

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：37601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580165

研究課題名（和文）リパーゼ触媒アシル化によるアントシアニン色素の高機能化

研究課題名（英文）Enhancement of anthocyanin functionalities by lipase-catalyzed acylation.

研究代表者 寺原 典彦（TERAHARA NORIHIKO）

南九州大学・健康栄養学部食品健康学科・教授

研究者番号：60155471

## 研究成果の概要（和文）：

アントシアニン色素の高機能化を目指して、基質-ビニルエステル-シクロヘキサノン-リパーゼ系によるアシル化反応を検討した結果、基質の反応性はアルブチン、サリシン>アスコルビン酸、グルコースであった。目的のアントシアニン類（フラボノイド配糖体を含む）は用いた全てのリパーゼで反応しなかった。今後、リパーゼ類に対するアントシアニン類の阻害性や特異性などを検討する必要があると考える。

## 研究成果の概要（英文）：

Aiming at enhancement of anthocyanin functionalities, acylation under combination of substrate - vinyl ester cyclohexanone - lipase resulted in the reactive order of arbutin and salicin > ascorbic acid and glucose. Objective anthocyanins (including flavonoid glycosides) did not react under all lipases used. The future, there might be a need to pursue the anthocyanins' inhibition and the specificity to the lipases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アシル化アントシアニン、リパーゼ、アシル化、安定性、機能性

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

植物成分のアントシアニン (AN) 色素類は梅漬け、ワイン、ジャムなどの着色に伝統的に用いられており、食経験上安全性は高い事が判明している。また最近では、三次機能をもつ食品因子としても見直されている。今までに、ブルーベリー、ソ、ナス、紫甘しょなどの AN 類には抗酸化性、視力改善性、抗変異原性、抗ウイルス性、血圧上昇抑制性、肝機能改善、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害性、抗炎症性、制がん性など多くの生理活性が見いだされている。そのため、食用天然色素（二次機能性）だけにとどまらず、健康食品素材（三次機能性）としての応用も進んでいる。

しかし、一般に非アシル化 AN 類は強酸性以外の液性（中性付近の食品や血液・体液を含む）では低安定（退色・褐変化する）である。また、経口摂取した場合、高極性のためか、丸ごと配糖体として吸収後、速やかに排泄され、かつ腸管吸収率が低いなどの特徴（欠点）を有することがわかってきた。

一方、天然には表 1 のように有機酸が糖部にエステル結合したアシル化アントシアニン (AAN) 類が知られている。このうち、芳香族有機酸 (Ar) の複数結合したポリアシル化 Ar-AAN は、

- ① Ar 芳香環とアグリコン芳香環同士の分子内スタッキングによる水和防止効果が弱酸性～中性水溶液中での AN の色調の安定化を増大。
- ② 結合 Ar の抗酸化性がアグリコンのそれに加わり、AN の抗酸化性を増大。
- ③ アシル化による AN の疎水性の増大が腸管での吸収率を増大。
- ④ Ar が紫外線 UV-B (280～320 nm) を吸収するので、日光などに対する防御（サンスクリーン）効果。

などの作用が知られている。中でもヒドロキシケイ皮酸類を 2 個以上持つポリアシル化 Ar-AAN はこれらの作用が顕著で、特に①の効果による著しい安定性を示す。このうち、①～③は高機能食用色素や医薬品素材として、また、①、②、④は化粧品素材として開発するのに特に有用な性質である。

表 1. 天然アシル化アントシアニン (AAN) 中の有機酸

●Ar-AAN・・・芳香族有機酸 (Ar) の結合した AAN
・ヒドロキシケイ皮酸類 (p-ケル酸、カエ酸、フェル酸、シベン酸など)
・安息香酸類 (p-ヒドロキシ安息香酸、没食子酸など)
●Al-AAN・・・脂肪族有機酸 (Al) の結合した AAN
酢酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸など

2. 研究の目的

このように、天然ポリアシル化 Ar-AAN 類は高機能性で、広い応用が期待できるが、紫甘しょや紫キャベツなど比較的限られた植物種にしか分布せず、利用が制限されているのが現状

である。そのため、図 1 の様に天然型、又はそれ以上の高機能が期待される非天然型の Ar-AAN 類をリパーゼ触媒で合成したい。

一方、脂肪族有機酸 (Al) が結合した天然型 Al-AAN 類では、表 1 のように小分子の Al が結合したものしか見つかっていない。これらは Ar-AAN と違い、Al が安定化や疎水性の増大化にほとんど寄与していない。そこで、本研究では、Al として脂質中に見られる中・長鎖脂肪酸 (C<sub>4</sub>～C<sub>18</sub>) を用いて、図 1 の様にリパーゼ酵素合成したい。この場合、合成 Al-AAN は全て非天然型（新規）であり、疎水性の増大の他に、新規な安定性や機能性（機構）の発見が期待できる。

また、このような Ar/Al-AAN 類が大量調製できれば高度有効利用や応用分野の拡大にも貢献しうる。

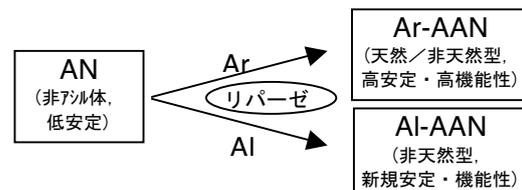


図 1. AN 類のリパーゼ触媒アシル化

3. 研究の方法

(1) 平成 21 年度は、色素含有材料から入手容易で比較的単純な構造をもつ AN 基質であるシアニン 3-グルコシド (C3G) 及び関連 AN 類の大量単離・調製、及び構造確認を行った。

まず、市販の紫トウモロコシ色素製剤を入手し、主要成分である C3G を各種吸着 (XAD-2000, PVP) カラムクロマトグラフィーや分取 ODS-HPLC システムなどを用いて大量単離精製・調製を行った。単離色素の酸加水分解による化学分析、フォトイオードアレイ検出器-HPLC 分析、UV-Vis スペクトル測定、及び ESI/TOFMS による分子量測定を行い、目的 AN の構造を確認した。同様に、市販の紫甘しょよりアシル化 AN 類を、市販の紫ソ葉よりソニンを調製することを試みた。

(2) 平成 22 年度は、アルコール基質として単離 AN 類以外の関連配糖体、市販の酵素リパーゼ、有機酸基質、及び反応溶媒類の入手を試みた。

次に単離 AN 類及び配糖体類をアルコール基質とし、Ar/Al 類及びそのエステル類などの有機酸基質とリパーゼ類を用いて小スケールでのアシル化反応の最適条件検討、及び大スケールでの Ar/Al-AAN 類の調製を試みた。

(3) 平成 23 年度は、リパーゼ触媒アシル化の研究結果で、(アルコール基質) - (ビニルエステル) - (Novozym®435) - (シクロヘキサノ) が最適反応の組み合わせと判明したものの、C3G を含むフラボノイド配糖体類はほとんど反応しなかった。そこで、この原因の解明と AN 類アシル化の改善を行うために、最適酵素の種類などを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成 21 年度 :

市販の紫トウモロコシ色素製剤を入手し、主要成分である C3G をカラムクロマトグラフィーなどを用いて大量単離精製・調製した。また、単離色素の HPLC 分析, UV-Vis 測定, 及び ESI/TOFMS による組成式, フラガメンテーションによるアグリコンを、標準 C3G との比較した結果、C3G と確認できた。最終的に純度 90% 以上の C3G のトリフルオロ酢酸塩が約 3 g 得られた (表 2)。

表 2. 単離アントシアニンの構造確認

AN	収量	[M+H] <sup>+</sup> m/z	組成式	アグリコン	アシル化度
C3G.TFA	3 g	449	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	Cy <sup>+</sup>	非アシル
YGM-2.TFA	0.5 g	935	C <sub>42</sub> H <sub>49</sub> O <sub>24</sub> <sup>+</sup>	Cy <sup>+</sup>	モノアシル
YGM-5b.TFA	1 g	949	C <sub>43</sub> H <sub>49</sub> O <sub>24</sub> <sup>+</sup>	Pn <sup>+</sup>	モノアシル
YGM-6.TFA	0.3 g	1125	C <sub>53</sub> H <sub>57</sub> O <sub>27</sub> <sup>+</sup>	Pn <sup>+</sup>	ジアシル
シソニン	1 g	757	C <sub>36</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub> <sup>+</sup>	Cy <sup>+</sup>	モノアシル
Pn3S5G.TFA	0.5 g	787	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> O <sub>21</sub> <sup>+</sup>	Pn <sup>+</sup>	非アシル

\* Cy: シアニン, Pn: ペオニン, G: グルコース, S: ソホロース, YGM-2: シアニン 3-カフェオイルソホロシド-5-グルコシド, YGM-5b: ペオニン 3-カフェオイルソホロシド-5-グルコシド, YGM-6: ペオニン 3-カフェオイルフェルロイルソホロシド-5-グルコシド, シソニン: シアニン 3-p-クマロイルグルコシド-5-グルコシド, Pn3S5G: ペオニン 3-ソホロシド-5-グルコシド

同様に、市販の紫甘しょ品種“アヤマサキ”より得た粗抽出色素からアシル化 AN 類の YGM-2 (約 0.5 g), YGM-5b (約 1 g), YGM-6 (約 0.3 g) を、また、市販の紫ソ葉よりシソニンを約 1 g 得ることができた。さらに、紫甘しょ粗抽出色素のアルカリ加水分解物より、ペオニン 3-ソホロシド-5-グルコシドを約 0.5 g 得ることができた。これらの 5 種類の単離 AN についても C3G と同様の手法で構造の確認ができた (表 2)。

##### (2) 平成 22 年度 :

単離アントシアニン 6 種類以外のアルコール基質として、アスコルビン酸や関連配糖体 (アルブチン, ナリキニン, イソケルシトリンなど) 10 種類を、酵素として Novozym® 435 などの固定化型リパーゼ類やリパーゼ PL などの遊離型リパーゼ類の 10 種類を、有機酸基質として、遊離型 (カフェ酸やパルミチン酸など) やエステル型 (安息香酸メチルやケイ皮酸ビニルなど) の 15 種類を、反応溶媒として、n-ヘキサノ, シクロヘキサノ, 2-メチル-2-プロパノール, ジメチルスルホキシドなど 12 種類を入手できた。

次に、リパーゼ触媒アシル化の最適反応条件を

検討した (表 3~5)。すなわち、基本的には (アルコール基質 0.1 mmol) - (有機酸基質 0.1 mmol) - (溶媒 (系) 0.5 mL) - (Novozym®435 25 mg) - (40°C) の組み合わせでアシル化反応の最適条件を検討した。溶媒はモレキュラーシブス 4 A 1/16 で 1 日以上乾燥したものをを用いた。その結果、

1) 反応溶媒としては、表 3 のように第 3 アルコール類, ケトン類, 及び非水溶媒類は不適であったが、シクロヘキサノのみが適していた。

表 3. 最適反応溶媒の検討結果

No.	アルコール 基質	有機酸 基質	溶媒	目的生 成物	反応性
1	Glc	Bz	MeCN	Glc-Bz	×
2	Glc	Bz	THF	Glc-Bz	×
3	Glc	Bz	t-BuOH	Glc-Bz	×
4	Glc	Bz	t-AmOH	Glc-Bz	×
5	Glc	Bz	Actn	Glc-Bz	×
6	Glc	Bz	cPtn	Glc-Bz	×
7	Glc	Bz	cHxn	Glc-Bz	×
8	Glc	Bz	2Ptn	Glc-Bz	×
9	Glc	Bz	3Ptn	Glc-Bz	×
10	Glc	Bz	2Hxn	Glc-Bz	×
11	Glc	Bz	DMF	Glc-Bz	×
12	Glc	Bz	DMSO	Glc-Bz	×
13	Asc	Bz	MeCN	Asc-Bz	×
14	Asc	Bz	THF	Asc-Bz	×
15	Asc	Bz	t-BuOH	Asc-Bz	×
16	Asc	Bz	t-AmOH	Asc-Bz	×
17	Asc	Bz	Actn	Asc-Bz	×
18	Asc	Bz	cPtn	Asc-Bz	×
19	Asc	Bz	cHxn	Asc-Bz	○
20	Asc	Bz	2Ptn	Asc-Bz	×
21	Asc	Bz	3Ptn	Asc-Bz	×
22	Asc	Bz	2Hxn	Asc-Bz	×
23	Asc	Bz	DMF	Asc-Bz	×
24	Asc	Bz	DMSO	Asc-Bz	×

\* Glc: D-グルコース, Asc: L-アスコルビン酸, MeCN: アセトニトリル, THF: テトラヒドロフラン, t-BuOH: 2-メチル-2-プロパノール, t-AmOH: 2-メチル-2-ブタノール, Actn: アセチン, cPtn: シクロペンタニン, cHxn: シクロヘキサノ, 2Ptn: 2-ペンタニン, 3Ptn: 3-ペンタニン, 2Hxn: 2-ヘキサノ, DMF: ジメチルホルムアミド, DMSO: ジメチルスルホキシド, ×: 反応せず, ○: 反応した。

2) 有機酸基質としては、表 4 のように遊離の酸よりエステル体の反応性が高く、メチルエステルよりビニルエステル (安息香酸ビニル, ケイ皮酸ビニル, オクタン酸ビニルなど) のほうが高かった。すなわち、有機酸基質はカルボニル基がエステル (特に、ビニルエステル) として活性化していることが必要であると考えられた。

3) アルコール基質としては、表 5 のように (ケイ皮酸ビニル) - (シクロヘキサノ) - (Novozym®435) 系で検討した結果、反応性はアルブチン, ナリキニン > アスコルビン酸, D-グルコース > C3G 及び関連フラボノイド配糖体であった。

表 4. 最適有機酸基質の検討結果

No.	基質	有機酸基質	溶媒	目的生成物	反応性
1	Glc	pHBz	cHxn	Glc-pHBz	×
2	Glc	Cn	cHxn	Glc-Cn	×
3	Glc	pC	cHxn	Glc-pC	×
4	Glc	Cf	cHxn	Glc-Cf	×
5	Glc	mBz	cHxn	Glc-Cn	×
6	Glc	mCn	cHxn	Glc-Cf	×
7	Glc	mCf	cHxn	Glc-Oct	×
8	Glc	vBz	cHxn	Glc-Bz	○
9	Glc	vCn	cHxn	Glc-Cn	○
10	Glc	eHex	cHxn	Glc-Hex	×
11	Glc	Oct	cHxn	Glc-Oct	×
12	Glc	Hex	cHxn	Glc-Hex	×
13	Glc	mOct	cHxn	Glc-Oct	×
14	Glc	vOct	cHxn	Glc-Oct	×
15	Asc	pHBz	cHxn	Asc-pHBz	×
16	Asc	Cn	cHxn	Asc-Cn	×
17	Asc	pC	cHxn	Asc-pC	×
18	Asc	Cf	cHxn	Asc-Cf	×
19	Asc	mBz	cHxn	Asc-Cn	○
20	Asc	mCn	cHxn	Asc-Cf	△
21	Asc	mCf	cHxn	Asc-Oct	×
22	Asc	vBz	cHxn	Asc-Bz	◎
23	Asc	vCn	cHxn	Asc-Cn	◎
24	Asc	Hex	cHxn	Asc-Hex	×
25	Asc	Oct	cHxn	Asc-Oct	×
26	Asc	eHex	cHxn	Asc-Hex	△
27	Asc	mOct	cHxn	Asc-Oct	△
28	Asc	vOct	cHxn	Asc-Oct	◎

\* Glc: D-グルコース, Asc: L-アスコルビン酸, pHBz: p-ヒドロキシ安息香酸, Cn: ケイ皮酸, pC: p-クマル酸, Cf: カフェ酸, mBz: 安息香酸メチル, mCn: ケイ皮酸メチル, mCf: カフェ酸メチル, vBz: 安息香酸ビニル, vCn: ケイ皮酸ビニル, eHex: ヘキサン酸エチル, Oct: オクタン酸, Hex: ヘキサン酸, mOct: オクタン酸メチル, vOct: オクタン酸ビニル, cHxn: シクロヘキサノール, ×: 反応せず, △: わずかに反応した, ○: 反応した, ◎: 良く反応した。

このように、Novozym®435 を用いた本反応系では溶媒がシクロヘキサノールに限られたが、モノフェノールモノグリコシドであるアルブチンやサリシンが最も反応性が高く、次に単純な構造のアスコルビン酸やD-グルコースである、などの構造-反応性相関が判明した。しかし、C3G 及び関連フラボノイド配糖体では未反応であることがわかった。

(3) 平成 23 年度 :

まず、最適酵素の検討のため (C3G) - (ビニルエステル) - (シクロヘキサノール) - (40℃) の組合せ反応系で、Novozym®435 以外の各種リパーゼによる反応を検討した。

次に、最適反応系で反応性が高かった基質アルブチンとサリシンおよび vCn と vOct を用いて大スケールでのアシル化を行った。

さらに、C3G のアシル化の可能性を検討するため、化学的アシル化反応を試みた。また、大スケール調製後、単離、MS、NMR による構造解析を行った。その結果、

1) 最適酵素の検討では表 6 のように、用いた 5 種の酵素はいずれも反応しなかった。

表 5. 最適アルコール基質の検討結果

No.	アルコール基質	有機酸基質	溶媒 (系)	目的生成物	反応性
1	Arb	vBz	cHxn	Arb-Bz	○
2	Arb	vCn	cHxn	Arb-Cn	◎
3	Arb	vOct	cHxn	Arb-Oct	◎
4	Sal	vBz	cHxn	Sal-Bz	○
5	Sal	vCn	cHxn	Sal-Cn	◎
6	Sal	vOct	cHxn	Sal-Oct	◎
7	Esc	vBz	cHxn	Esc-Bz	×
8	Esc	vCn	cHxn	Esc-Cn	×
9	Esc	vOct	cHxn	Esc-Oct	×
10	CmA	vBz	cHxn	CmA-Bz	×
11	CmA	vCn	cHxn	CmA-Cn	×
12	CmA	vOct	cHxn	CmA-Oct	×
13	Nhes	vBz	cHxn	Nhes-Bz	×
14	Nhes	vCn	cHxn	Nhes-Cn	×
15	Nhes	vOct	cHxn	Nhes-Oct	×
16	Hes	vBz	cHxn	Hes-Bz	×
17	Hes	vCn	cHxn	Hes-Cn	×
18	Hes	vOct	cHxn	Hes-Oct	×
19	Nar	vBz	cHxn	Nar-Bz	×
20	Nar	vCn	cHxn	Nar-Cn	×
21	Nar	vOct	cHxn	Nar-Oct	×
22	Iqu	vBz	cHxn	Iqu-Bz	×
23	Iqu	vCn	cHxn	Iqu-Cn	×
24	Iqu	vOct	cHxn	Iqu-Oct	×
25	C3G	vBz	cHxn	C3G-Bz	×
26	C3G	vCn	cHxn	C3G-Cn	×
27	C3G	vOct	cHxn	C3G-Oct	×
28	C3G	vCn	DC	C3G-Cn	×
29	C3G	vOct	DC	C3G-Oct	×
30	YGM-5b	vBz	cHxn	YGM-5b-Bz	×
31	YGM-5b	vCn	cHxn	YGM-5b-Cn	×
32	YGM-5b	vOct	cHxn	YGM-5b-Oct	×
33	Pn3S5G	vBz	cHxn	Pn3S5G-Bz	×
34	Pn3S5G	vCn	cHxn	Pn3S5G-Cn	×
35	Pn3S5G	vOct	cHxn	Pn3S5G-Oct	×

\* Arb: アルブチン, Sal: サリシン, Esc: エスクリン, CmA: カルミン酸, Nhes: ネオヘスペリンジヒドロカルボン, Hes: ヘスペリンジ, Nar: ナリンギン, Iqu: イノケルシトリン, C3G: シアニジン 3-グルコシド, YGM-5b: ヘオニジン 3-カフェオイルツホロシド-5-グルコシド, Pn3S5G: ヘオニジン 3-ツホロシド-5-グルコシド, vBz: 安息香酸ビニル, vCn: ケイ皮酸ビニル, vOct: オクタン酸ビニル, cHxn: シクロヘキサノール, DC: DMF:cHxn=1:1 (混合溶媒), ×: 反応せず, △: わずかに反応した, ○: 反応した, ◎: 良く反応した。

表 6. C3G アシル化のための最適酵素検討結果

No.	酵素	有機酸基質 (倍 mol)	溶媒 (系)	推定生成物	アシル化
1	RM IM	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
2	TL IM	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
3	PL	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
4	QLM	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
5	TL	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
6	QLM	vCn(1)	DC	C3G-Cn	×
7	PL	vCn(3)	DMF	C3G-Cn	×
8	L435	vOct(3)	DMF	C3G-Oct	×
9	TL IM	vOct(3)	DMF	C3G-Oct	×
10	PL	vOct(3)	DMF	C3G-Oct	×
11	L435	vOct(3)	DC	C3G-Oct	×
12	TL IM	vOct(3)	DC	C3G-Oct	×
13	PL	vOct(3)	DC	C3G-Oct	×

\* RMIM: Lipozyme® RM IM, TL IM: Lipozyme® TL IM, PL: リパーゼ PL, QLM: リパーゼ QLM, TL: リパーゼ TL, L435: Lipozyme® 435, C3G: シアニジン 3-グルコシド, vCn: ケイ皮酸ビニル, vOct: オクタン酸ビニル, DMF: ジメチルホルムアミド, cHxn: シクロヘキサノール, DC: DMF:cHxn=1:1 (混合溶媒), ×: 反応せず。

2) アルブチンとサリシンの大スケールのアシル化は、表 7 のように、速やかに起こった。アシル化体の単離は HPLC 分取を用いて比較的容易に達成された。また、4 種の単離アシル化体 (Arb-Cn, Arb-Oct, Sal-Cn, Sal-Oct) の分子量測定の結果、いずれも目的のモノアシル化体であった (表 8)。

表 7. フェノール配糖体の大スケールアシル化検討結果

No.	アルコール基質	有機酸酸基質	反応時間	生成物*	収量(g)	収率(%)
1	Arb	vCn	6 日	Arb-Cn	0.25	31
2	Arb	vOct	1 日	Arb-Oct	0.45	56
3	Sal	vCn	5 日	Sal-Cn	0.21	25
4	Sal	vOct	1 日	Sal-Oct	0.30	37

\*外観はいずれも無色結晶性粉末

表 8. アシル化反応生成物の分子量

No.	生成物	ESI/TOFMS [M-H] <sup>+</sup> m/z	分子量 (測定)	分子式* (計算)	分子量* (計算)
1	Arb-Cn	401	402	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	402.39
2	Arb-Oct	397	398	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	398.48
3	Sal-Cn	415	416	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	416.42
4	Sal-Oct	411	412	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	412.47

\*いずれもモノアシル体である。

表 9. C3G の化学的アシル化法の検討結果

No.	アルコール基質	アシル化剤	目的生成物	反応性
<脂肪族酸クロリド>				
1	C3G	AcCl	C3G-Ace	◎
2	C3G	ProCl	C3G-Pro	◎
3	C3G	ButCl	C3G-But	◎
4	C3G	ValCl	C3G-Val	◎
5	C3G	HexCl	C3G-Hex	◎
6	C3G	OctCl	C3G-Oct	◎
7	C3G	NonCl	C3G-Non	◎
8	C3G	DecCl	C3G-Dec	◎
9	C3G	DodCl	C3G-Dod	◎
10	C3G	PalCl	C3G-Pal	◎
11	C3G	SteCl	C3G-Ste	△
12	C3G	PhnCl	C3G-Phn	○
13	C3G	PhpCl	C3G-Php	○
14	C3G	ZCl	C3G-Z	×
15	C3G	BnCl	C3G-Bn	×
16	Pn3S5G	HexCl	Pn3S5G-Hex	△
17	YGM-5b	HexCl	YGM-5b-Hex	○
18	YGM-6	HexCl	YGM-6-Hex	○
<芳香族酸クロリド>				
19	C3G	BzCl	C3G-Bz	×
20	C3G	CnCl	C3G-Cn	×
<スルホン酸クロリド>				
21	C3G	MsCl	C3G-Ms	×
22	C3G	BnsCl	C3G-Bns	×
23	C3G	TsCl	C3G-Ts	×

\* C3G: シアエニン 3-グルコシド, Pn3S5G: ペオニン 3-ソホロシド-5-グルコシド, YGM-5b: ペオニン 3-カフェオイルソホロシド-5-グルコシド, YGM-6: ペオニン 3-カフェオイルフェロイソソホロシド-5-グルコシド, AcCl: アセチルクロリド, ProCl: プロピオニルクロリド, ButCl: n-ブチルクロリド, ValCl: バレロイルクロリド, HexCl: ヘキサノイルクロリド, OctCl: オクタノイルクロリド, NonCl: ノノノイルクロリド, DecCl: デカノイルクロリド, DodCl: ドデカノイルクロリド, PalCl: パルミトイルクロリド, SteCl: ステアロイルクロリド, PhnCl: フェナセチルクロリド, PhpCl: フェルプロピオニルクロリド, ZCl: Z-クロリド, BzCl: ベンゾイルクロリド, CnCl: シンナモイルクロリド, MsCl: メタンスルホニルクロリド, BnsCl: ベンジルスルホニルクロリド, TsCl: p-トルエンスルホニルクロリド, ×: 反応せず, △: わずかに反応した, ○: 反応した, ◎: 良く反応した。

3) C3G の化学的アシル化反応において、C3G と酸クロリド類を反応させた結果、表 9 のように脂肪 (族) 酸クロリド類のみに速やかな反応が起こった。しかし、芳香族酸クロリド類やスルホン酸クロリド類などのアシル化剤は反応が起らなかった。

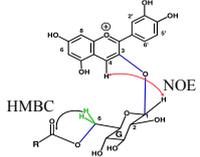
また、5 種類の脂肪酸クロリド類を用いて、大スケールで反応させ、HPLC 単離後、ESI/FTMS (表 10) 及び各種 NMR (表 11) 測定による構造解析の結果、脂肪酸アシル化 C3G 体はいずれも目的の脂肪酸が C3G のグルコース 6-位 OH 基にアシル化したモノアシル化体であった。

表 10. 化学合成した脂肪酸アシル化 C3G の分子式

No.	アシル化剤	生成物	ESI/FTMS [M-H] <sup>+</sup> m/z	分子イオン	分子式	収率* (%)
1	AcCl	C3G-Ace	491.1187	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> Cl	20
2	ButCl	C3G-But	519.1498	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> Cl	22
3	HexCl	C3G-Hex	547.1811	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub> Cl	31
4	OctCl	C3G-Oct	575.2124	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>12</sub> Cl	25
5	DecCl	C3G-Dec	603.2436	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> O <sub>12</sub> Cl	25
6	DodCl	C3G-Dod	631.2748	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> O <sub>12</sub> Cl	33

\*収率は HPLC のピーク面積%から求めた。

表 11. 脂肪酸アシル化 C3G の NMR データ



No.	アシル化 C3G	グルコース-1 プロトン		グルコース-6 プロトン		
		位置 (ppm)	NOE 相手	位置 (ppm)	HMBC 相手	低磁場シフト
1	C3G-Ace	5.37	H-4	4.40, 4.00	C=O	有り
2	C3G-But	5.39	H-4	4.37, 4.03	C=O	有り
3	C3G-Hex	5.40	H-4	4.34, 4.05	C=O	有り
4	C3G-Oct	5.40	H-4	4.34, 4.05	C=O	有り
5	C3G-Dec	5.39	H-4	4.34, 4.05	C=O	有り
6	C3G-Dod	5.39	H-4	4.34, 4.05	C=O	有り

以上の検討より、アルコール基質に最適の反応系においても、また他のリパーゼ類を用いた場合でも、C3G を含むフラボノイド配糖体は反応性が悪く、結果的に目的の C3G のアシル体の調製まで至らなかった。

一方で、C3G などの AN 類は化学的に脂肪酸アシル化されたことにより、原理的に AN 類のアシル化は可能であることが示された。

#### (4) 全体的な結果と考察

リパーゼ触媒アシル化によるアントシアニン色素の高機能化を目指して、アシル化反応を中心に検討した結果、次の様になった。

- 1) (アルコール基質) - (有機酸基質) - (溶媒(系)) - (Novozym®435) - (40°C) 系でのリパーゼ触媒アシル化反応では、反応溶媒をシクロヘキサノン、有機酸基質がビニルエステル類の組み合わせが最適であった。
- 2) (アルコール基質 0.1 mmol) - (ケイ皮酸ビニル 0.1 mmol) - (シクロヘキサノン 0.5 mL) - (Novozym®435 25 mg) - (40°C) 系で最適アルコール基質検討した結果、反応性はアルブチン、サリシン>アスコルビン酸、グルコース>アントシアニン類を含めたフラボノイド配糖体であった。モノフェノールモノグルコシド構造であるアルブチンやサリシンが最も反応性が高く、次に単純なポリアルコール構造のアスコルビン酸やグルコースであるという構造-反応性相関が判明した。
- 3) 目的のシアニジン3-グルコシド（及び関連アントシアニン類やフラボノイド配糖体）は最適反応条件下において、用いた全てのリパーゼで反応しなかった。ただし、シアニジン3-グルコシドは化学的に脂肪酸クロリドによりアシル化されることが示された。

今後、アントシアニン（フラボノイド）類によるリパーゼ阻害の有無やアルコール基質の構造的な違いによる酵素リパーゼの特異性の差などを検討する必要があると考えられる。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

寺原 典彦 (TERAHARA NORIHIKO)

南九州大学・健康栄養学部食品健康学科・教授

研究者番号：60155471