

称号及び氏名 博士(農学) 土山 守安

学位授与の日付 平成19年9月30日

論文名 「桂皮酸類の水溶性エステル誘導体の酵素合成法に関する研究」

論文審査委員
主査 林 英雄
副査 笠井 尚哉
副査 川口 剛司
副査 阪本 龍司

論文要旨

小麦フスマは、小麦から小麦粉を生産する過程で副生される農産バイオマス資源であり、日本では年間 621 万トンの小麦が挽細され、約 130 万トンの小麦フスマが副生されている (2005 年)。小麦粉は、パンや麺、菓子などの原料として利用されており、我々の食生活に欠かすことのできない原材料として位置づけられているが、小麦フスマは家畜の飼料やしいたけの菌床など比較的安価な利用にとどまっているのが現状であり、一部は廃棄処分さえ行われている。農産物加工業においては、目的生産物と同様に、副生物の有効利用が重要な課題として挙げられているが、小麦粉製造業界においては、副生物であるフスマの高度利用が進んでおらず、その高付加価値化技術の確立が期待されている。

小麦フスマ中には機能性成分として、フラボノイド類やカロチノイド類などが含まれているが、フェルラ酸などの桂皮酸類の含有量が多いことが特徴である。桂皮酸類は抗酸化作用や紫外線吸収作用などを有する多機能物質であり、産業利用が期待されている。しかし、水および油への溶解度が低いために一部の食品添加物や化粧品原料としての利用にとどまっているのが現状であり、桂皮酸エステルの合成方法の確立が必要とされている。一般に酵素的なエステル合成はリパーゼやエステラーゼを用いたエステル縮合反応あるいはエステル交換反応により行われる。産業利用においては、基質となる物質の調整のし易さや反応工程の簡便性からエステル交換反応でなく、エステル縮合反応によるエステル化が好まれる。これまでフェルラ酸エステルの合成研究はエステル交換反応による例が多く、エステル縮合反応を用いた水溶性を高める研究報告がない。そこで本研究では、酵素的なエステル縮合反応による水溶性桂皮酸エステルの合成を目的とした。

第 1 章 フェルラ酸とグリセロールのエステル化を触媒する酵素のスクリーニングと精製およびフェルラ酸グリセロールエステルの酵素合成

フェルラ酸とグリセロールのエステル縮合反応を触媒する酵素のスクリーニングを行った。加工助剤として安全性が担保されている食品産業用酵素製剤（リパーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ等）を対象として、スクリーニングを行った結果、*Aspergillus niger*の培養上澄調製品であるペクチナーゼPL “アマノ” にその活性を見出した。本製剤中には複数の酵素が含まれていることから、ペクチナーゼPL “アマノ” から本反応を触媒する酵素を精製した。各種クロマトグラフィーによる精製過程を経て、最終的に分子量 36 kDaの電気泳動的に単一なタンパク質標品を得ることに成功した。本酵素は、N末端アミノ酸配列および各種桂皮酸類に対する基質特異性の結果より、*A. niger*が生産するAタイプのフェルラ酸エステラーゼ(FAEA-PL)であることが判明した。FAEA-PLによるフェルラ酸エステル合成において、フェルラ酸のアクセプターとなるポリオールの特異性を検討した結果、グリセロールを用いた場合に最も強い触媒能を示した。FAEA-PLによるフェルラ酸グリセロールエステル合成の最適化条件を検討した結果、グリセロール 85%、フェルラ酸 1%、DMSO 5%、pH 4.0、反応温度 50°Cの条件で、約 80%のフェルラ酸をフェルラ酸グリセロールエステルに変換する反応系を構築した。次に反応産物の構造決定を行うために大容量で酵素反応を行い、生成産物を酢酸エチル抽出し、シリカゲルカラムにて分離精製した。その結果、フェルラ酸 250 mgから約 230 mgのフェルラ酸グリセロールエステルを得た。¹H-,¹³C-NMR解析により、本化合物は 1-フェルロイルグリセロールであると構造決定した。本反応によるフェルラ酸グリセロールエステルの生成は約 90%が 1-フェルロイルグリセロールであったことから、本酵素は高い選択性をもってグリセロールの 1 位の水酸基にフェルラ酸をエステル化していることが示唆された。酵素のエステル縮合能を利用した水溶性フェルラ酸エステルの合成研究は初めての研究例である。

第 2 章 FAEA-PL を用いた各種桂皮酸エステルの酵素合成

FAEA-PLのエステル縮合能を利用して種々の桂皮酸エステルを酵素合成し、それらの構造解析を行い、機能性を評価した。まず、フェルラ酸と同様の手法を用いてシナピン酸および *p*-クマリン酸のグリセロールエステルを合成、単離し、構造解析を行った結果、新規物質である 1-シナポイルグリセロールと既知物質である 1-*p*-クマロイルグリセロールであると同定した。3種の桂皮酸（フェルラ酸、シナピン酸、*p*-クマリン酸）グリセロールエステルの水に対する溶解度を測定した結果、エステル体は元の桂皮酸に比べ、溶解度は 5～11 倍に上昇していることが判明した。また、DPPH ラジカル捕捉能および紫外線吸収能においては、桂皮酸グリセロールエステルは元の桂皮酸と同程度の能力を保持していた。

次に、桂皮酸エステルのさらなる水溶性の向上を目的として、FAEA-PLを用いてフェルラ酸ジグリセロールエステルを合成した。ジグリセロールを基質とした場合には 3種のフェルラ酸エステル異性体の生成が認められた。この中で主要な 2種の異性体を単離し、NMR解析によって構造決定した。その結果、I型およびT型のジグリセロールの末端の水酸基とフェルラ酸がエステル結合したモノフェルラ酸ジグリセロールエステルであることが判明した。得られたフェルラ酸ジグリセロールエステルは、グリセロール様の粘状物質であり、少量の水にも瞬時に溶解する極めて水溶性の高い物質であることが判明した。

また、酵素のエステル縮合能を利用したフェルラ酸シュガーエステルの合成研究の報告がないことから、本酵素のエステル縮合能によるフェルラ酸グルコースエステルの合成を試みた。アクセプター溶液としてグルコースの過飽和溶液を用いた場合、約 20%のフェルラ酸をフェルラ酸グルコースエステルに変換することができた。生成したエステル体は、NMR による解析の結果、6-フェルロイルグルコースであると構造決定した。

第 3 章 フェルラ酸オリゴ糖エステルの酵素合成

水溶性フェルラ酸エステルのさらなる機能性向上を目指し、本章ではフェルラ酸オリゴ糖エステルの酵素合成を行った。FAEA-PLによるフェルラ酸エステル合成において、オリゴ糖はアクセプターとして機能しなかったが、ペクチナーゼPL “アマノ” には、フェルラ酸とトレハロースをエステル化する触媒能が認められたことから、本酵素中にはFAEA-PL以外のフェルラ酸エステラーゼの存在が示唆された。そこでペクチナーゼPL “アマノ” から第 2 のフェルラ酸エステラーゼを精製した。各種クロマトグラフィーの結果、分子量 240 kDa (ゲルろ過) のタンパク質を回収した。本タンパク質は、桂皮酸類に対する基質特異性の結果より、*A. niger*が生産するBタイプのフェルラ酸エステラーゼ (FAEB-PL)であることが判明した。FAEA-PLおよびFAEB-PLを用いたフェルラ酸エステル合成のアクセプター特異性を検討した結果、FAEA-PLは単糖類やグリセロールを、FAEB-PLは単糖類やオリゴ糖をアクセプターとすることができた。そこで、FAEB-PLを用いたフェルラ酸エステル合成のアクセプターとして、機能性オリゴ糖であるトレハロースを選定し、フェルラ酸トレハロースエステルの合成を試みた。トレハロースの過飽和溶液を反応に用いた酵素反応にて、フェルラ酸の約 18%がフェルラ酸トレハロースエステルに変換された。生成したエステル体を単離し、構造を¹³C-NMRにより解析した結果、6-フェルロイルトレハロースと決定した。本研究では、収率は低いもののフェルラ酸オリゴ糖エステルの酵素合成に初めて成功した。

本研究では、桂皮酸類の水溶性エステル誘導体の酵素合成法の確立を目的として、食品産業用酵素製剤であるペクチナーゼ PL “アマノ” から 2 種のフェルラ酸エステラーゼ (FAEA-PL、FAEB-PL) を回収した。FAEA-PLにより桂皮酸類とグリセロールおよび単糖類のエステル化が、FAEB-PLによりフェルラ酸とオリゴ糖のエステル化が可能であることが判明し、両酵素を用いて各種エステル体を合成し、その構造を決定した。水溶性桂皮酸エステル誘導体の機能性については今後の研究が待たれることとなるが、その酵素的な合成法の役割は大きいものと考えられる。

審査結果の要旨

小麦フスマは高度利用が進んでいない農産バイオマス資源であり、その高付加価値化技術の確立が期待されている。小麦フスマ中には、種々の機能性成分が含まれており、抗酸化作用や紫外線吸収作用を有するとして知られているフェルラ酸などの桂皮酸類

の含有量が多いことが特徴である。しかし、桂皮酸類は水および油への溶解度が低いために一部の食品添加物や化粧品原料としての利用にとどまっていることから、その水溶性あるいは脂溶性エステル誘導体の合成研究に注目が集まっている。この中で、酵素的な脂溶性桂皮酸エステル誘導体の合成例は比較的多く報告されているものの、酵素のエステル縮合能を利用した水溶性エステル誘導体の合成例の報告はない。そこで本研究においては、水溶性桂皮酸エステル誘導体の酵素合成法の確立に取り組んだ。その結果、2種のフェルラ酸エステラーゼ (EC 3. 1. 1. 73) のエステル縮合能によって種々の桂皮酸グリセロールエステルおよびフェルラ酸シュガーエステルの酵素合成に成功している。また、研究から得られた結果に対して酵素学的な視点から考察を加えている。

第1章では、フェルラ酸とグリセロールのエステル化を検討し、その結果を示している。フェルラ酸とグリセロールのエステル縮合反応を触媒する酵素を、ペクチナーゼやセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ製剤等の食品産業用酵素製剤からスクリーニングし、*A. niger*由来の培養上澄調製品であるペクチナーゼ PL「アマノ」にその活性を見出した。本反応を触媒する酵素を精製するために、ペクチナーゼ PL「アマノ」を各種クロマトグラフィーに供し、分子量 36 kDa の電気泳動的に単一なフェルラ酸エステラーゼ (FAEA-PL) を回収した。FAEA-PL によるフェルラ酸エステル合成のアクセプター特異性を検討したところ、グリセロールを用いたときに最も強い触媒能を示した。フェルラ酸グリセロールエステル合成の最適化条件を検討し、グリセロール 85%、フェルラ酸 1%、DMSO 5%、pH 4.0、反応温度 50°C の条件で、約 80% の収率でフェルラ酸をフェルラ酸グリセロールエステルに変換する反応系を構築した。フェルラ酸グリセロールエステルはシリカゲルカラムにて精製され、NMR スペクトル解析によりその構造が 1-フェルロイルグリセロールであると決定された。

第2章では、第1章にて精製した FAEA-PL のエステル縮合能を利用した各種桂皮酸エステル誘導体の合成結果を示している。フェルラ酸と同様にシナピン酸および *p*-クマリン酸についてもグリセリルエステル化を行い、1-シナポイルグリセロールと 1-*p*-クマロイルグリセロールを単離した。得られた3種の桂皮酸グリセロールエステルの水への溶解度は元の桂皮酸の約 5~11 倍高く、DPPH ラジカル捕捉能および紫外線吸収特性は保持されていた。また、桂皮酸エステルの更なる水溶性を上げることを目的として、フェルラ酸とジグリセロールのエステル体の合成を試みた。酵素反応では、少なくとも3種のフェルラ酸ジグリセロールエステルが生成されることが確認され、その中から主要な2種のフェルラ酸ジグリセロールエステルの構造を決定した。得られたエステル体は約 90% のシラップ状物質であり、極めて水溶性が高い化合物であった。さらに、フェルラ酸シュガーエステルの合成を試み、収率は約 20% にとどまるものの、フェルラ酸グルコースエステルの酵素合成に成功した。得られたエステル体は NMR スペクトル解析に

よって、6-フェルロイルグルコースであると決定された。

第3章では、フェルラ酸オリゴ糖エステルの酵素合成を目的とし、その研究結果を示している。ペクチナーゼ PL「アマノ」に含まれる第2のフェルラ酸エステラーゼ (FAEB-PL) を各種クロマトグラフィーにより精製し、本酵素を桂皮酸類に対する基質特異性から B タイプのフェルラ酸エステラーゼであると同定した。FAEA-PL と FAEB-PL によるフェルラ酸エステル合成のアクセプター特異性を検討し、FAEA-PL はグリセロールと単糖類に、FAEB-PL は単糖類とオリゴ糖類に高活性を示すことを明らかにした。フェルラ酸エステラーゼのエステル縮合能のアクセプター特異性からの視点は、フェルラ酸エステラーゼ研究の新たな論点を提案している。FAEB-PL によるフェルラ酸オリゴ糖エステル合成のアクセプターとしてトレハロースを選定し、フェルラ酸トレハロースエステルの合成を試みた。その結果、収率 18% でフェルラ酸トレハロースエステルが生成された。得られたエステル体を NMR スペクトル解析によって分析した結果、6-フェルロイルトレハロースと構造決定した。

本研究の成果は、フェルラ酸エステラーゼによる水溶性桂皮酸エステル誘導体の合成系を確立したことである。このことは、応用微生物学、応用酵素学、生体触媒化学の発展に貢献するとともに、小麦フスマなどの農産バイオマス資源の高付加価値化技術の確立の端緒となりうる成果である。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果とあわせて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。