

平成16年度

# 香辛料成分の有用生理機能の高機能化とさらなる有効利用のための酵素的分子設計

中 島 伸 佳

(岡山県立大学大学院保健福祉学研究科助教授)

## 1. はじめに

香辛料成分であるカプサイシン(トウガラシ)やクルクミン(ウコン)などを始めとして、カルバクロール,チモール(タイム),ペリルアルコール(シソ),ラズベリーケトン(キイチゴ),バニリルアルコールなどのポリフェノール,テルペン関連物質などの天然由来の生薬成分や食品機能性物質の多くは,古くから人類の食生活と密接な関係を有する化合物であり,特に近年,食生活の多様化や自然環境の変化に伴って,これらの成分による抗菌・抗ウイルス作用,抗酸化性(ラジカル消去能),制癌作用などが注目されるに至っている。

そこで,本研究では,香辛料成分の生体内での新たな薬理作用に着目し,「食品の二次機能」を期待するのみにとどまらず,これまでに研究を重ねてきた「植物培養細胞による配糖化」や「酵素的配糖化法」を応用して,「水への溶解度の上昇,光や熱に対する安定性の増大,生理機能の向上化」等に基づく食品機能素材としての新規な薬理効果を探求する。すなわち,安全で効率的な生体触媒による配糖化法の確立を通して,これら香辛料成分の加工食品へのさらなる使用範囲の拡大を可能にすることを主目的とする。ここでは,特にウコン成分クルクミンに着目することにした。

ショウガ科植物ウコン(*Curcuma longa*)は,インド原産でインドネシア,中国,日本では沖縄などの熱帯地域で栽培されており,インドでは食

品,生薬として豊富に取り入れられてる。クルクミンはウコンの根茎に含まれる黄色色素成分の一つで,肝機能の向上,抗腫瘍作用,抗炎症作用,抗酸化作用,抗癌作用などの生理機能が認められている<sup>1)</sup>。また,アルツハイマー痴呆を予防するという報告もあり<sup>2)</sup>,現在,健康食品として汎用されるだけでなく,医薬としても注目されている。しかし,クルクミンは水溶性が低く,その使用範囲が制限されているのが現状である。そこで,本研究では,クルクミンの高機能化,特に,水溶性の向上について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 植物培養細胞によるクルクミンの変換

SH液体培地にニチニチソウ培養細胞20gを移植して1週間前培養を行った。培養後,培地部と細胞部に別し,細胞部を2.5%アルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁させ,50mM塩化カルシウム水溶液に滴下し,ビーズ状の固定化ニチニチソウ培養細胞を得た。

この固定化ニチニチソウ培養細胞を液体培地に移植して3日間振とう培養を行った。培養後,クルクミン(10mg/100 $\mu$ l DMSO)を24時間ごとに5回連続投与し,さらに48時間培養を行った。培養後,培地部と細胞部を別し,培地部は酢酸エチルで抽出し,その後,水層を水飽和 *n*-ブタノールで抽出した。細胞部はホモジナイズした後,メタノールで静置抽出を行い,抽出液は減圧下で濃縮し,濃縮物について,培地部と同様に酢酸エ

チルで抽出した。培地部と細胞部のそれぞれから抽出した有機層を減圧下で濃縮してサンプルとし、逆相HPLC分析、およびLC-MS分析を行った。

## 2.2 CGTaseによるクルクミンオリゴ配糖体の酵素合成

### (1) 可溶性デンプンを糖供与体としたCGTaseによる配糖化<sup>3)</sup>

2.1で得られたクルクミンモノ配糖体を5  $\mu$ mol, 糖供与体として可溶性デンプン600mgおよび塩化カルシウム3mgを50mMクエン酸緩衝液(pH5.5)3mlに懸濁し、さらに、CGTase (*Bacillus mecerans*由来)を600units加え、55℃で24時間攪拌した。80℃で1時間インキュベート(酵素を失活させるため)後、ろ過してサンプルとし、逆相HPLCで分析した。

### (2) シクロデキストリンを糖供与体としたクルクミンオリゴ配糖体の酵素合成

糖供与体として、 $\alpha$ -シクロデキストリン(CD),  $\beta$ -CD, および  $\gamma$ -CDを用いて2.2の(1)と同様な実験を行った。2.1で得られたクルクミンモノ配糖体5  $\mu$ mol, シクロデキストリン0.5  $\mu$ mol, 塩化カルシウム3mgを50mMクエン酸緩衝液(pH5.5)3mlに懸濁し、さらにCGTaseを600units加え、55℃で48時間攪拌した。80℃で1時間インキュベート後、ろ過してサンプルとし、HPLC分析を行った。

## 2.3 加水分解酵素によるクルクミンオリゴ配糖体の分解

### (1) $\alpha$ -アミラーゼによる加水分解

2.2の(2)で酵素合成した、 $\beta$ -CDを糖供与体存在下で反応時間を5分間としたクルクミンオリゴ配糖体の混合物を用いて以下の実験を行った。クルクミンオリゴ配糖体混合物に  $\alpha$ -アミラーゼ (*Bacillus subtilis*) を10units加え、55℃で48時間反応を行った。終了後、80℃で1時間熱処理、ろ過後、逆相HPLCにて分析し、オリゴ配糖体

がどのように加水分解されるかを確認した。

### (2) グルコアミラーゼによる加水分解

2.2の(2)で酵素合成した、 $\beta$ -CDを糖供与体存在下で反応時間を5分間としたクルクミンオリゴ配糖体の混合物を用いて以下の実験を行った。クルクミンオリゴ配糖体混合物にグルコアミラーゼ (*Rhizopus delemar*) を10units加え、50℃で48時間反応を行った。終了後、80℃で1時間加熱処理、ろ過後、逆相HPLCにて分析し、オリゴ配糖体がどのように加水分解されるかを確認した。

### (3) $\beta$ -アミラーゼによる加水分解

2.2の(2)で酵素合成した、 $\beta$ -CDを糖供与体存在下で反応時間を5分間としたクルクミンオリゴ配糖体の混合物を用いて以下の実験を行った。クルクミンオリゴ配糖体混合物に  $\beta$ -アミラーゼ(大豆由来)を10units加え、55℃で48時間反応を行った。終了後、80℃で1時間加熱処理、ろ過後、逆相HPLCにて分析し、オリゴ配糖体がどのように加水分解されるかを確認した。

### (4) 阻害剤存在下での $\beta$ -アミラーゼによる加水分解

$\alpha$ -アミラーゼの阻害剤を反応系に添加することで、生成する加水分解物(配糖体)の糖の数をコントロールするために以下の実験を行った。阻害剤としては、ポリフェノールとして(+)-カテキンを用いることにした。

2.2の(2)で酵素合成した、 $\beta$ -CDを糖供与体存在下で反応時間を5分間としたクルクミンオリゴ配糖体の混合物を用いて以下の実験を行った。クルクミンオリゴ配糖体混合物に  $\beta$ -アミラーゼ (*Bacillus subtilis*) を10units, タンニン酸、もしくは(+)-カテキンを10  $\mu$ mol加え、55℃で24時間反応を行った。終了後、80℃で1時間熱処理、ろ過後、逆相HPLCにて分析し、オリゴ配糖体がどのように加水分解されるかを確認した。

## 2.4 クルクミン、およびクルクミン配糖体の

水溶性の測定<sup>4)</sup>

2.2, 2.3で酵素合成したクルクミン配糖体, およびクルクミンを用いて水溶性の測定を行った。基質0.5 μmolをスクリー管瓶に入れ, そこへ十分な量の蒸留水を加えて5時間攪拌した後, 水相を逆相HPLC分析し, 水にどの程度溶けているかを定量した。

3. 結果と考察

3.1 植物培養細胞によるクルクミンの変換

HPLC分析の結果を以下に示す ( Fig. 1とFig. 2)。固定化ニチニチソウ培養細胞によるクルクミンの変換により, クルクミンモノ配糖体の生成が

確認された ( ESI<sup>+</sup>MS,  $m/z$ ; 553 [ M + Na ]<sup>+</sup>, 別途化学合成した標品の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルと一致した)。また, クルクミンモノ配糖体 ( 2 ) 以外に, クルクミンO-β-D-ゲンチオビオシド ( 3 ) とクルクミンO-β-D-ジグルコシドと思われる二配糖体の存在を確認した。

3.2 CGTaseによるクルクミンオリゴ配糖体の酵素合成

( 1 ) 可溶性デンプンを糖供与体としたCGTaseによる配糖化

Fig. 3と4に示すように, HPLC分析の結果, G<sub>1</sub>(クルクミンO-β-D-グルコシド), G<sub>2</sub>(クルクミンO-β-D-マルトシド), G<sub>3</sub>(クルクミンO-

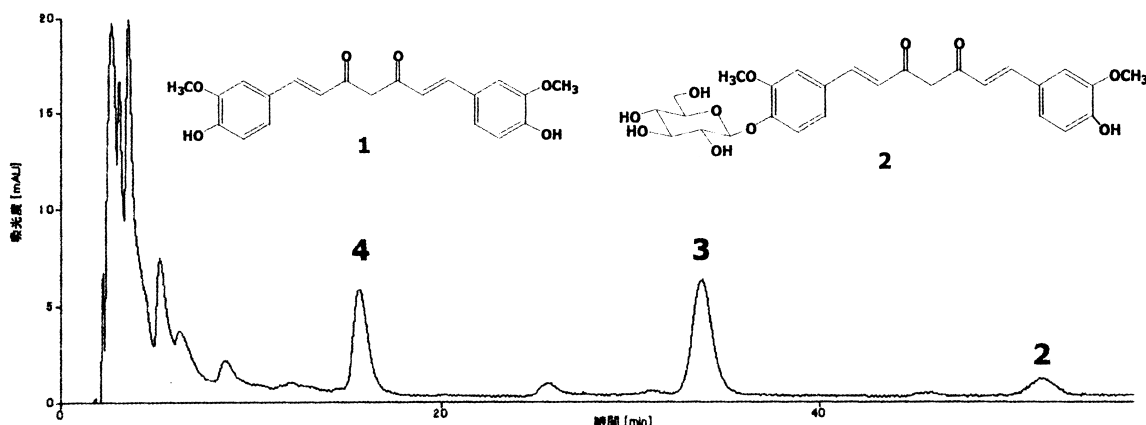


Fig 1 HPLC Profiles of 1 by Immobilized Cells of *C. roseus*  
HPLC Conditions; Column; CrestPak C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

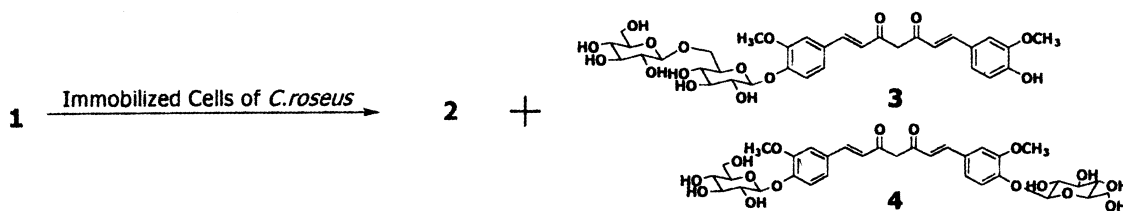


Fig 2 Biotransformation of 1 by Immobilized Cells of *C. roseus*

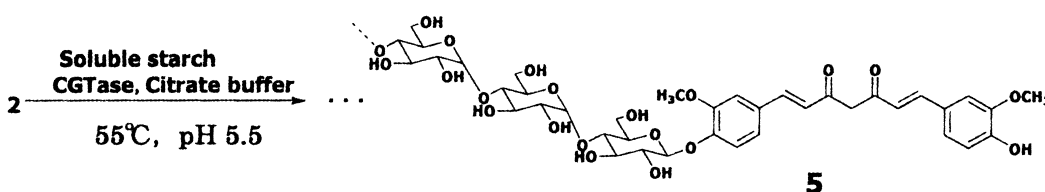


Fig 3 Enzymatic Synthesis of 5

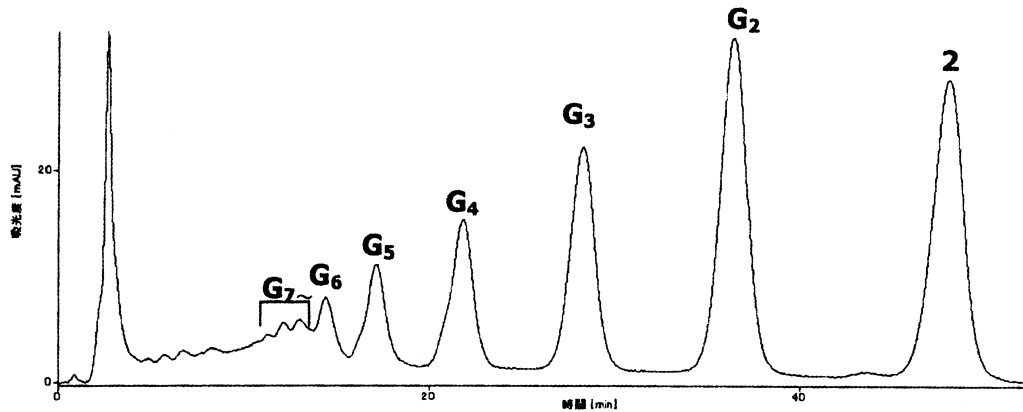


Fig. 4 HPLC Profiles of Transglycosylation Products of Curcumin O-β-D-glucoside by CGTase.  
Glycosyl Donor; Soluble Starch, Reactin Time; 24hr  
Curcumin Oligosaccharides; G<sub>n</sub> (n=2~)  
HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S (4.6 × 150mm) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS (430nm) absorption

- マルトトリオシド), G<sub>4</sub>(クルクミンO-β-D-マルトテトラオシド), G<sub>5</sub>(クルクミンO-β-D-マルトペンタオシド)からG<sub>7</sub>(ヘプタ配糖体)以上の配糖体と考えられるピークを確認した。G<sub>1</sub>からG<sub>5</sub>までのピークを単離精製し,それぞれLC-MS分析を行ったところ, G<sub>1</sub>はESI<sup>+</sup>MS測定で,  $m/z$ : 553 [M + Na]<sup>+</sup>, G<sub>2</sub>は $m/z$ : 715 [M + Na]<sup>+</sup>, G<sub>3</sub>は $m/z$ : 877 [M + Na]<sup>+</sup>, G<sub>4</sub>は $m/z$ : 1039 [M + Na]<sup>+</sup>, G<sub>5</sub>は $m/z$ : 1201 [M + Na]<sup>+</sup>であり,クルクミンのオリゴ配糖体であることが示唆された。また,<sup>13</sup>C-NMR測定結果からも,これらの化合物がクルクミンオリゴ配糖体であることが示唆されたため, G<sub>1</sub>からG<sub>5</sub>はそれぞれ,クルクミンの1糖配糖体から5糖配糖体であると確認した。

#### (2) シクロデキストリンを糖供与体としたクルクミンオリゴ配糖体の酵素合成

- 1) - CDを糖供与体とした時(経時変化)
- 2) - CDを糖供与体とした時(経時変化)
- 3) - CDを糖供与体とした時(経時変化)

糖供与体として - CDを用いた場合, 反応時間が5分という短時間に間に, 7糖以上のオリゴ配糖体が生成し, その後, 多配糖体は時間とともに加水分解される傾向にあることがわかった。

- CDを使用した場合は3時間後, - CD使用時は6時間後に配糖体が多く生成されることがわか

った (Fig. 5~7)。

#### 3.3 加水分解酵素によるクルクミンオリゴ配糖体の分解

##### (1) - アミラーゼによる加水分解

逆相HPLC分析の結果, 時間ごとに多配糖体が加水分解されて減少し, モノ配糖体である2が増加する傾向が見られた。24時間後では, ほぼG<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, 2の3種だけとなり, 48時間後のHPLCチャートとを比較しても, G<sub>2</sub>とG<sub>3</sub>のピークはほとんど変わらなかった (Fig. 8)。

##### (2) グルコアミラーゼによる加水分解

逆相HPLC分析の結果, 時間ごとに多配糖体が加水分解されて減少し, モノ配糖体である2が増加する傾向が見られた。24時間以降は, 2以外はほぼ確認できなかった (Fig. 9)。

##### (3) - アミラーゼによる加水分解

逆相HPLC分析の結果, 時間ごとに多配糖体が加水分解されて減少する傾向が見られたが, - アミラーゼやグルコアミラーゼを使用した場合は異なり, 48時間後では, ほぼG<sub>1</sub>とG<sub>2</sub>だけになった (Fig.10)。

##### (4) 阻害剤存在下での - アミラーゼによる加水分解

植物に含まれるフラボノイドなどのポリフェノール類の中には, - アミラーゼの阻害効果が報

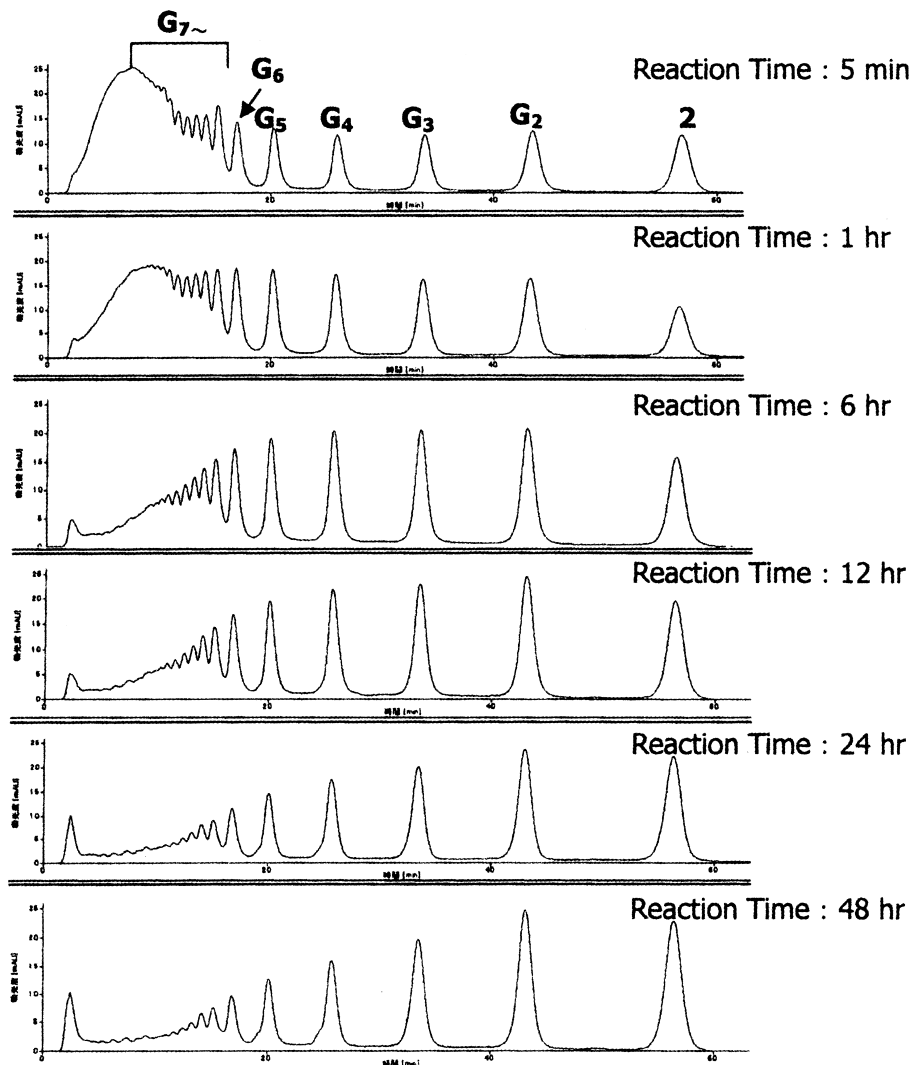


Fig. 5 HPLC Profiles of Transglycosylation Products of Curcumin *O*-β-D-glucoside by CGTase. Glycosyl Donor; β-CD, Curcumin Oligosaccharides; G<sub>n</sub> (n = 2 ~ ) HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

告されているものがある。そこで、タンニン酸、および (+) - カテキンを阻害剤として用い、加水分解反応の制御を試みた。その結果、タンニン酸ではほとんど阻害効果は認められなかったが、(+)-カテキンを添加した場合、加水分解して生成する配糖体が、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>の3種類になることがわかった ( Fig. 11 )。

### 3.4 クルクミン、およびクルクミン配糖体の水溶性の測定

水溶性試験の結果、クルクミンは全く溶けておらず、HPLC分析ではピークを確認できなかった。その他の配糖体については、クルクミン *O*-β-D

- グルコシドと比較した結果、クルクミン *O*-β-D- マルトペンタオシドでは約83倍もの水溶性の向上が認められた ( Table 1 )。

## 4. ま と め

- (1) 固定化ニチニチソウ培養細胞によるクルクミンの変換では、クルクミンモノ配糖体( 2 ) 以外に、クルクミン *O*-β-D- ゲンチオビオシド、およびクルクミン *O*-β-D- ジグルコシドと考えられる変換物の存在を確認できた。
- (2) 糖転移酵素であるCGTaseを用いたクルクミンオリゴ配糖体の酵素合成に成功した。特

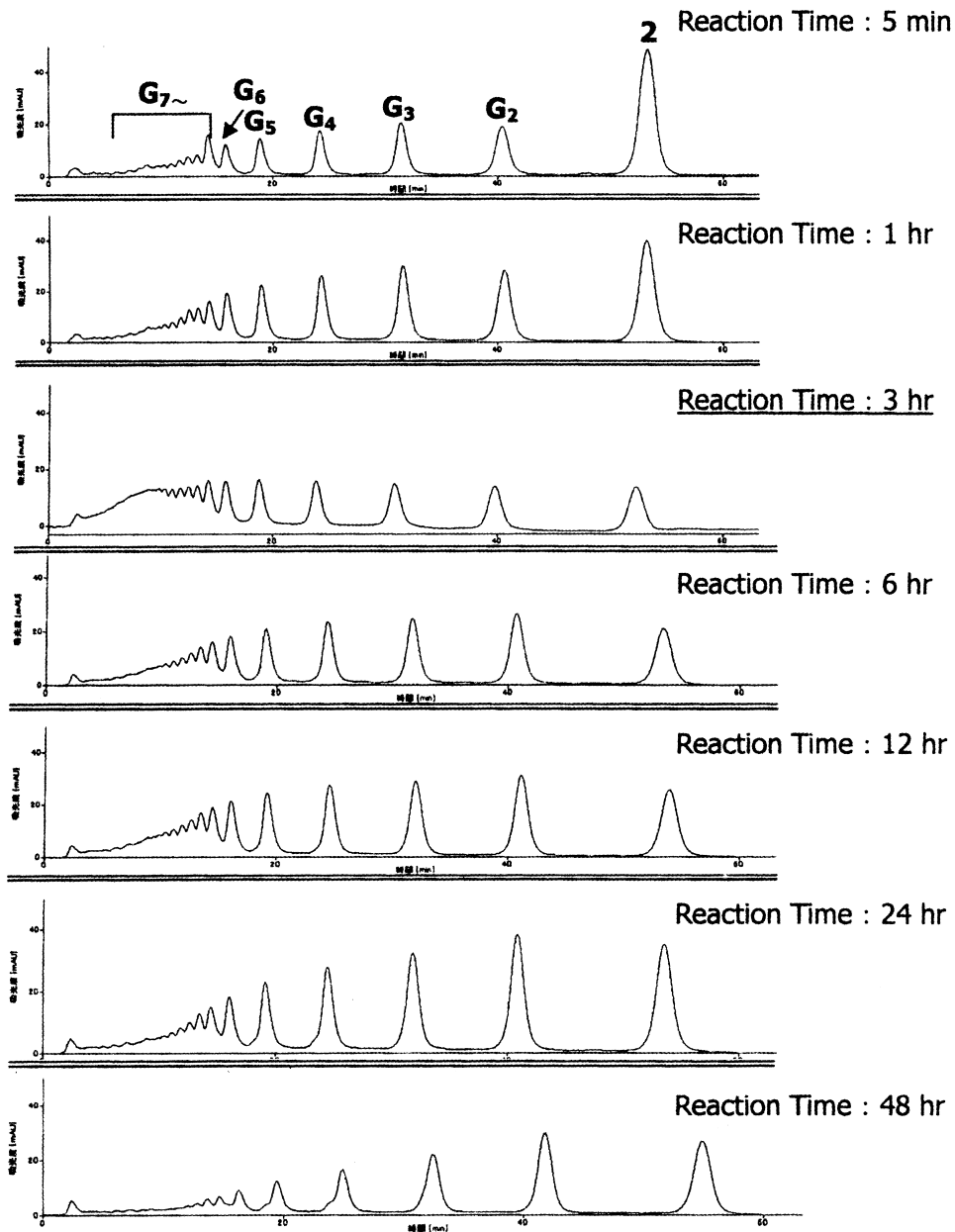


Fig. 6 HPLC Profiles of Transglycosylation Products of Curcumin *O*-β-D-glucoside by CGTase.  
 Glycosyl Donor; β-CD, Curcumin Oligosaccharides; G<sub>n</sub> ( n = 2 ~ )  
 HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

に、糖供与体として β-CDを用いた場合、短時間に多配糖体が生成することがわかり、効率的なクルクミンオリゴ配糖体の合成に有効であることがわかった。

- (3) 糖加水分解酵素を利用した多配糖体の加水分解を行った結果、次第により小さい配糖体へと加水分解されることがわかった。また、(+)-カテキンを添加すると、選択的な加水分解が起こり、モノ、ジ、トリ配糖体が生

成することがわかった。今後、阻害剤や添加剤などを検討することで、加水分解を制御できる可能性が十分に考えられる。すなわち、CGTaseと β-CDにより、クルクミンから短時間にオリゴ配糖体を効率的に合成する。その後、分離することなく、多配糖体の混合物のまま、添加剤などの存在下、アミラーゼなどの糖加水分解酵素を作用させることで、目的とするオリゴ配糖体の合成が可能である

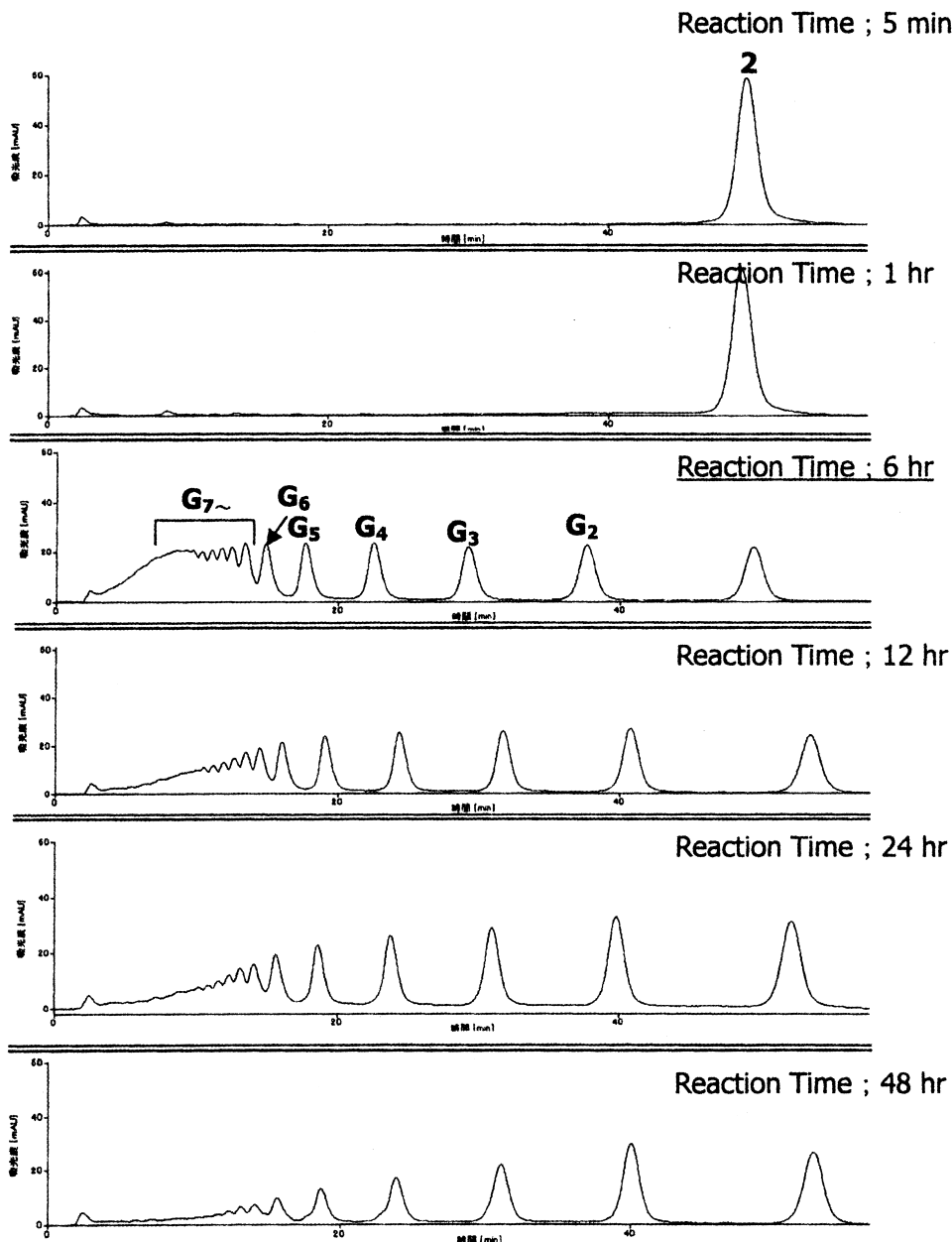


Fig. 7 HPLC Profiles of Transglycosylation Products of Curcumin O - β - D - glucoside by CGTase. Glycosyl Donor; β - CD, Curcumin Oligosaccharides; G<sub>n</sub> ( n = 2 ~ ) HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

ことが示唆された。

- (4) 水溶性試験の結果、クルクミンO-β-D-マ  
ルトペンタオシドでは、クルクミンモノグル  
コシドに比べて約83倍も水溶性が向上するこ  
とがわかった。クルクミンは、その生理作用  
から非常に有用な天然物の一つであるが、水  
溶性の低さが問題となっている。本研究の成  
果を応用すれば、高水溶性クルクミンの合成  
が可能であり、食品分野だけでなく、医薬へ

の応用利用も期待できる。

最後に、本研究を行うにあたり、多大なる研究  
助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団なら  
びに関係各位の皆様方に心より御礼申し上げま  
す。

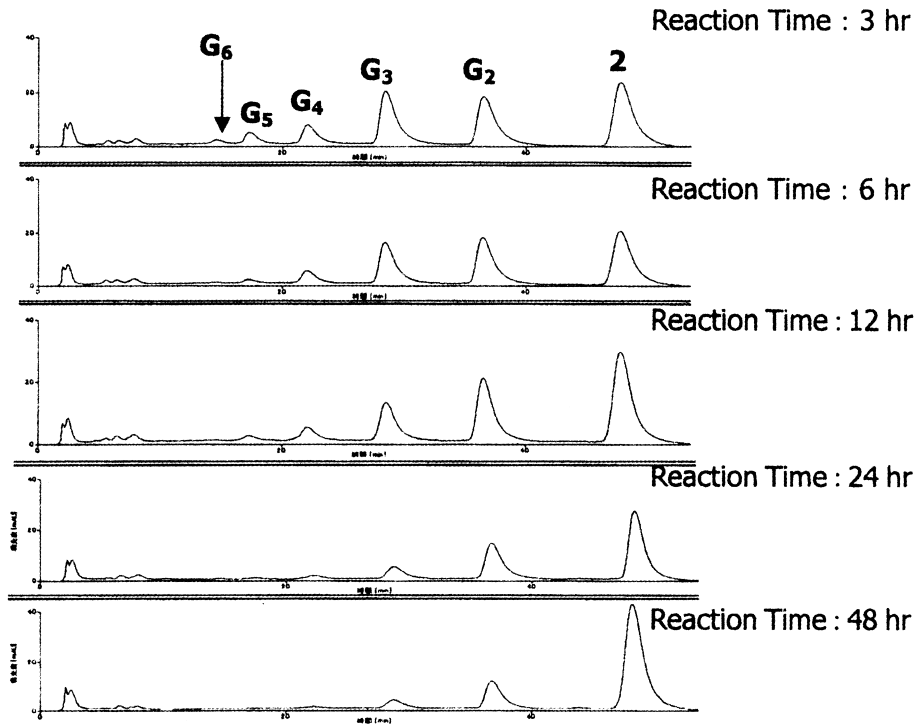


Fig. 8 HPLC Profiles of Hydrolysates of Curcumin Oligosaccharides by Amylase.  
 HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

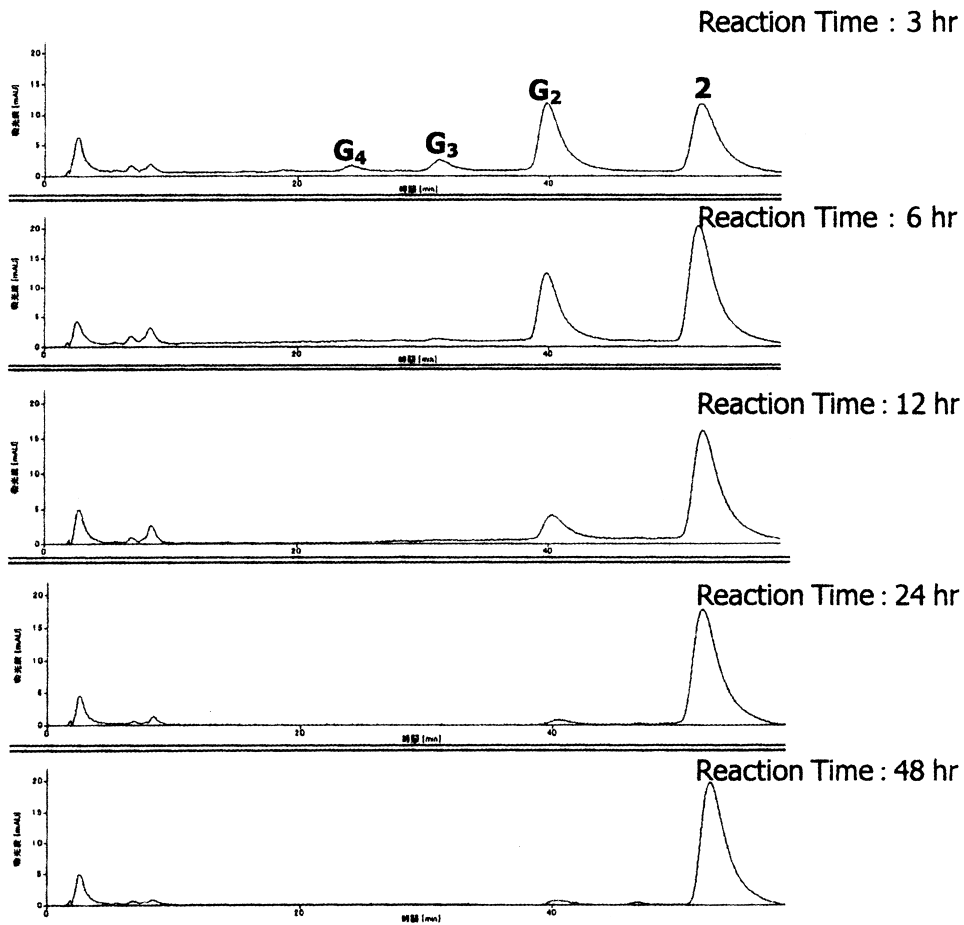


Fig. 9 HPLC Profiles of Hydrolysates of Curcumin Oligosaccharides by Glucoamylase.  
 HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 × 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption



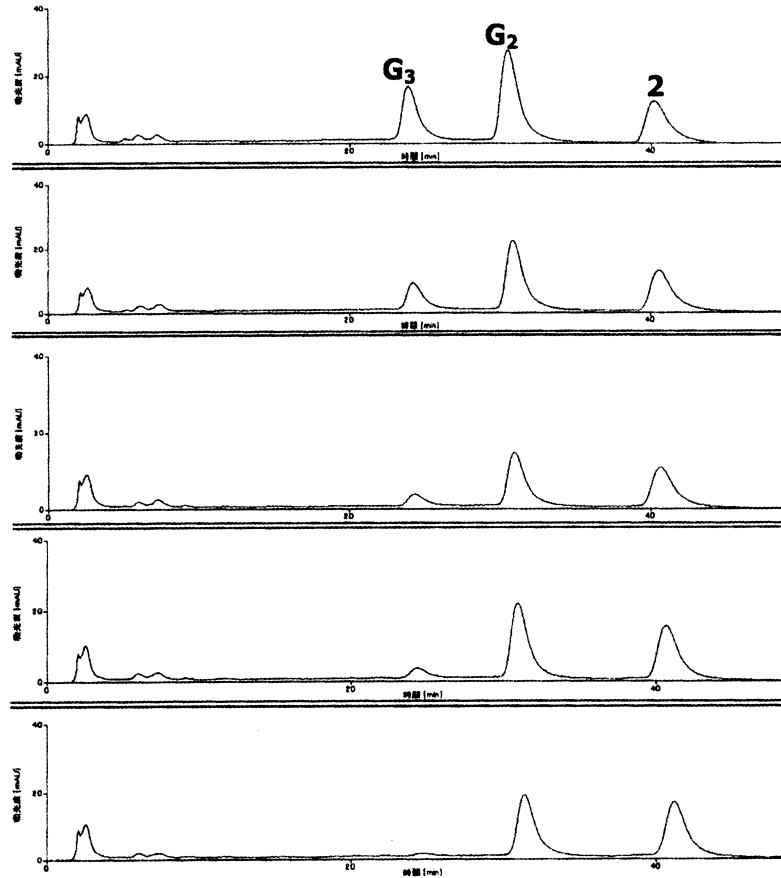


Fig. 10 HPLC Profiles of Hydrolysates of Curcumin Oligosaccharides by  $\alpha$ -Amylase.  
HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 x 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

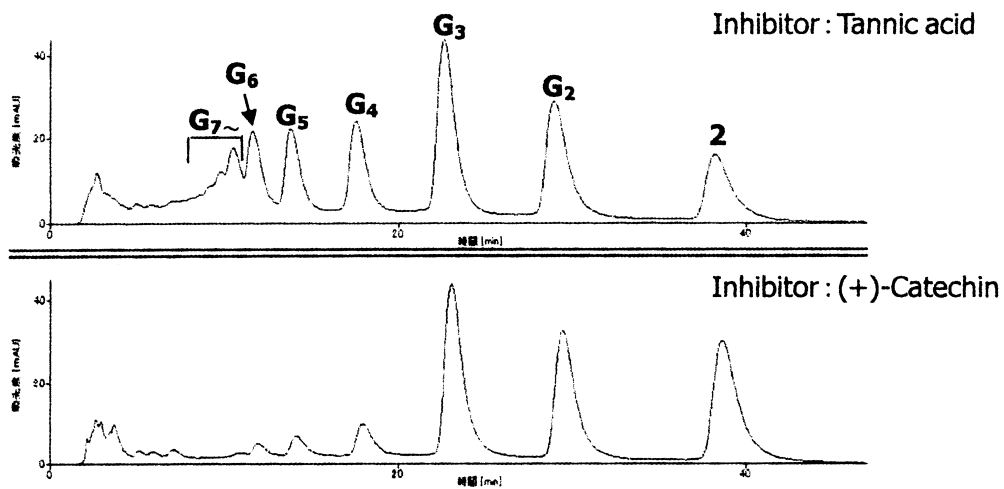


Fig. 11 HPLC Profiles of Inhibitory Effect of  $\alpha$ -Amylase by Polyphenol.  
HPLC Conditions; Column; Crestpark C18S ( 4.6 x 150mm ) Eluent; 25% CH<sub>3</sub>CN, Detection by UV/VIS ( 430nm ) absorption

Table 1 Water Solubility of Curcumin and Curcumin Glycoside.

Compound	Number of Glucose Residues	Water Solubility	
		mmol/l	Fold
Curcumin	0	0	0
Curcumin <i>O</i> -D-glucoside	1	0.6	1
Curcumin <i>O</i> -D-maltoside	2	0.7	1.2
Curcumin <i>O</i> -D-maltotrioside	3	31.7	52.8
Curcumin <i>O</i> -D-maltotetraoside	4	46.9	83.2
Curcumin <i>O</i> -D-maltopentaoside	5	>46.9	>83.2

## 文 献

- 1 ) Y. Kaminaga, F.P. Sahin, H. Mizukami, *FEBS Letters*, 567, 197-202 (2004)
- 2 ) 東田千尋, *ファルマシア*, 38 (9), 891-892 (2002)
- 3 ) H. Hamada, K. Nishida, T. Furuya, K. Ishihara, N. Nakajima, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 16, 115-119 (2001)
- 4 ) Y. Kaminaga, A. Nagatsu, T. Akiyama, N. Sugimoto, T. Yamazaki, T. Maitani, H. Mizukami, *FEBS Letters*, 555, 311-316 (2004)

## Functionalization and Application of Spice Ingredients: Enzymatic Synthesis of Water-soluble Curcumins

Nobuyoshi Nakajima

( Graduate School of Health and Welfare, Okayama Prefectural University )

1. Curcumin was converted to not only curcumin *O*- $\beta$ -D-glucoside but also curcumin *O*- $\beta$ -gentiobioside and curcumin *O*- $\beta$ -D-diglucoside by the immobilized plant cultured cells of *Catharanthus roseus*.
2. The enzymatic synthesis of curcumin oligosaccharides were accomplished by the CGTase-catalyzed-transglucosylation reaction in the presence of sugar donors such as soluble starch,  $\alpha$ - ,  $\beta$ - , and  $\gamma$ - cyclodextrins.
3. The curcumin oligosaccharides ( i.e. curcumin *O*- $\beta$ -maltopentaoside ) synthesized enzymatically showed a high water solubility compared with that of curcumin.
4. The hydrolysis of mixtures of curcumin oligosaccharides by a glucosidase in the presence of an additive suggest that the selective synthesis of the curcumin oligosaccharide having the required number of sugars.