

食品素材などとしての「高機能化ポリフェノール誘導体」の 酵素的合成システムの開発

中島伸佳* 石原浩二**

キーワード：酵素的合成、天然植物色素、抗酸化性、安定化、リパーゼ

1. はじめに

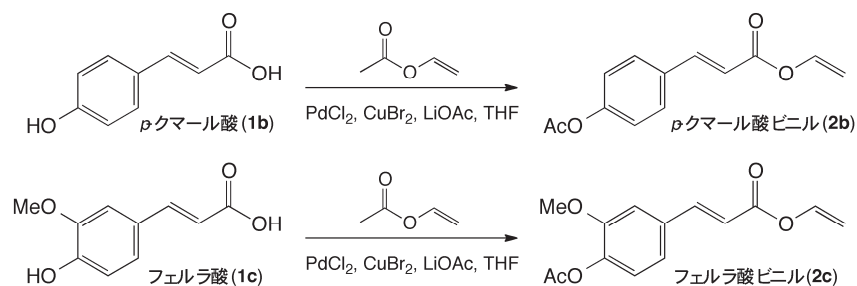
花の色の多彩さや美しさを担う天然植物色素はフラボノイドを基本骨格（アグリコン）とした配糖体構造を有し、さらに糖の特定の水酸基が位置特異的にアシル化を受けている場合が多く、このような化学構造的な修飾が、それらの天然植物色素の安定性や生理機能に深く関与しているといわれている。

天然植物色素は、それ自体が持つ抗酸化性（ラジカル消去能）などの生理機能などから「機能性食品素材」などとして注目される一方、それらの中には美白効果や抗菌作用など様々な生理機能などを有する化合物も存在しており、化粧品素材や食品添加物などとしての利用や研究も試みられている。

そこで、本研究では、まず美白効果があるとされている植物性成分のひとつであるアルブチンに各種の芳香族酸を導入したアシル化アルブチンを酵素的に合成（リパーゼのエステル交換反応を利用）し、新規で高機能な食品や化粧品素材などを開発することを最終目的とした。

2. アシルドナーの合成

リパーゼ触媒によるトランスアシル化には、通常、芳香族酸ビニルがアシルドナーとして必要である。しかし、桂皮酸ビニル (3a) 以外は市販されていないので以下のように化学的に合成した（参考文献参照）。



そして、フェノール性水酸基のアセチル基を脱保護するために、EtOH 存在下でのリパーゼによる位置選択的な脱保護を行った。

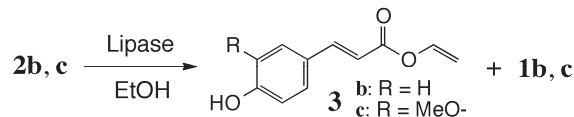
* 岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

〒719-1197 岡山県総社市窪木111

** 岡山理科大学理学部臨床生命科学科

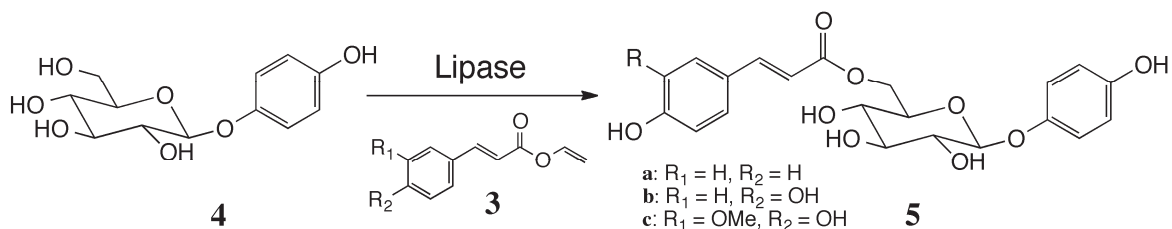
〒701-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1

Enzymatic Regioselective Alcoholysis of **2b**, **2c** in EtOH



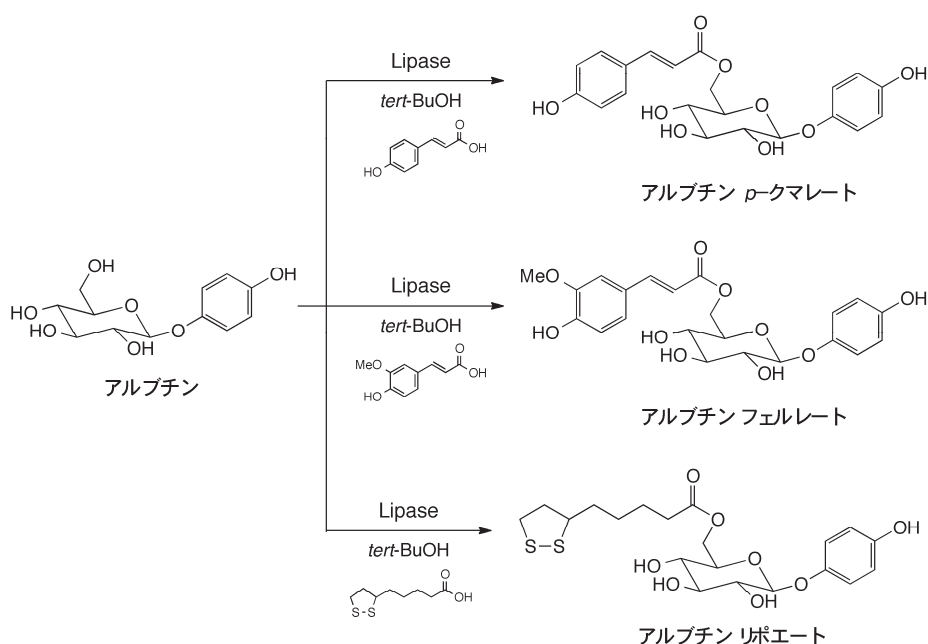
Lipase	2b		2c	
	3b (%)	1b (%)	3c (%)	1c (%)
Amano-A	55	11	43	21
Amano-AY	46	14	50	15
Amano-F	43	9	39	22
Amano-M	32	15	41	18
Amano-PS	85	0	78	0
CAL-B	64	6	67	5

3. アシル化アルブチンの酵素合成



さらに、9種類のリパーゼを用いてアルブチンへの桂皮酸エステル化に関するスクリーニングを行った。その結果、酵素としてはCAL-B (Chirazyme L-2)が、溶媒は完全には脱水していないアセトニトリルが最適であり、2日後に最大変換率(90%)を示した。同様に、アシルドナーとして *p*-クマール酸ビニル(3b)とフェルラ酸ビニル(3c)を用いた場合も、2日後に最大変換率(5b: 85%、5c: 70%)を示した(参考文献参照)。

次に、ビニルエステルを経由しない直接的な酵素的アシル化も検討した。その結果、脱水した *tert*-ブタノール中で *p*-クマール酸、フェルラ酸、*a*-リポ酸をアシルドナーとした場合において、それぞれのアシル化生成物を確認できた。アシル化の変換率には、アシルドナーとして *a*-リポ酸を用いた場合が最も高く(>90%)、次いで *p*-クマール酸(65%)、フェルラ酸(50%)の順であった(参考文献参照)。



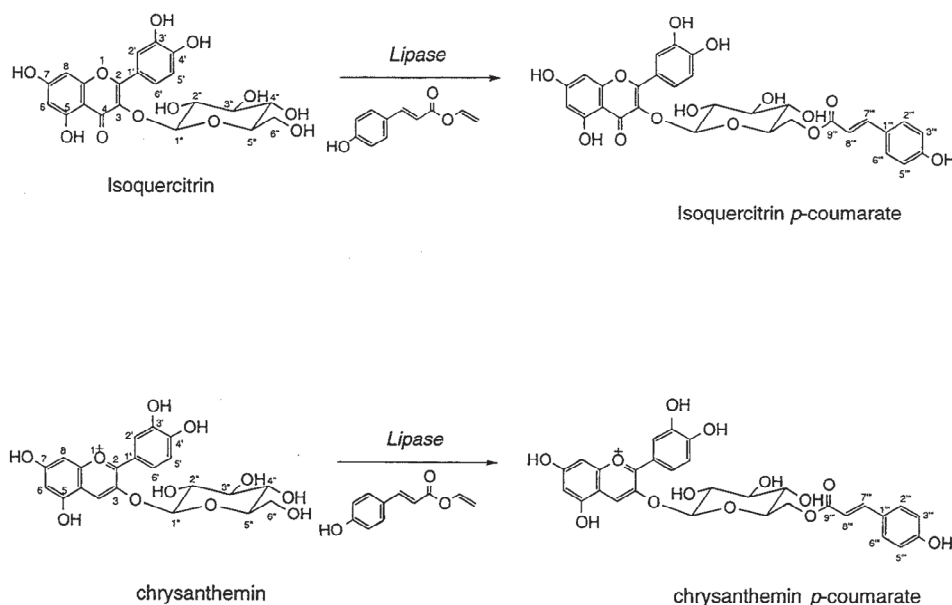
アルブチンシンナメート（桂皮酸エステル）、アルブチン *p*-クマレート、アルブチンフェルレート、アルブチン α -リボ酸エステルなどについては、抗酸化性を維持したままで、耐光性や耐熱性などの安定性が向上することが確認できた。

4. アシル化植物色素の酵素合成

最後に、以下の Fig. に示すように、変換率は、さほど高くはなかったが（単離収量：20% 程度）、生体触媒（リパーゼ）として CAL-B を、溶媒として脱水していないアセトン（または、アセトニトリル）を用いて、50°C で、1 週間に渡り、*p*-クマール酸ビニル（3b）やフェルラ酸ビニル（3c）をアシルドナーとして、花卉などの植物性組織の色彩を担う天然植物色素そのものであるイソケルシトリンとクリサンテミンのそれぞれのアシル化を行った（参考文献参照）。

この場合においても、それぞれのアグリコン部分のポリフェノール構造などが有する「抗酸化性」を、ほぼ維持した状態で、熱や光に対する安定化などの「高機能化」が達成できた。

しかしながら、フラボノイド類のような天然植物色素分子などの比較的、高分子のアシルアクセプターの、リパーゼによる酵素的エステル交換反応は、アシルドナーとして芳香族酸ビニルの利用が、より効果的であった。



Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize isoquercitrin *p*-coumarate and chrysanthemine *p*-coumarate

参考文献

- 1) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Matsumura, H. Hamada, K. Nakamura, and T. Furuya,
Lipase-catalyzed Synthesis of Arbutin Cinnamate in Organic Solvent and Application of Transesterification to Stabilize Plant Pigments.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 61(11), pp. 1926-1928, 1997.
- 2) N. Nakajima, K. Ishihara, T. Furuya, and H. Hamada,
Lipase-catalyzed Regioselective and Direct Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant-pigment.
J. Biosci. Bioeng., 87(1), pp. 105-107, 1999.
- 3) K. Ishihara, N. Nakajima, H. Yamaguchi, K. Nakamura, T. Furuya, and H. Hamada,
A Chemoenzymatic Synthesis of Aromatic Carboxylic Acid Vinyl Esters.
J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 7, pp. 307-310, 1999.
- 4) N. Nakajima, M. Sugimoto, H. Yokoi, H. Tsuji, and K. Ishihara,
Comparison on Acylated Plant Pigments: Light-resistibility and Radical Scavenging Ability.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 67(8), pp. 1828-1831, 2003.
- 5) K. Ishihara and N. Nakajima,
Structural Aspects of Acylated Plant Pigments: Stabilization of Flavonoid Glucosides and Interpretation of their Functions.
J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 23, pp. 411-418, 2003.
- 6) K. Ishihara, Y. Katsube, N. Kumazawa, N. Masuoka, and N. Nakajima,
Enzymatic Preparation of Arbutin Derivatives: Lipase-catalyzed Direct Acylation without the Need of Vinyl Ester as an Acyl Donor.
J. Biosci. Bioeng., 109(6), pp. 554-556, 2010.

Lipase-catalyzed Regioselective Acylation of Arbutin and Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant pigments

NOBUYOSHI NAKAJIMA*, KOHJI ISHIHARA**

**Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama, 719-1197, Japan*

***Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

Abstract : Arbutin and naturally-occurring-plant pigments were acylated with aromatic acids to the corresponding acylated forms by a lipase-catalyzed transesterification. As the results, further stabilization and functionalization of natural bioactive compounds as food additives and cosmetic materials have been achieved by the enzymatic-modification method.

Keywords : Enzymatic synthesis, Naturally-occurring-plant pigment, Radical- scavenging ability, Stabilization, Lipase