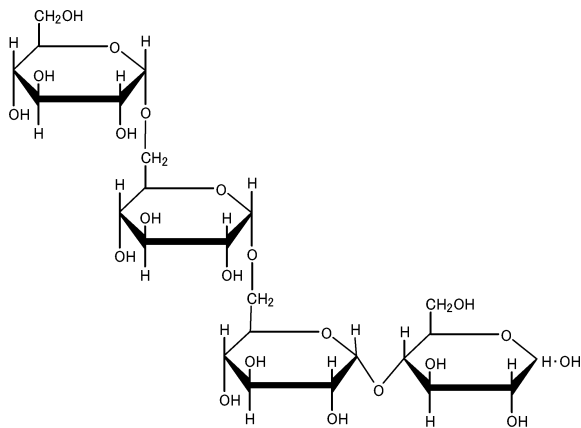


Fig. 4. Structure of an identified sugar as isomaltotriosylglucose (6-*O*- α -D-glucopyranosyl-6-*O*- α -D-glucopyranosyl-4-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose).

Table 6 に示す. 構成糖は非還元末端から順に I, II, ... と番号を付けた. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの面積値より四糖類であること, 構成糖が 6 単糖であることがわかった. さらに, すべての構成糖の 2 位から 4 位までのカップリング定数 ($J_{2,3}$ および $J_{3,4}$) はいずれも 6 以上の値を示していることから, 各構成糖がグルコースであることがわかった. また, 構成糖 II, III, IV の 1 位と 2 位のカップリング定数は 5 以下の値であり, すべての構成糖間の結合が α -結合であることが示された. さらに, HMBC より各構成糖間の結合を示すクロスピークが確認され (Table 6.^{*1-6}), 還元末端側から 1,4-結合, 1,6-結合および 1,6-結合であることが示された. 以上の結果から, 未知成分 4 はイソマルトトリオシルグルコース (6-*O*- α -D-glucopyranosyl-6-*O*- α -D-glucopyranosyl-4-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose, Fig. 4) であることがわかった.

4. 糸状菌 α -グルコシダーゼの転移反応

IMO-900[®]は従来法で固形分中 50% 以上の IMO を含む原液からグルコースを分離して生産される. この製品に含まれる IMO の組成は, その原液を生産する際に使用される糸状菌 α -グルコシダーゼの転移反応によって決まる. そこで, 改良定量法で測定した IMO-900[®]の分析結果から α -グルコシダーゼの作用性について考察した.

α -グルコシダーゼによる転移反応はグルコシル基をアクセプターの非還元末端残基に転移する反応である. 四糖類のイソマルトトリオシルグルコースとイソマルトテトラオースはそれぞれパノースとイソマルトトリオースの転移産物と考えられる. IMO-900[®]の分析結果から, パノース含量 (製品 100 g 当たり 4.9 g) はイソマルトトリオース含量 (10.3 g) よりも低く, イソマルトトリオシルグルコース (推定値 5.1 g) の方がイソマルトテトラオース (2.8 g) よりも多く含まれている. このことから, 分子内に α -1,4 結合をもつパノースの方が α -1,6 結合のみのイソマルトトリオースよりも特異性の高いアクセプターであることが推察される.

また, 改良定量法において IMO-900[®]に含まれる二糖類は α -1,3, α -1,4, α -1,2 および α -1,6 結合のオリゴ糖の順に, 三, 四糖類においては α -1,4 のみのオリゴ糖, α -1,6 のみのオリゴ糖の順に溶出することがわかった. さらに, パノースのように α -1,4 と α -1,6 結合を有するオリゴ糖は α -1,4 のみの三糖 (マルトトリオース) と α -1,6 のみの三糖 (イソマルトトリオース) の間に溶出し, 溶出する順に規則性が見出された. この結果に従い未知成分 2 および 3 の構造について考察すると, いずれも α -1,4 オリゴ糖よりも早く溶出していることから, 未知成分 2 は α -1,3 結合を含

Table 7. Assignments of ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts of unknown component-4 (isomaltotriosyl glucose).

| | | C 1 | C 2 | C 3 | C 4 | C 5 | C 6 x | C 6 y |
|------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------|--------------------|-----------|
| I α | ^1H | 5.28 $J_{1,2}=3.7$ | 3.62 $J_{2,3}=9.5$ | 4.02 $J_{3,4}=9.5$ | 3.70 ^{*2} | | 3.92 | — |
| | ^{13}C | 92.1 | | | 77.7 ^{*1} | | 61.0 | — |
| I β | ^1H | 4.70 $J_{1,2}=7.9$ | 3.33 $J_{2,3}=9.5$ | 3.82 $J_{3,4}=9.1$ | 3.69 ^{*2} | 3.67 | 3.84 | 3.99 — |
| | ^{13}C | 96.0 | 74.2 | 76.4 | 77.5 ^{*1} | 74.8 | 61.1 | — |
| II | ^1H | 5.45 ^{*1} $J_{1,2}=3.8$ | 3.65 $J_{2,3}=9.4$ | 3.74 $J_{3,4}=9.4$ | 3.54 | 3.98 | 3.80 ^{*4} | 4.40 — |
| | ^{13}C | 100.0 ^{*2} | (71–73) | 73.4 | 69.8 | (70–72) | 66.2 ^{*3} | — |
| III | ^1H | 5.02 ^{*3} $J_{1,2}=2.7$ | 3.64 $J_{2,3}=9.6$ | 3.80 $J_{3,4}=9.4$ | 3.57 | 3.97 | 3.82 ^{*6} | 4.02 — |
| | ^{13}C | 98.3 ^{*4} | (71–73) | (72–74) | 69.8 | (70–72) | 65.8 ^{*5} | — |
| IV | ^1H | 5.01 ^{*5} $J_{1,2}=3.3$ | 3.61 $J_{2,3}=9.6$ | 3.77 $J_{3,4}=9.5$ | 3.48 | | 3.83 | 3.90 — |
| | ^{13}C | 98.0 ^{*6} | (71–73) | (72–74) | 69.8 | (70–74) | 60.8 | — |

The ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shift are shown in parts per million downfield from internal standard from HDO (^1H : 4.80 ppm) and acetone (^{13}C : 30.5 ppm). Chemical shifts were determined from two-dimensional spectra of double-quantum-filtered COSY, HMBC (heteronuclear multiple-bond coherence) and heteronuclear single quantum coherence. The residue were sequentially numbered from the reducing end. Asterisks (^{*1-6}) indicate the signals where inter-ring HMBC cross-peaks were observed.

む三糖類、未知成分3は α -1,3結合を含む四糖類と推察される。すなわち、三糖類以上のオリゴ糖にも α -1,3転移生成物が存在することが示唆された。

以上のように、改良定量法は二糖類から四糖類までの各成分の分離・定量が可能であるため、グルコシル基の転移反応の研究にも利用できると考えられた。

要 約

イソマルトオリゴ糖 (IMO) は、グルコースを構成単位とし、 α -1,6、 α -1,2または α -1,3結合のいずれかの結合を分子内に一つ以上含むオリゴ糖の総称である。現行のIMO定量法ではシリカを担体としたアミノカラムが使用されている。しかし、このアミノカラムは耐久性が低く使用に伴い経時的に劣化するため、再現性の高い分析を行うことが困難であった。そのため、検量線を用いての分析が行えず、排除型イオン交換カラムと組み合わせることにより算出する方法が採用されている (従来法)。そこで、耐久性の高いポリマーを担体としたアミノカラムを選定し、絶対検量線によるイソマルトオリゴ糖の定量を試みた。その際の定量成分はイソマルトース、コージビオース、ニゲロース、イソマルトトリオース、パノースおよびイソマルトテトラオースとした。

分離・定量条件について検討した結果、単糖・二糖類分析と三糖・四糖類分析に異なる濃度のアセトニトリル-水を移動相とすることにより、グルコース、マルトース、マルトトリオースおよびマルトテトラオースと上記6種類のIMOが分離できた (改良定量法)。改良定量法による分離は従来法よりも優れており詳細な糖組成分析が可能となった。各構成糖の濃度-ピーク高さの検量線を作成したところ、10種類の成分のすべての傾きが異なっていた。グルコース濃度から、他9成分の濃度の換算が可能となることを見出し、グルコース濃度換算係数をまとめた。本分析法で得られたグルコース濃度換算係数を利用することにより、10成分を定量する際にすべての検量線を作成する必要はなく、グルコース濃度検量線ならびに他の9成分の分離とピーク高を測定すれば、各成分の定量が可能となった。

改良定量法でIMO-900[®]を分析したところ、個々に定量されたIMOの合計含量は100g当たり 42.9 ± 1.5 g (5ロット平均)であった。従来法による個々に定量されたIMO分析値 (35.4 ± 2.4 g)と比較したところ差異が認められた。これは改良定量法の分離能が高く、また検量線を用いることによって精度良く定量できたことによるものである。

改良定量法によりIMO-900[®]を分析した際、標準試料と保持時間が一致しない4種類の成分が存在した。それらの中で最も多い成分を単離精製し、¹H-および¹³C-NMR解析により解析した結果イソマルトトリオシルグルコースであった。

文 献

- 1) 弥武経也：イソマルトオリゴ糖。「う蝕予防のための食品科学」, 大嶋 隆, 浜田茂幸編集, 医歯薬出版, 東京, pp. 112-121 (1996).
- 2) 三吉新介：各種オリゴ糖の製造とその利用。「工業用糖質酵素ハンドブック」, 岡田茂孝, 北畑寿美雄監修, 講談社, 東京, pp. 120-122 (1999).
- 3) 本藤 智, 望月 務：みその遊離糖について. 日本食品工学会誌, **26**, 469-474 (1979).
- 4) 布川弥太郎：日本酒とオリゴ糖. 澱粉科学, **28**, 109-117 (1981).
- 5) 西野隆三, 小沢善徳, 安田 敦, 逆井利夫：醤油とオリゴ糖. 澱粉科学, **28**, 125-131 (1981).
- 6) J.W. White, Jr. and N. Hoban: Composition of honey. IV. Identification of the disaccharide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 386-392 (1959).
- 7) T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, and T. Mitsuoka: Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157-2159 (1991).
- 8) 金子俊之, 河本高伸, 菊池弘恵, 塩田真夫, 弥武経也, 飯野久和, 辻 啓介：イソマルトオリゴ糖摂取が健常人の便通と腸内環境に及ぼす影響. 日本家政学会誌, **44**, 245-254 (1993).
- 9) 金子俊之, 河本高伸, 菊池弘恵, 塩田真夫, 弥武経也, 飯野久和, 辻 啓介：イソマルトオリゴ糖摂取が健常人の便通と消化器症状に及ぼす影響. 臨床栄養, **82**, 789-794 (1993).
- 10) 金子俊之, 河本高伸, 福井史生, 秋葉哲生, 鈴木重紀, 平尾昭法, 中鶴修一, 蟹沢成好：イソマルトオリゴ糖の急性・慢性毒性及び変異原性試験並びにラット抹消血リンパ球と腸内フローラに及ぼす影響について. 食品衛生学雑誌, **31**, 394-403 (1990).
- 11) 水測裕之, 西村仁志, 吉開泰信：イソマルトオリゴ糖が免疫系細胞に与える影響. 日本農芸化学会誌 (講演要旨), 214 (2004).
- 12) 金子俊之, 河本高伸, 菊池弘恵, 福井史生, 塩田真夫, 弥武経也, 高久 肇, 飯野久和：イソマルトオリゴ糖のラットにおける利用性と血清脂質に及ぼす影響. 日本農芸化学会誌, **66**, 1211-1220 (1992).
- 13) 日本健康・栄養食品協会：イソマルトオリゴ糖の試験法, 「特定保健用食品試験検査マニュアル」, 日本健康・栄養食品協会, 東京, 別添資料-2⑧pp. 1-4 (1992).

標準試薬を用いた検量線による市販イソマルトオリゴ糖製品中のイソマルトオリゴ糖の定量改良法

中西泰介¹, 野村 圭¹, 竹田靖史²

¹ 昭和産業株式会社総合研究所鹿島研究センター

(314-0194 神栖市東深芝 6)

² 鹿児島大学 (890-8580 鹿児島市郡元 1-21-24)

市販イソマルトオリゴ糖製品中のオリゴ糖の定量法としてポリマー担体のアミノカラムを用いて、改良定量法を開発した。改良定量法では従来使用していたシリカ担体のアミノカラムよりも耐久性の高いカラムを用いた。本カラムを使用することにより市販イソマルトオリゴ糖製品中の各標準オリゴ糖の定量が RI 検出による絶対検量線法で可能となった。グルコース、マルトース、コージピオース、ニゲロース、イソマルトース、マルトトリオース、パノース、イソマルトトリオース、マルトテトラオース、イソマルトテトラオースの濃度とピーク高の検量線を作成したところ 17 mg/mL まで直線を示し、最小二乗法で相関係数 0.999 以上の高い相関性が認められた。各糖類ごとに直線の勾配は異なっており、グルコースが最も高く、イソマルトテトラオースが最も低くなった。グルコースの勾配に対して各糖類の相対勾配 (各糖類の勾配/グルコースの勾配) を求め、変換ファクターとした。イソマルトオリゴ糖工業製品中の各糖類の濃度定量は液クロ分析で得られたピーク高より以下の式に従い算出した：

$$(\text{糖類 A の濃度, mg/mL}) = (\text{グルコース標準の濃度, mg/mL}) \times (\text{糖類 A のピーク高}) / (\text{糖類 A の変換ファクター}) / (\text{グルコース標準のピーク高})$$

改良定量法を用いて市販イソマルトオリゴ糖製品を分析した結果、製品 100 g (糖固形分 75.6 g 含有) 当たりに標準イソマルトオリゴ糖は 42.7 g であった。その構成糖はイソマルトース 19.2 g, イソマルトトリオース 10.3 g を主成分として、パノース 4.9 g, ニゲロース, コージピオース, イソマルトテトラオースが各々 2.0, 3.5, 2.8 g であった。これら標準オリゴ糖の含有量は従来法と比較して高くなったが、これは従来定量法が各オリゴ糖の検量線法を用いて定量できなかったことに起因するものと考えられた。更に改良定量法ではニゲロース, コージピオース, 4 種類の未知のオリゴ糖の分離も可能となった。4 種類の未知オリゴ糖の中で最も多い成分を単離・精製し、¹H および ¹³C-NMR 解析したところイソマルトトリオシルグルコースであった。