

〈平成17年度〉

## 香辛料成分の高機能化を目的としたカプサイシノイド およびカプシノイド誘導体の酵素的創製

石原浩二

(岡山理科大学理学部臨床生命科学科講師)

### 1. はじめに

香辛料成分であるカプサイシンやクルクミンをはじめとして、チモール、ペリリルアルコール、ラズベリーケトン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成分の多くは、古来より、ヒトの食生活・食文化と密接な関係を有する化合物であり、食と健康との関係が医学的にも指摘されている現代においては、これら食品関連成分の抗菌、抗ウイルス、抗酸化、制癌作用などが注目を集めている。中でも、香辛料成分による抗酸化性、抗菌性、ダイエット効果などの生理作用に興味を持たれ、メタボリックシンドローム改善を期待した、機能性食品開発への応用が進んでいる。特に、カプサイシンを始めとするカプサイシノイド(カプサイシン類)を利用した様々な健康食品が開発されている。また、カプシノイド(カプシエート類)<sup>1~4)</sup>についても、カプサイシノイドと同様な生理作用を有し、辛みがほとんどないという点で、新しい香辛料成分として脚光を浴びている化合物である。しかし、このカプシノイドはある特定のトウガラシにしか存在せず、今後増々その需要が増大すると考えられるこれら香辛料成分を安定に供給することは重要な研究課題であると言える。これまでに古旗らにより、capsaicinをメタノリシスすることで得られるmethyl 8-methyl-6-nonanoateをアシルドナーとしたcapsiateの酵素合成法が考案されている<sup>5)</sup>。しかしながら、この方法では、アシルドナーの分

離精製と2ステップの反応行程が必要であった。実用的生産の観点から考えると、より簡便で、かつ、効率的なカプサイシノイド、カプシノイド、およびそれら誘導体の合成方法の確立が望まれていた。

そこで本研究では、入手が容易なカプサイシノイドを主原料としたカプシノイドへの酵素的分子変換について検討し、香辛料成分の利用範囲拡大を目指すことを主目的とした。ここでは、酵素：リパーゼの優れた触媒機能を高度に利用したカプサイシノイドからカプシノイドへの直接変換について興味深い結果が得られたので報告したい。

### 2. 実験方法

#### 2.1 リパーゼを用いたvanillyl nonanoate (バニリルノナノエート)の合成

はじめに、カプシエート合成のモデル反応として、vanillyl alcohol (バニリルアルコール)とnonanoic acid (ノナン酸)からのvanillyl nonanoate (バニリルノナノエート)の合成を試みることにした。手順としては、ノナン酸よりvinyl nonanoate (ノナン酸ビニルエステル)を合成し、そのビニルエステルをアシルドナーとして、有機溶媒中、リパーゼ触媒存在下でのトランスエステル化反応を応用し、バニリルノナノエートの合成を行った。

(1) vinyl nonanoate (ノナン酸ビニル)の合成<sup>6)</sup>

三口フラスコ(300ml容)に酢酸ビニル(0.4mol)、

塩化パラジウム (0.2mmol), 臭化銅 (0.5mmol), 酢酸リチウム (19.5mmol) を入れて70℃に加温後, nonanoic acidを少量ずつ滴下し, 全て加え終わった後, 70℃で24時間攪拌した。反応終了後, ろ過, 酢酸エチルで抽出, 有機層を飽和食塩水で洗浄, 硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後, エバポレーターにて溶媒を除去し, シリカゲルクロマトグラフィーにて精製した。生成物は<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRにて構造決定を行った。

## (2) vanillyl nonanoate (バニリルノナノエート) の酵素的合成

ポリプロピレン製容器 (30ml容) に, vanillyl alcohol (1 mmol), (1) で合成したvinyl nonanoate (2.5mmol), モレキュラーシーブス 4 A (400mg), あらかじめ脱水したアセトンもしくは*n*-ヘキサン (20ml), 各種リパーゼ (250mg) を加えて, 37℃にて攪拌した。反応混合液の一部をピペットで取りだし, フィルターでろ過後, HPLC分析 (分析カラム:CrestPak C18S, φ4.6×150mm, 溶離液: 50%アセトニトリル, カラム温度: 40℃, 流速: 1.0ml/min, 検出: マルチチャンネルUV-VIS) を行うことで, 反応の進行状況をモニターした。生成物については, シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し, <sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMRにて構造解析を行った。

## 2.2 リパーゼの機能を利用した *N*-pelargonylvanillylamide (*N*-ペラルゴニルバニリルアミド) からのvanillyl nonanoateへの酵素的変換

次に, 酵素の触媒機能を応用した*N*-pelargonylvanillylamideからvanillyl nonanoateへの直接変換を目標とし, 1) リパーゼによる*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解速度, 2) リパーゼによるvanillyl alcoholとnonanoic acidとのエステル化反応速度を求め, 両者の速度差を利用した酵素的直接変換反応を試みることにした。

## (1) リパーゼによる*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解

ポリプロピレン製チューブ (15ml容) に基質 (0.2mmol), アセトンもしくは*n*-ヘキサン (10ml), リパーゼCAL-B (chirazyme L-2) (250mg) を加えて密栓し, 70℃で攪拌した。HPLC分析 (分析カラム:CrestPak C18S, φ4.6×150mm, 溶離液: 50%アセトニトリル, カラム温度: 40℃, 流速: 1.0 ml/min, 検出: マルチチャンネルUV-VIS) により, 基質の減少量をモニターしながら, 同時に定量を行った。また, 基質濃度を0.25mMから3.0mMの範囲で加水分解速度を測定し, Lineweaver-Burkプロットにより加水分解反応の速度定数を求めた。

## (2) リパーゼ触媒によるバニリルアルコールとノナン酸のエステル化

ポリプロピレン製チューブ (15ml容) にバニリルアルコール (6.3から125mMの濃度範囲), リパーゼCAL-B (chirazyme L-2) (250mg), そしてアシルドナーであるノナン酸を加えて密栓し, 70℃で攪拌した。HPLC分析 (分析カラム:CrestPak C18S, φ4.6×150mm, 溶離液: 50%アセトニトリル, カラム温度: 40℃, 流速: 1.0ml/min, 検出: マルチチャンネルUV-VIS) により, 基質の減少量をモニターしながら同時に定量を行った。

## (3) リパーゼ触媒による*N*-pelargonylvanillylamideからvanillyl nonanoateへの直接変換反応条件の最適化

ポリプロピレン製容器 (10ml容) に, *N*-pelargonylvanillylamide (7.5mmol), リパーゼCAL-B (chirazyme L-2) (250mg), *n*-ヘキサン (5 ml) を加えて70℃で16時間攪拌後, vanillyl alcohol (7.5–300 μmolの範囲), モレキュラーシーブス4A (100–400mgの範囲) を入れ, HPLC分析にて12時間経時変化を追跡した。

(4) 最適条件下における*N*-pelargonylvanillyl-  
amideからvanillyl nonanoateへの酵素変換  
ポリプロピレン製容器 (10ml容) に, *N*-pelargonyl-  
vanillylamide (7.5  $\mu$ mol), リパーゼCAL-B (chirazyme  
L-2) (250mg), *n*-ヘキサン (5 ml) を加えて70°C  
で16時間攪拌後, vanillyl alcohol (225mmol),  
モレキュラーシーブス4A (300mg) を入れ, HPLC  
分析にて35時間経時変化を追跡した。

### 2.3 リパーゼの触媒機能を利用したcapsaicin (カプサイシン) からのcapsiate (カプシ エート) への酵素的変換

ポリプロピレン製容器 (10ml容) に, capsaicin  
(7.5mmol), リパーゼCAL-B (chirazyme L-2) (250  
mg), *n*-ヘキサン (5 ml) を加えて70°Cで16時間  
攪拌後, vanillyl alcohol (225mmol), モレキュ  
ラーシーブス4A (300mg) を入れ, 35時間攪拌  
後, HPLC分析にて生成物の確認を行い, シリカ

ゲルクロマトグラフィーにて単離・精製を行った。  
得られた化合物について,  $^1\text{H}$ -および $^{13}\text{C}$ -NMR,  
LC-MS分析により構造決定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ノナン酸ビニルの合成

以下のFig. 1のような反応を行い, 生成物を  
 $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR測定した結果をTable 1に示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR測定より11本の炭素シグナルが観測さ  
れ, カルボニル基のシグナルが170.9 Hz, 二重結  
合のシグナルが141.2, 97.4 Hzに観測された。ま  
た,  $^1\text{H}$ -NMR測定結果より, 2'の炭素に結合して  
いるプロトンの結合定数が6.4 Hz (*Z*-form) およ  
び14.0 Hz (*E*-form) であることから, 二重結合  
があると判断した。以上のことを総合的に判断し,  
生成物がvinyl nonanoateであると決定した。単  
離収率は83%であった。

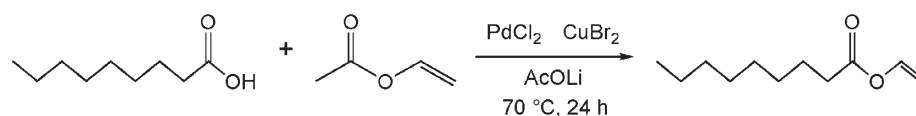
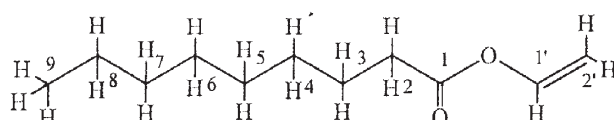


Fig. 1 Synthesis of vinyl nonanoate from nonanoic acid and vinyl acetate

Table 1  $^1\text{H}$ -and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of the product in  $\text{CDCl}_3$

position	$^{13}\text{C}$ NMR	ppm $^1\text{H}$ NMR
1	170.9	—
2	34.0	2.37 (m, 2H)
3	24.6	1.63 (m, 2H)
4	29.1	1.28 (m, 2H)
5	29.1	1.28 (m, 2H)
6	29.1	1.28 (m, 2H)
7	22.7	1.28 (m, 2H)
8	31.8	1.28 (m, 2H)
9	14.1	0.87 (m, 3H)
1'	141.2	7.29 (dd, 6.4Hz, 14.0Hz, 1H)
2'	97.4	4.55 (dd, 1.6Hz, 6.4Hz, 1H) 4.87 (dd, 1.6Hz, 14.0Hz, 1H)



## 3.2 vanillyl nonanoateの酵素合成

## (1) 生成物の同定

以下のFig. 2にあるような反応を計画し、各種リパーゼによるエステル化反応について調査を行った。まずはじめに、生成物がエステル体 (vanillyl nonanoate) であることを確認するために、リパーゼAmano-PSを用いてエステル化を行った反応について、その生成物を単離精製してHPLC分析およびLC-MS分析を行った。そのHPLC解析結果をFig. 3, Table 2に示した。

生成物のLC-MS分析を行ったところ、 $m/z$ 317  $[M+Na]^+$ , および333  $[M+K]^+$ の疑似イオンピークが観測され、vanillyl alcohol (基質) よりも140多い質量数を示したことから、炭素9個が結合した構造を有すると推定された。また、

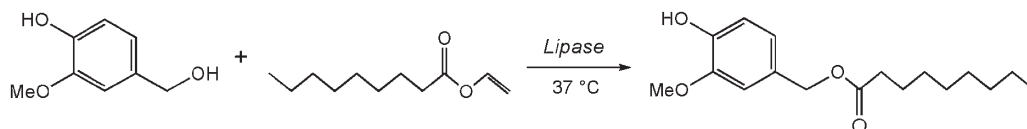


Fig. 2 Lipase-catalyzed transesterification of vanillyl alcohol and vinyl nonanoate

HPLC conditions

column : CrestPak C18S(φ4.6 X 150mm)

eluent : 50 % CH<sub>3</sub>CN

column temp. : 40°C

flow rate : 1.0 ml / min

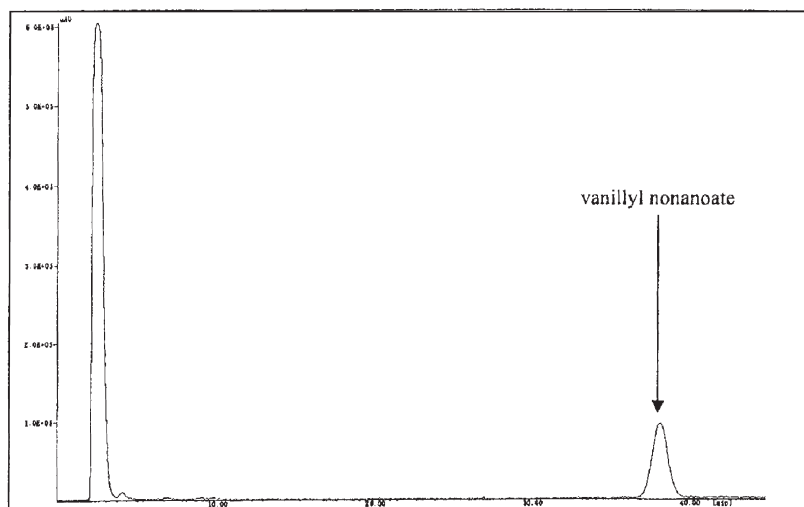
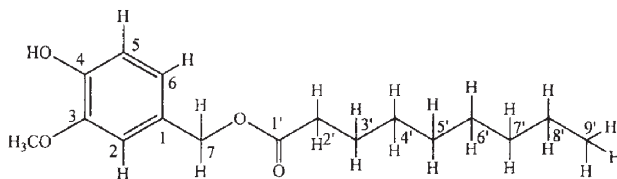


Fig. 3 HPLC Chromatogram of the product (Amano-PS catalyzed esterification)

Table 2 <sup>1</sup>H-and <sup>13</sup>C-NMR chemical shift of the product in CDCl<sub>3</sub>

position	<sup>13</sup> C NMR	ppm <sup>1</sup> H NMR
1	128.0 (C)	—
2	111.3 (CH)	6.90 (m, 1H)
3	146.5 (C)	—
4	145.8 (C)	—
5	114.4 (CH)	6.90 (m, 1H)
6	122.0 (CH)	6.8 (m, 1H)
7	66.3 (CH <sup>2</sup> )	5.02 (s, 2H)
OMe	56.7 (CH <sup>3</sup> )	3.93 (s, 2H)
1'	173.9 (C)	—
2'	34.4 (CH <sup>2</sup> )	2.34 (t, 7.2Hz, 2H)
3'	22.7 (CH <sup>2</sup> )	1.26 (m, 2H)
4'	29.2 (CH <sup>2</sup> )	1.26 (m, 2H)
5'	29.2 (CH <sup>2</sup> )	1.26 (m, 2H)
6'	29.2 (CH <sup>2</sup> )	1.26 (m, 2H)
7'	31.8 (CH <sup>2</sup> )	1.26 (m, 2H)
8'	24.8 (CH <sup>2</sup> )	1.60 (m, 7.2Hz, 2H)
9'	14.1 (CH <sup>3</sup> )	0.88 (t, 3.2Hz, 3H)



$^{13}\text{C}$ -NMR測定結果より、17本の炭素シグナルを確認した。さらに、vanillyl alcoholの一級アルコールの炭素シグナルが低磁場側にシフトしており、またノナン酸と比較して、1'のカルボニル炭素のシグナルが高磁場側へシフトしていたことなどから、7位のアルコールにノナン酸がエステル結合を介して結合していると判断し、生成物を vanillyl nonanoate であると決定した。

## (2) 各種リパーゼによるエステル化反応

市販されているリパーゼ8種について、アセトンおよび $n$ -ヘキサン中でのトランスエステル化反応について調査した。以下の表 (Table 3) はアセトン中での反応をまとめたものである。Amano PS, Amano M10, Amano F-AP15, およびChirazyme (CAL-B) の4種のリパーゼがトランスエステル化反応を触媒することがわかつ

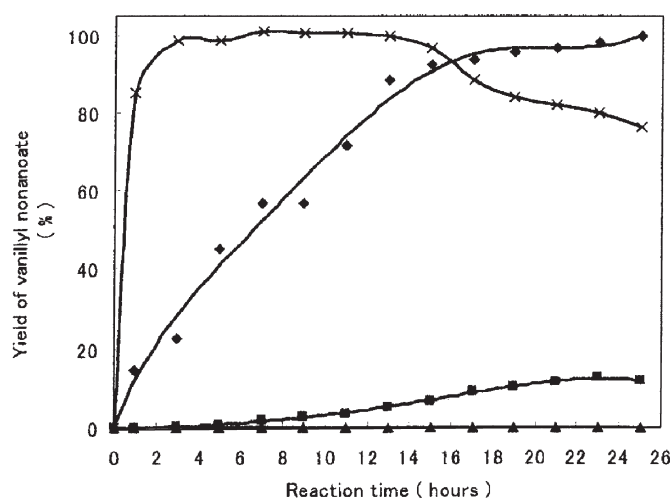
た。その中でも、Amano PSとChirazyme (CAL-B) が高い変換率を示すことがわかり、トランスエステル化の触媒として優れていることがわかった。

Amano PS, Amano M10, Amano F-AP15, およびChirazyme (CAL-B) の4種のリパーゼを用いたトランスエステル化反応のタイムコース (Fig. 4) を比較した場合、最も短時間で変換率が最大に到達しているChirazyme (CAL-B) が最も優れた触媒であることがわかった。

以下の表 (Table 4) は $n$ -ヘキサン中での反応をまとめたものである。Amano AYSを除く7種のリパーゼがトランスエステル化反応を触媒できることがわかった。その中でも、Amano PS, Amano M10, Amano D10, Chirazyme (CAL-B) の4種のリパーゼが高い変換率を示すことがわかり、トランスエステル化の触媒として優れている

**Table 3** Transesterification of vanillyl alcohol and vinyl nonanoate by various lipases in acetone

Lipase	Origin	Supplier	In acetone Reaction time and yield (%)			
			6h	12h	18h	24h
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano	45.4	71.4	93.5	98.4
Lipase G 50	<i>Penicillium camembertii</i>	Amano	0	0	0	0
Lipase M 10	<i>Mucor javanicus</i>	Amano	0.9	3.8	9.1	12.7
Lipase D 10	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano	0	0	0	0
Lipase F-AP 15	<i>Rh. oryzae</i>	Amano	0	0.01	0.03	0.03
Lipase A 6	<i>Aspergillus niger</i>	Amano	0	0	0	0
Lipase AYS	<i>Candida rugosa</i>	Amano	0	0	0	0
Chirazyme L-2	<i>C. antarctica</i>	Roche Diagnostics	98.7	99.5	88.3	80

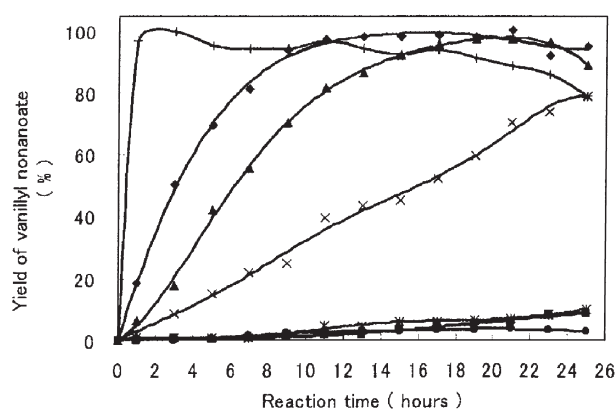


**Fig. 4** Time-course of the lipase-catalyzed transesterification of vanillyl alcohol and vinyl nonanoate in acetone  
Amano PS (◆), Amano M10 (■), Amano F-AP15 (▲), Chirazyme (CAL-B) (×)

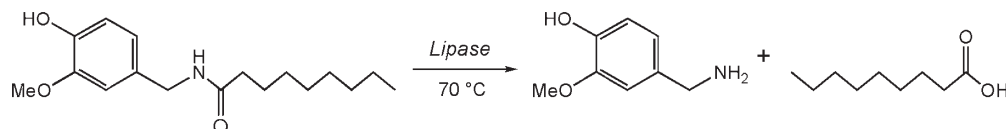


**Table 4** Transesterification of vanillyl alcohol and vinyl nonanoate by various lipases in *n*-hexane

Lipase	Origin	Supplier	In <i>n</i> -hexane Reaction time and yield (%)			
			6h	12h	18h	24h
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano	81.4	97.9	98.1	94.9
Lipase G 50	<i>Penicillium camembertii</i>	Amano	1.0	1.7	5.2	3.6
Lipase M 10	<i>Mucor javanicus</i>	Amano	55.7	86.6	97.2	88.9
Lipase D 10	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano	21.9	43.5	59.4	79.2
Lipase F-AP 15	<i>Rh. oryzae</i>	Amano	1.1	4.8	6.7	10.0
Lipase A 6	<i>Aspergillus niger</i>	Amano	1.6	2.9	3.6	3.1
Lipase AYS	<i>Candida rugosa</i>	Amano	0	0	0	0
Chirazyme L-2	<i>C. antarctica</i>	Roche Diagnostics	94.1	94.0	91.1	79.3



**Fig. 5** Time-course of the lipase-catalyzed transesterification of vanillyl alcohol and vinyl nonanoate in *n*-hexane  
 Amano PS (◆), Amano G50 (■), Amano M10 (▲), Amano D10 (×),  
 Amano F-AP15 (\*), Amano A6 (●), Chirazyme (CAL-B) (+)



**Fig. 6** Lipase-catalyzed hydrolysis of *N*-pelargonylvanillylamide

ことがわかった。

トランスエステル化反応のタイムコース (**Fig. 5**) を比較した場合、最も短時間で変換率が最大に到達しているChirazyme (CAL-B) が最も優れた触媒であることがわかった。

### 3.3 *N*-pelargonylvanillylamideからのvanillyl nonanoateへの酵素的変換

#### (1) リパーゼによる*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解

以下のような反応 (**Fig. 6**) を計画し、アセトン、もしくは *n*-ヘキサン中で、*N*-pelargonylvanillylamideがリパーゼで加水分解されるかどうかを確認した (リパーゼはChirazyme L-2を用い

た)。生成物のHPLC分析結果を**Fig. 7**に示した。

時間の経過とともに、基質である*N*-pelargonylvanillylamideのピークが減少していくことが確認された。次に、このHPLC分析より、基質の減少率を**Fig. 8**に示した。

アセトン中では、基質の加水分解反応は起こらなかったが、*n*-ヘキサン中では加水分解反応が起こり、基質が59%残存している (基質の41%が加水分解されている) ところで反応が平衡に達することがわかった。

次に、基質の濃度を0.25mMから3.0mMの範囲に設定し、Chirazyme L-2触媒下で基質の加水分解を行い、基質濃度と反応速度との関係をグラフ

HPLC conditions

column : CrestPak C18S( $\phi$ 4.6 X 150mm)

eluent : 50 % CH<sub>3</sub>CN

column temp. : 40°C

flow rate : 1.0 ml / min

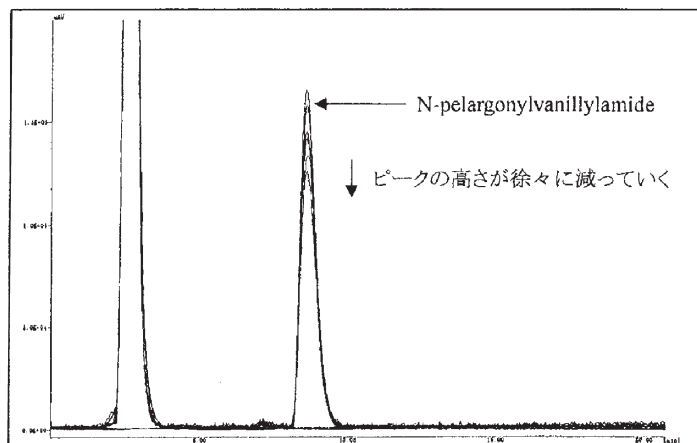


Fig. 7 HPLC chromatogram of the lipase-catalyzed hydrolysis of *N*-pelargonylvanillylamide

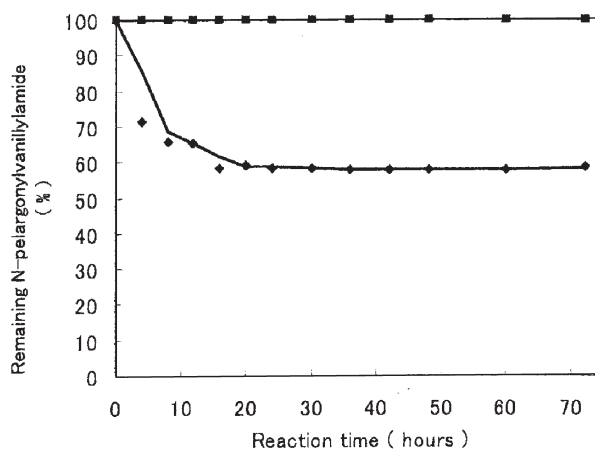


Fig. 8. Time-course of the lipase-catalyzed hydrolysis of *N*-pelargonylvanillylamide in *n*-hexan (◆), in acetone (■)

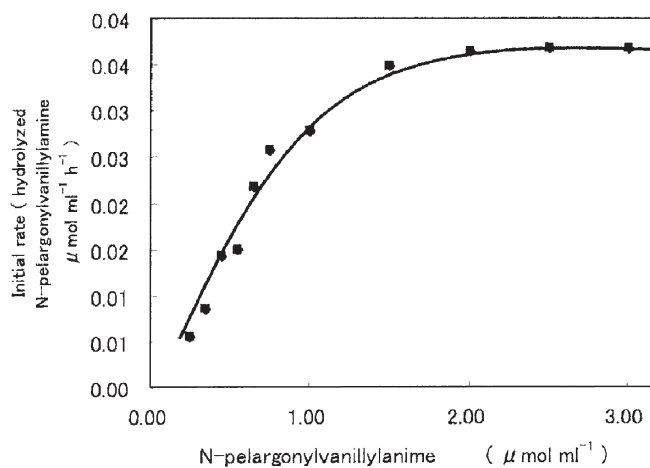


Fig. 9 Effect of the substrate concentration on the initial rate of the lipase-catalyzed hydrolysis

化した (Fig. 9)。

上の図からLineweaver-Burkプロットを作成し、そこから加水分解反応の動力学定数を求めた結果、 $K_m$ は1.42mM、 $V_{max}$ は0.063mM/hであった。

(2) リパーゼによるバニリルアルコールとノナン酸のエステル化～反応速度～

以下のような反応 (Fig. 10) を計画し、*n*-ヘキサン中、Chirazyme L-2 (CAL-B) 触媒存在

下、vanillyl alcoholとノナン酸から*N*-pelargonyl-vanillylamideが生成されるかどうかを確認した。生成物のHPLC分析結果をFig. 11に示した。

*n*-ヘキサン中におけるChirazyme L-2 (CAL-B) 存在下でのエステル化反応は、生成物であるvanillyl nonanoateが95%の変換率で平衡に達することがわかった。

次に、基質の濃度を6.3mMから125mMの範囲

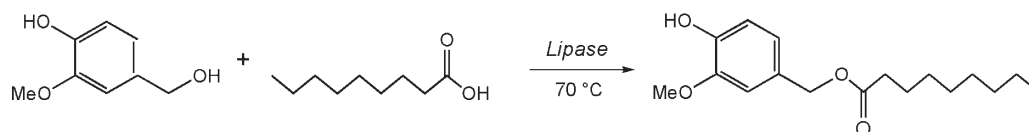


Fig. 10 Lipase-catalyzed esterification of vanillyl alcohol and nonanoic acid

#### HPLC conditions

column : CrestPak C18S(φ4.6 X 150mm), eluent : 50 % CH<sub>3</sub>CN, column temp. : 40°C, flow rate : 1.0 ml / min

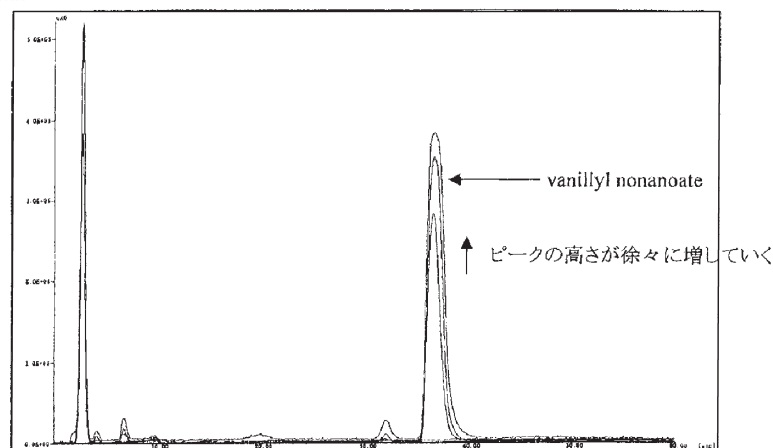


Fig. 11 HPLC chromatogram of the lipase-catalyzed esterification in *n*-hexane

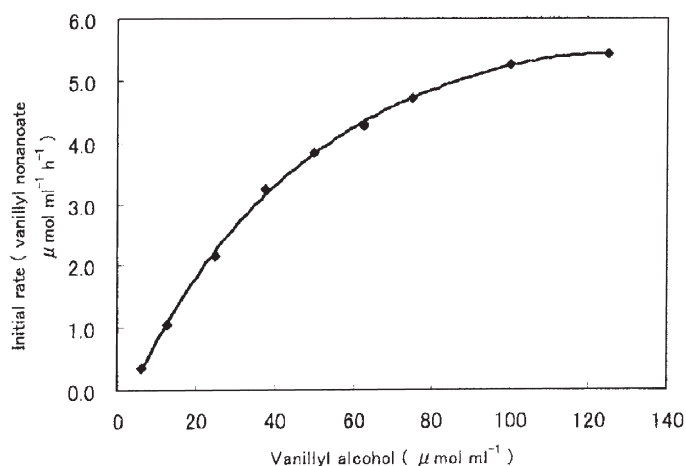


Fig. 12 Effect of the substrate concentration on the initial rate of lipase-catalyzed esterification



に設定し、Chirazyme L-2触媒下でエステル化を行い、基質濃度と反応速度との関係をグラフ化した (Fig. 12)。

上の図からLineweaver-Burkプロットを作成し、そこから加水分解反応の動力学定数を求めた結果、 $K_m$ は86.9mM、 $V_{max}$ は10.1mM/hであった。

(1) と (2) の結果をまとめた (Table 5)。その結果、*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解とvanillyl alcoholとnonanoic acidのエステル化では、エステル化の方が、変換率も見かけの反応速度 ( $V_{max}/K_m$ ) 優位であることがわかった。

(3) エステル化におけるvanillyl alcohol濃度の影響

反応条件の最適化を行うため、vanillyl alcohol濃度の影響について調べた (Fig. 13)。

*N*-pelargonylvanillylamideに対して、添加するvanillyl alcoholの量を10, 20, 30, 40倍モル量加え、エステル化により生成してくるvanillyl nonanoateの量を測定したところ、30モル等量加えた時に、最も高い変換率を示すことがわかった。

(4) エステル化におけるモレキュラーシーブスの影響

反応条件の最適化を行うため、モレキュラーシーブスの添加量について調べた (Fig. 14)。

反応系に添加するモレキュラーシーブスの量を100mg, 200mg, 300mg, 400mgと変化させてエステル化を行い、生成してくるvanillyl nonanoateの量を測定したところ、300mg加えた時に、最も高い変換率を示すことがわかった。

(1), (2) の結果を総合的に考察すると、同一反応容器内で、*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解とvanillyl alcoholとnonanoic acidのエステル化をを同時に行えば、つまり、*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解によって生じるnonanoic acidとvanillyl alcoholがエステル化すれば、*N*-pelargonylvanillylamideとvanillyl alcoholから、

Table 5 Comparison of kinetic parameters

Parameters	Hydrolysis	Estefirication
$K_m$	1.40mM	86.9mM
$V_{max}$	$6.3 \times 10^{-2}$ mM/H	10.1mM/h
$V_{max}/K_m$	0.045/h	< 0.116/h
Max Conv.	41%	< 95%

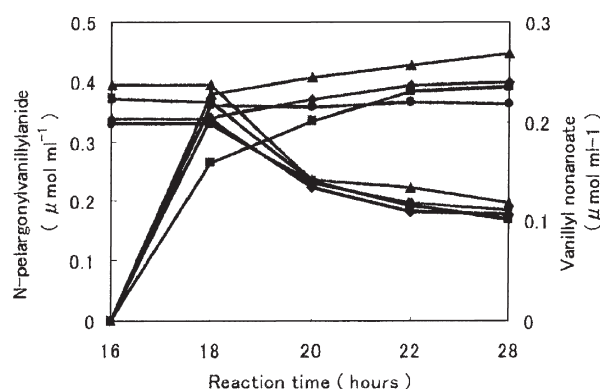


Fig. 13 Effect of vanillyl alcohol concentration on the esterification  
 ■ 10 eq. vanillyl alcohol, ◆ 20 eq. vanillyl alcohol,  
 ▲ 30 eq. vanillyl alcohol, ● 40 eq. vanillyl alcohol

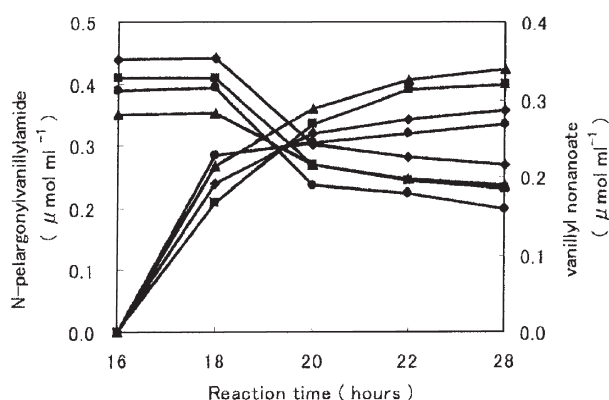


Fig. 14 Effect of molecular sieves amount on the esterification  
 ■ 100mg, ◆ 200mg, ▲ 300mg, ● 400mg of molecular sieves

直接 (加水分解で生成したnonanoic acidを分離精製することなしにという意味) vanillyl nonanoateを合成することができると考えられる。そこで、(3), (4) の実験結果から得られたエステル化の最適条件を用い、リパーゼ (Chirazyme L-2, CAL-B) 存在下*N*-pelargonylvanillylamideとvanillyl alcoholから直接にvanillyl nonanoateへの変換を試みることにした。

(5) リパーゼ触媒による*N*-pelargonylvanillyl-  
amideからvanillyl nonanoateへの直接変  
換 (Fig. 15)

HPLC分析の結果 (Fig. 16), 原料である  
*N*-pelargonylvanillylamideのピークが反応時間  
とともに減少していくにつれ, 生成物である  
vanillyl nonanoateのピークが増えていくことが  
確認された。その経時変化をFig. 17にまとめた。

35時間後の*N*-pelargonylvanillylamideの加水分解率は83%, vanillyl nonanoateの生成率 (変換率) は52%であった。以上の結果より, one-potで酵素も1種類だけで, *N*-pelargonylvanillylamideからvanillyl nonanoateへと変換することに成功した。

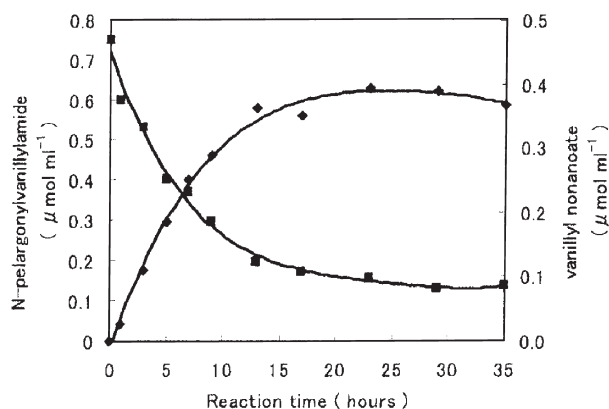


Fig. 17 Time-course of the enzymatic conversion of *N*-pelargonylvanillylamide to vanillyl nonanoate

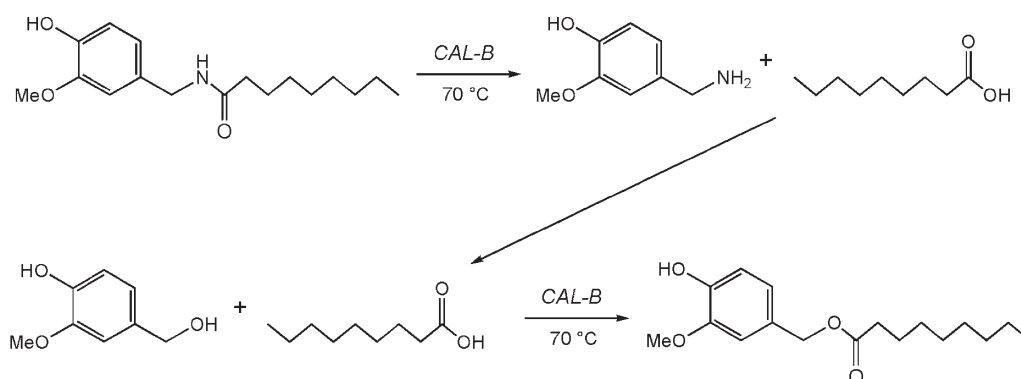


Fig. 15 Enzymatic conversion of *N*-pelargonylvanillylamide to vanillyl nonanoate

HPLC conditions

column : CrestPak C18S(φ4.6 X 150mm), eluent : 50 % CH<sub>3</sub>CN, column temp. : 40°C, flow rate :  
1.0 ml / min

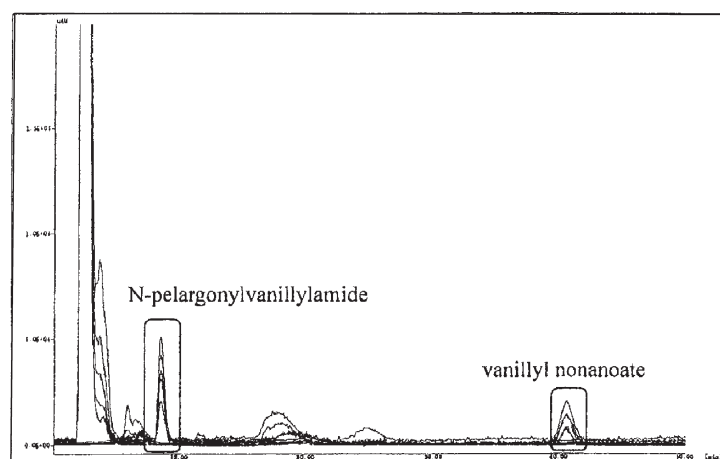


Fig. 16 HPLC chromatogram of the enzymatic conversion

### 3.4 リパーゼ触媒を利用したcapsaicin (カプサイシン) からのcapsiate (カプシエート) への酵素的変換

*N*-pelargonylvanillylamide からの vanillyl nonanoate への酵素的変換で得られた結果を、capsaicin へと応用した。即ち、同一容器内、リパーゼ触媒存在下において、capsaicin のアルキル側鎖を酵素的に加水分解して切り出し、それをアシルドナーとして vanillyl alcohol へとトランスエステル化させることで capsiate の合成を試みた (Fig. 18)。

反応終了後、HPLC分析を行ったところ、生成

物と思われるもののピークが確認された (Fig. 19)。そこで、その物質を単離精製し、LC-MSおよびNMR分析を行った (Table 6)。

生成物は、LC-MS分析より、 $m/z$  329  $[M+Na]^+$ 、345  $[M+K]^+$  の疑似イオンピークが観測され、vanillyl alcohol より152多い質量数を示すことから、炭素10個が結合した構造を有すると考えられた。また、 $^{13}C$ -NMRのスペクトル解析より、18本の炭素シグナルが観測された。1'位の炭素シグナルが高磁場へ、7位の炭素シグナルが低磁場へとシフトしていることから、vanillyl alcohol の1級アルコールに 8-methyl-*trans*-6-nonoic acid が

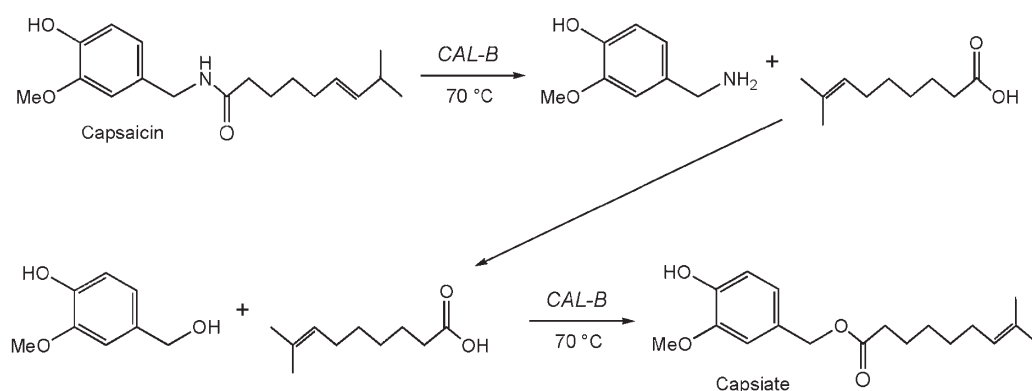


Fig. 18 Lipase-catalyzed conversion from capsaicin to capsiate

#### HPLC conditions

column : CrestPak C18S(φ4.6 X 150mm), eluent : 50 % CH<sub>3</sub>CN, column temp. : 40°C, flow rate : 1.0 ml / min

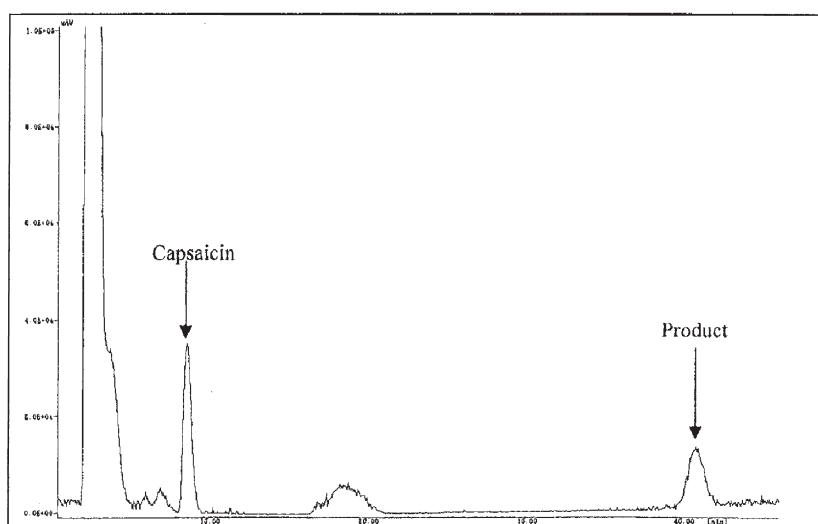
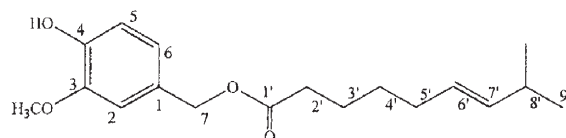


Fig. 19 HPLC chromatogram of the lipase-catalyzed conversion

Table 6  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of the product

position	$^{13}\text{C}$ NMR	ppm $^1\text{H}$ NMR
1	128.5	—
2	110.8	6.90 (m, 1H)
3	147.1	—
4	146.0	—
5	114.4	6.90 (m, 1H)
6	121.7	6.90 (m, 1H)
7	66.3	5.02 (s, 2H)
OMe	55.9	3.91 (s, 2H)
1'	173.7	—
2'	32.2	2.23 (m, 2H)
3'	24.5	1.28 (m, 2H)
4'	29.1	1.29 (m, 2H)
5'	32.2	1.98 (m, 2H)
6'	127.1	5.35 (m, 1H)
7'	138.1	5.35 (m, 1H)
8'	31.6	2.23 (m, 2H)
9'	22.7	0.88 (m, 6H)



エステル結合を介して結合していると考えられ、生成物をcapsiateであると決定した。最終的なcapsaicinの加水分解率は86%, capsiateへの変換率は43%であった。

#### 4. ま と め

- (1) リパーゼchirazyme L-2(CAL-B)は、*n*-ヘキサン中、70°Cにおいて、*N*-pelargonylvanillyl amideの加水分解と、vanillyl alcoholとnonanoic acidとのエステル化反応の両方を触媒し、その速度はエステル化の方が優位であることがわかった。
- (2) *N*-pelargonylvanillyl amideとvanillyl alcoholを出発原料とし、chirazyme L-2 (CAL-B)触媒存在下、vanillyl nonanoateへと変換することに成功した。
- (3) リパーゼの加水分解反応、及びエステル交換反応を応用することで、capsaicinからcapsiateへの酵素的直接変換に成功した。本研究の成果を利用すれば、大量に採取できるcapsaicinから、希少なcapsiateへと変換する

ことができ、新規な機能性食品やサプリメントの開発などの食品分野だけではなく、医学・薬学分野への応用も期待できる。

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。

#### 文 献

- 1) 矢澤 進, 末留 昇, 岡本佳奈, 並木陸和, 農芸化学会誌, **58**, 601 (1989) .
- 2) K. Kobata, T. Toda, S. Yazawa, K. Iwai, T. Watanabe, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1695 (1998) .
- 3) K. Kobata, K. Sutoh, T. Toda, S. Yazawa, K. Iwai, T. Watanabe, *J. Nat. Prod.*, **62**, 335 (1999) .
- 4) Y. Tany, T. Fujioka, M. Sumioka, H. Hamada, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 351 (2004) .
- 5) K. Kobata, M. Kawaguchi, T. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (2) , 319 (2002) .
- 6) K. Ishihara, N. Nakajima, T. Itoh, H. Yamaguchi, K. Nakamura, T. Furuya, H. Hamada, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **7**, 307 (1999) .

## Functionalization and Application of Spice Ingredients: Enzymatic Direct Conversion from Capsaicinoid to Capsinoids

Kohji Ishihara

(Department of Life Science, Okayama University of Science)

1. It was found that chirazyme L-2 (CAL-B) had abilities not only the hydrolysis of *N*-pelargonylvanillylamide but also the esterification of vanillyl alcohol and nonanoic acid in *n*-hexane and the reaction rate of the esterification was faster than the rate of the hydrolysis.
2. The one-pot conversion from *N*-pelargonylvanillylamide to vanillyl nonanoate was accomplished by the lipase-catalyzed intermolecular-transesterification.
3. We also achieved the molecular conversion from capsaicin to capsiate by the lipase-catalyzed hydrolysis and intermolecular-transesterification simultaneously.