

# 博士學位論文

コーヒー(*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*)の  
機能性食品素材としての利用に関する研究

近畿大学大学院  
農学研究科 応用生命科学専攻  
岩井和也

# 博士學位論文

コーヒー(*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*)の  
機能性食品素材としての利用に関する研究

平成 17 年 3 月

近畿大学大学院 農学研究科  
応用生命科学専攻(指導:藤田藤樹夫教授)  
岩井和也

(和文題目)

コーヒー (*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*) の  
機能性食品素材としての利用に関する研究

近畿大学大学院 農学研究科

応用生命科学専攻

岩井和也

(指導: 藤田藤樹夫教授)

(英文題目)

Utilization of Coffee (*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*)  
as a Physiological Functional Food Material.

Kazuya Iwai

March 2005

Graduate School, Kinki University

Division of Agricultural Science

Major: Applied Bioscience

(Advisor: Prof. Tokio Fujita)

---

Submitted to the Graduate School, Kinki University, to fulfill the  
requirement for the Doctorate Degree.

コーヒー (*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*) の

機能性食品素材としての利用に関する研究

Utilization of Coffee (*Coffea arabica*, *Coffea canephola* var. *robusta*)  
as a Physiological Functional Food Material.

岩井和也

目次

緒論.....	6
第一章 コーヒー抽出残渣に含まれるアラビノガラクトタンの分離と酵素分解物ガラクトオリゴ糖の機能性評価 .....	11
1-1. 緒言 .....	11
1-2. 実験材料および実験方法.....	13
1-3. 実験結果および考察.....	20
1-4. まとめ .....	31
第二章 コーヒー生豆に含まれるクロロゲン酸類の分離とその機能性評価 .....	33
2-1. 緒言 .....	33
2-2. 実験材料および実験方法.....	34
2-3. 実験結果および考察.....	46
2-4. まとめ .....	68
第三章 クロロゲン酸を用いた機能性成分の酵素合成 .....	69
3-1. 緒言 .....	69

3-2. 実験材料および実験方法.....	72
3-4. まとめ .....	113
総合考察.....	115
Summary.....	121
謝辞.....	127
参考文献.....	128

## 緒論

コーヒーは古くから嗜好品として世界中で愛飲されてきた。近年、日本でも年間 40 万 t 余りのコーヒー生豆が輸入され、260 万 kL のコーヒー飲料が製造されている。それに伴い、製造現場から排出される様々な廃棄物が発生している。

この現状に対して製造者側は、技術的・経済的に可能な最大限の環境対策を講じることが求められ、環境対策としてどのような対応を行っているのか、それが技術的、経済的に最大限可能なものであるのか常に検証し、環境報告書、環境会計等を通じて社会に情報を提供し、消費者から正当な評価を受けることが求められている。コーヒー飲料製造工場から排出されるコーヒー抽出残渣や、最終製品にならない欠点豆などは排出される量が多いことから、これらコーヒー生豆由来の未利用資源を有効活用する手段の確立が求められている。

コーヒー飲料製造工場から排出されるコーヒー抽出残渣には、マンナンやアラビノガラクトサンなどのヘミセルロースが 40~50% (乾燥重量) 含まれており有望な資源である。しかしコーヒー抽出残渣は、ボイラーの燃料や堆肥などに再利用されるケースがほとんどであり、バイオマス資源の有効利用と呼ぶためには更に付加価値の高い利用方法を考えることが必要である。

そこで著者らはコーヒー豆、あるいはコーヒー抽出残渣に含まれるアラビノガラクトサンが、 $\beta$ -(1→3)-結合からなる主鎖と  $\beta$ -(1→6)-結合からなる側鎖で構成された Type II アラビノガラクトサンであることに注目した。この残渣を酵素分解してオリゴ糖を得ることができれば、プロバイオティクスとしての利用だけでなく、糖鎖工学における有用素材として利用できると期待した。

第一章では、コーヒー豆由来のアラビノガラクトサン分解微生物を探索し、*Aspergillus fumigatus* No.232 が生産するガラクタナーゼを精製して酵素化学的諸

性質を明らかにした。つぎに本酵素をアラビノガラクトタンに作用させて得られた生成物の機能性も評価した<sup>1)</sup>。

一方、コーヒー豆を焙煎する前に形を崩した欠け豆や未成熟豆など等級規格外のコーヒー豆は最終製品にはならず、有効利用されていないのが現状である。そこで著者は、これら規格外の豆を機能性食品素材として利用する方法を考え、豆に含有されるクロロゲン酸類に注目した。

カフェー酸はベンゼン環（フェニル、C6）に炭素3個のプロパン（C3）が結合した基本骨格をもつ化合物群（フェニルプロパノイド；桂皮酸誘導体）の一種で、「C6-C3」1単位で構成されているものから、2~4単位が縮合したリグナン、さらに多数縮合したリグニンなどの形で植物界に広く分布している<sup>2)</sup>。キナ酸にカフェー酸がモノエステル化したものが caffeoyl quinic acid (CQA, Chlorogenic acid)、ジエステル化すると dicaffeoyl quinic acid (diCQA)となる (Fig. 1)。

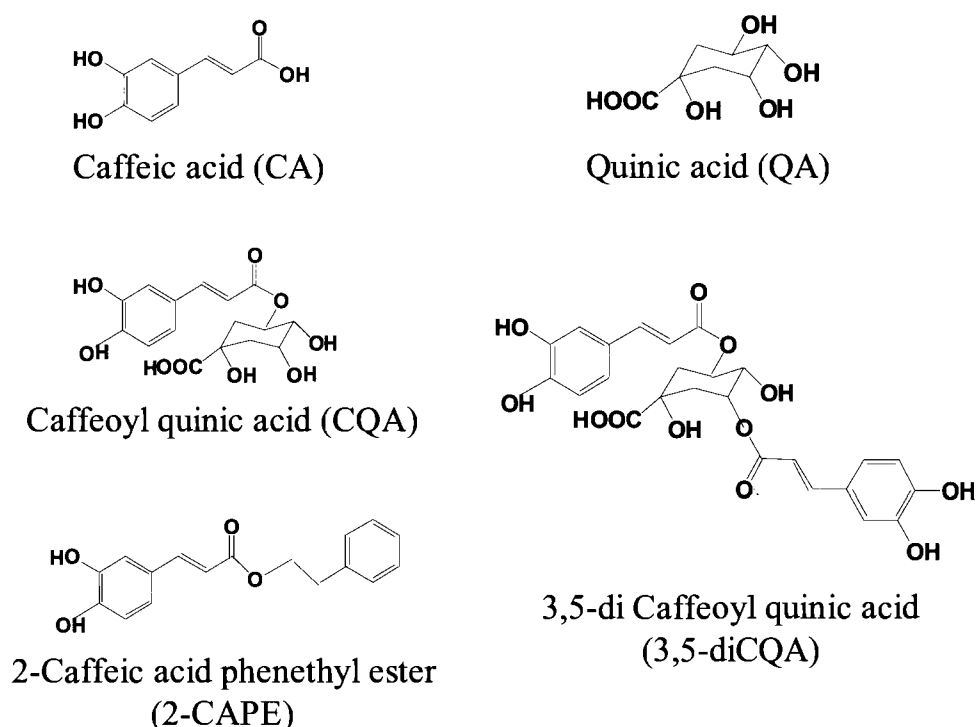


Fig. 1. Typical hydroxycinnamic acid and its derivatives.

クロロゲン酸類は タケ類<sup>3)</sup>、ノラニンジン(*Daucus carota*)<sup>4)</sup>、キク科植物<sup>5-8)</sup>、マテ茶(*Ilex paraguariensis*)<sup>9)</sup>、オナモミ(*Xanthium occidentale*)<sup>10, 11)</sup>、ナシ (*Pyrus pyrifolia*)<sup>12)</sup>、ゴボウ(*Arctium lappa*)<sup>13)</sup>、ペルー産生薬 Pajaro Bobo(*Tessaria integrifolia*)<sup>14)</sup>、プルーン (*Prunus domestica*)<sup>15)</sup>、ヤーコン (*Smallanthus sonchifolius*)<sup>16)</sup>、ウルシ(*Spondias mombin*)<sup>17)</sup>、熱帯産果実<sup>18)</sup>などに含まれていることが知られており、様々な生理機能を有することから近年注目されている物質である。コーヒー生豆にもクロロゲン酸類が含まれているが、私たちが飲用するコーヒーは焙煎した豆を抽出して飲用するために、高温で焙煎する過程でクロロゲン酸類は糖類と反応して香り成分あるいは褐色色素成分へ変化する。したがって、焙煎が進むにつれてクロロゲン酸類は急速に消失してしまう。しかし、飲用に適さない等級外の生豆からクロロゲン酸類を取り出し、機能性成分として利用していくことは未利用資源の有効利用へとつながり、循環型社会に貢献すると期待している。

第二章では、クロロゲン酸類が成熟の早い段階から豆に蓄積されることと、コーヒーの品種の違いによりクロロゲン酸類の含量が異なることを明らかにした。また、生豆からクロロゲン酸異性体の単離方法を確立し、得られたクロロゲン酸異性体の生理活性を *in vitro* で比較し、diCQA に高い活性を見いだした。さらにクロロゲン酸を機能性食品素材として缶コーヒーに添加することを考え、缶コーヒー中のクロロゲン酸類の挙動について分析した<sup>19)</sup>。

第三章では、クロロゲン酸を原材料により高い生理機能を持つ物質へ酵素変換する方法を確立し、得られた生成物の機能性を検討した。

カフェー酸にキナ酸以外の物質がエステル結合したカフェー酸エステル類は植物に広く存在し (Fig. 1)、多様な生理活性を持つことが報告されている。Caffeic acid phenylethyl ester (2-CAPE) はプロポリスに含まれる生理活性物質で、抗酸化、抗菌、抗炎症作用、腫瘍細胞増殖抑制効果があると報告されて



いる<sup>20-22)</sup>。古代エジプトでは死体をミイラ化するための防腐・保存用に、また東欧では外科、皮膚科、耳鼻咽喉科、歯科、婦人科、獣医科などのさまざまな医療領域に用いられてきた<sup>23)</sup>。Chen ら<sup>24)</sup>はプロポリスから単離した 2-CAPE がヒト白血病培養細胞 HL-60 にアポトーシスを誘導する機構を調べ、2-CAPE がカスパーゼ-3 の活性化と、Bcl-2 の発現を抑制し Bax の発現を活性化することによりアポトーシスを誘導していること明らかにした。

多様な生理活性をもつ 2-CAPE や diCQA を化学合成する方法として、たとえばカフェー酸を塩化チオニルなどで塩素化した後、2-Phenethyl alcohol(2-PA) と反応させる方法など多数報告されている<sup>25-27)</sup>。しかし反応に使用した酸触媒や塩素化剤を除去する必要があり、環境に優しい製造方法という点で問題が残る。さらに、diCQA の化学合成方法は著者が調べた限りでは未だない。

そこでまず *Aspergillus japonicus* が生産する CQA esterase を用いて CQA と 2-PA から 2-CAPE への変換条件を検討した。この研究過程で本酵素が加水分解反応以外にあらたにエステル置換反応と縮合反応を触媒することを見いだした。そしてエステル置換反応で最も高い 2-CAPE 変換率 (CQA に対するモル変換率 50%) が得られた。一般に水存在下の環境で加水分解酵素を作用させると、加水分解反応が優先的に進行することが知られている。本酵素が水共存下でエステル置換反応を高収率 (50%) で進行できたのは、エステル置換生成物が 2-PA 層に移行して水層に存在する酵素との接触を免れたためと考えられる。

つぎに Vinyl caffeate と CQA から diCQA に酵素変換する方法を考えた。予備実験として市販の Vinyl cinnamate と CQA から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) に変換できる市販リパーゼを探索したところ、リパーゼ AL のみが CCQA に変換した。確立した最適変換条件下での CCQA モル変換率は 19.2% であった。本酵素は Vinyl caffeate と CQA から diCQA への変換反応を触媒しなかったが、酵素を広く探索すれば、diCQA に変換できる酵素を見つけることが

できると確信している。

2-CAPE や diCQA は多様な生理活性をもつ物質で、天然物には微量しか含まれていない。これらの物質を安定供給する方法として、コーヒー生豆から抽出した CQA を基質として 2-CAPE にワンポット反応で酵素変換できることを明らかにした。また diCQA についても生豆から抽出した CQA を CQA esterase で加水分解し、得られたカフェー酸を Vinyl caffeate に化学変換した後、diCQA へ酵素変換できる見通しをつけることができた。

# 第一章 コーヒー抽出残渣に含まれるアラビノガラクトランの分離と酵素分解物 ガラクトオリゴ糖の機能性評価

## 1-1. 緒言

アラビノガラクトランは水溶性ヘミセルロースの一種で、全ての植物に共通する細胞壁構成成分であり、ガラクトースからなる主鎖にアラビノースもしくはガラクトースからなる側鎖が結合した多糖類の総称である。アラビノガラクトランは構造の違いから Type- I と II に大別されている<sup>28)</sup>。Type- I アラビノガラクトランは $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ガラクトピラノシド結合をもつ主鎖と $\alpha$ -L-アラビノース残基を有する側鎖が結合している。Type- II アラビノガラクトランは、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-ガラクトピラノシド結合からなる主鎖と $\alpha$ -L-アラビノースで修飾された $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトシド結合からなる側鎖で構成され、ごく微量のキシロース、ラムロース、フコース、グルクロン酸などを含んでいるのが特徴である (Fig. 2)。

Type- II アラビノガラクトランは、アズキ種子<sup>29)</sup>、果実のパルプ成分<sup>30-31)</sup>、当帰 (*Angelica acutiloba*)<sup>32)</sup>、ゼニアオイ (*Malva mauritiana*)<sup>33)</sup> などの他に、コーヒー豆胚乳部に多く含まれている。たとえばロブスタ種 (*Coffea canephora* var. *robusta*) の Type- II アラビノガラクトラン含量は 48% (乾燥重量あたり) で、アラビカ種 (*Coffea arabica*) より 3%ほど多い<sup>34)</sup>。

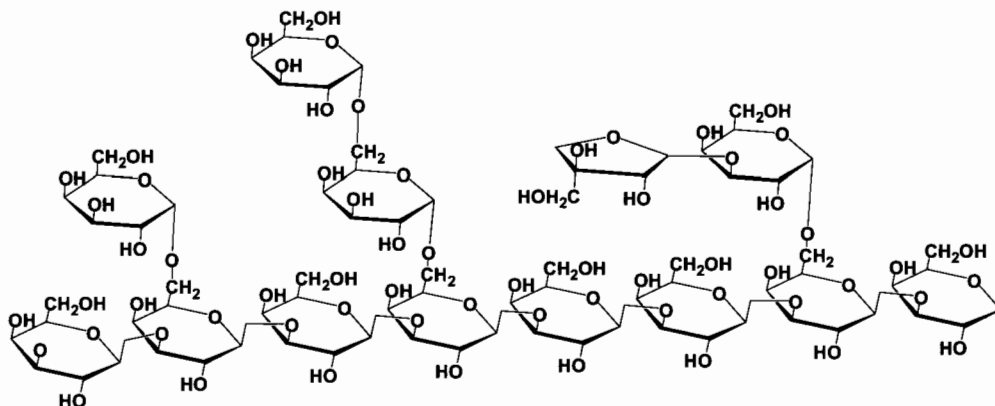


Fig. 2. Structure of arabinogalactan from coffee bean.

粉碎したコーヒー焙煎豆を熱水抽出した残渣には、セルロース、(ガラクト)マンナン、アラビノガラクトンなどの多糖類が 40~50%以上(乾燥重量)残存している。そこでコーヒー豆中の多糖類、特にアラビノガラクトンを酵素的に分解することにより得られたオリゴ糖がプロバイオティクスや糖鎖工学における有用素材として利用できることを期待した。

コーヒー豆に含まれる多糖類を酵素分解する方法として、清澄なコーヒー抽出液を製造するために細胞壁溶解酵素などを使用した例がある<sup>35)</sup>が、酵素分解物を利用する目的でコーヒー豆に含まれる多糖類を酵素処理した報告はまだない。

細菌や糸状菌由来の Endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-ガラクタナーゼ( EC 3.2.1.89)は Type-II アラビノガラクトンや Type-II アラビノガラクトン-タンパク質を分解しないと報告されている<sup>36-44)</sup>。Pellerin ら<sup>46)</sup>は、*Aspergillus niger* の培養液上清から Endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクタナーゼを精製している。この酵素は、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合を主鎖とするアラビノガラクトンを特異的に分解し、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトピオースとガラクトースを 1:0.26 のモル比で生成した。しかしアラビノースを除去したブドウ由来のガラクトン中の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトンを 50%分解したが、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-結合したガラクトース側鎖は分解せずにそのまま残存したと報告している。Hashimoto ら<sup>47)</sup>は、ふすま培養した *Rhizopus niveus* が生産した Endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-ガラクタナーゼ( EC 3.2.1.90) の部分精製酵素が、コーヒー豆由来のアラビノガラクトンを数種類のガラクトオリゴ糖とガラクトース、アラビノースに分解することを見いだしているが、その分解率は 8.9%に留まっている。

Fujita らは<sup>48, 49)</sup>、コーヒー生豆から分離した *Aspergillus fumigatus* No.232 が生豆由来のアラビノガラクトンをアラビノース、ガラクトース、ガラクトオリゴ糖に分解することを見出しており、本実験では *A. fumigatus* No.232 が生産する酵素を電気泳動的に単一バンドまで精製し、酵素化学的諸性質を明らかにし

た。

## 1-2. 実験材料および実験方法

### 1-2-1. コーヒー抽出残渣よりアラビノガラクトタンの抽出

試料にはインドネシア産ロブスタ種 (Indonesia AP-1) のコーヒー抽出残渣を使用し、Hashimoto ら<sup>47)</sup>の方法を参考にアラビノガラクトタンを抽出した。

コーヒー抽出残渣 100g に蒸留水 (1500~2000ml) を加え高压で加熱抽出 (121°C、2~4 時間) した。抽出液を減圧濃縮し、生じた沈殿を除去した上清に 3~4 倍量のエタノールを加えて多糖類を沈殿させた。得られた沈殿物を少量の水に溶解して水に透析後、凍結乾燥したものを粗アラビノガラクトタンとした。

粗アラビノガラクトタンは以下の手順で精製した。粗アラビノガラクトタン 2.0g を 0.2M 水酸化ナトリウム溶液 100ml に溶解し、窒素気流を通じながら室温 (25°C) で 3 時間、ついで 55~60°C で 3 時間攪拌した。冷却後、硫酸で pH7.5 に調整しクロロホルム 80ml、酢酸エチル 120ml 及びジエチルエーテル 120ml で順次抽出した。水層を蒸留水に透析したのち、凍結乾燥したものを精製アラビノガラクトタンとした。

### 1-2-2. 精製アラビノガラクトタンの TLC 分析

精製アラビノガラクトタンの構成糖を TLC で分離検出した。試料 10mg と蒸留水 2ml をネジ付き試験管に入れ、80°C で 30 分間予備加温した。ついで、0.1N トリフルオロ酢酸溶液 2ml 加えて 100°C で 60 分間加水分解した。得られた試料溶液は室温で冷却し、減圧乾固したものを少量の蒸留水に溶かしてサンプルとした。市販アラビノースとガラクトースを標準物質として使用し、シリカゲル 60F<sub>254</sub> プレート (Merck) にスポットした。これを酢酸エチル : 酢酸 : H<sub>2</sub>O / 3 :

3 : 1 (v:v:v) で展開後、リンモリブデン酸で発色させた。

### 1-2-3. 精製アラビノガラクトサンの平均分子量

精製アラビノガラクトサンの分子量をゲル濾過クロマトグラフィーで求めた。50mM NaCl 溶液で膨潤させた Sephadex G-200 ゲルろ過カラム (φ 1.15cm × 80.715cm) に試料溶液を展開した。溶出液中のアラビノガラクトサンは、フェノール-硫酸法<sup>50)</sup>で検出した。標準物質には Pullulan (昭和電工 TKK 製、MW212,000、112,000、22,800、11,800 および 5,900) と Blue dextran 2000 を用いて、その溶出量と標準物質の分子量から回帰式を作成した。回帰式は以下の式を用いた。

$$\text{Mobility} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

$V_o$  = Void volume : ゲルベッドの保水量

$V_e$  = Elution volume : サンプルの溶出量

$V_t$  = ゲルベッドの体積

### 1-2-4. その他の試料

カラマツ由来アラビノガラクトサンは東京化成工業(株)、他の多糖類 (アラビアガム、カードラン、マンナン、カルボキシメチルセルロース、アミロース) は Sigma Chemical Co., (St Louis MO) より購入した。SP-Sephadex C-50 と Sephadex G-100 は Pharmacia (Uppsala, Sweden) より、Ultrafree-4 (限外濾過膜ユニット) は日本ミリポア(株)より購入した。その他の試薬はナカライテスク(株)より購入した。

### 1-2-5. *Aspergillus fumigatus* No.232 の培養

*A. fumigatus* No.232 (Fig. 3) 孢子懸濁液 ( $10^6$ spores/ml) を Table1 に示した培地に接種し、40°Cで7日間培養後、培養ろ液を粗酵素液とした。

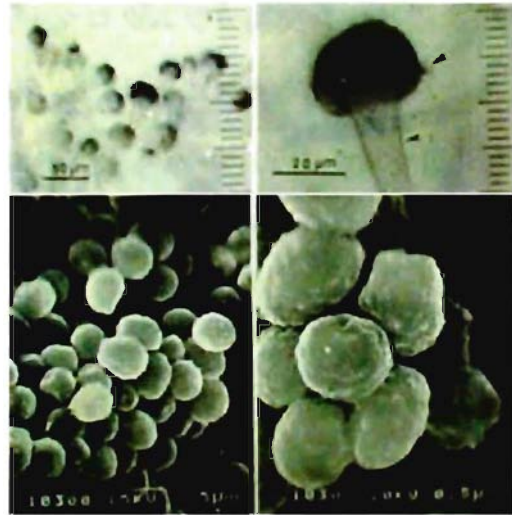


Fig. 3. Light and scanning micrographs of *A. fumigatus* No.232.

### 1-2-6. 酵素活性の測定

1% (w/v) アラビノガラクトランを 0.02M 酢酸緩衝液 (pH4.6) に溶解したものを基質とした。基質 0.1ml に酵素溶液 0.1ml を添加後、45°Cで 30min

間反応させた後、生成した還元糖量を Somogyi-Nelson 法でガラクトースを

基準として定量した。粗酵素液 1ml 当たり 1min 間に  $1\mu$  M 還元糖 (ガラクトースを基準として) を遊離させる活性を 1 単位と定義した。

### 1-2-7. 粗酵素溶液の調製

*A. fumigatus* No.232 をカラマツ由来アラビノガラクトラン添加培地 (Table 1) 5 L に 40°Cで7日間通気攪拌培養 (0.5vvm、100rpm) した。培養液をガーゼと濾紙(東洋濾紙 No.50)で各2回ずつ濾過して菌体と孢子を除去した。濾液は 80% 飽和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  で塩析し、得られた沈殿は 0.02M 酢酸緩衝液(pH4.6)で透析後、Ultrafree-4 限外濾過ユニットを用いて濃縮した。これを粗酵素溶液とした。

Table 1. Composition of culture medium.

Arabinogalactan	0.5
Methionine	0.1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
KCl	0.05
pH	6.0

#### 1-2-8. 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

透析した酵素溶液 (120ml) を 20mM 酢酸緩衝液 (pH 4.6) で平衡化した SP-Sephadex G-50 カラム (2.8×40cm) に吸着させた。同緩衝液で洗浄後、NaCl (0~0.5M) グラジエントをかけてガラクタナーゼを溶出した (60ml/hr)。溶出液は 3ml ずつ分取し、タンパク量とガラクタナーゼ活性を測定して、活性画分を回収した。

#### 1-2-9. Sephadex G-100 によるゲル濾過

得られた活性画分は 0.02M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (1.5×100cm) を用いてゲル濾過 (15ml/hr) した。溶出液は 0.8ml ずつ分取しタンパク量とガラクタナーゼ活性を測定し、活性画分を回収した。

#### 1-2-10. 電気泳動と分子量

12.5%アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE によって分子量を測定した。分子量マーカーには myosin (200,000Da)、*E.coli* 由来  $\beta$ -galactosidase (116,250Da)、ovalbumin (45,000Da)、carbonic anhydrase (31,000Da)、trypsin inhibitor (21,500Da)、lysozyme (14,400Da)、aprotinin (6,500Da) を使用し、Coomassie Brilliant blue R-250(Rapid stain CBB kit, ナカライテスク)でゲルを染色した。

#### 1-2-11. ガラクタナーゼの最適 pH と温度および安定性

##### a) 最適 pH

pH 2.0~8.0 に調製した緩衝液 (pH2.0~3.5, 50mM glycine-HCl buffer ; pH4.0~6.0, 50mM acetate buffer ; pH6.5~8.0, 50mM phosphate buffer)



にアラビノガラクトランを 1% (w/v)となるように溶解させたものを基質に用いて酵素活性を求めた。

#### **b) pH 安定性**

上記緩衝液にガラクタナーゼを透析 (4°C、24 時間) 後、最適 pH で酵素活性を測定し、最も活性が高かった pH での活性値を 100%として相対活性で表した。

#### **c) 最適温度**

20mM 酢酸緩衝液 (pH4.6) に 1% (w/v) アラビノガラクトランを添加したものを基質とし、35°Cから 85°Cの間で 30 分間反応させ、最も活性が高かった温度を 100%として相対活性で表した。

#### **d) 熱安定性**

35~85°Cで 30 分間酵素溶液をインキュベートした後冷却、最適温度で酵素活性を測定した。最も活性が高かった値を 100%として相対活性で表した。

#### **e) 金属塩が酵素活性に与える効果**

8種類の金属イオン ( $Mn^{2+}$ 、 $Li^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Hg^{2+}$ ) と EDTA、DTT(Dithiothreitol)を 1mM 添加したときのガラクタナーゼ活性を、対照 (無添加) を 100%とする相対値で表した。

#### **f) 酵素動力学的特徴**

20mM 酢酸緩衝液 (pH 4.6) に溶解した 1~10% (w/v) 生豆由来アラビノガラクトランもしくはカラマツ由来アラビノガラクトランを基質とし、45°Cで 30 分間酵素反応させたときの還元糖生成速度を Lineweaver-Burk プロットで表示し

$K_m$  値と  $V_{max}$  値を求めた。

#### g) 基質特異性

9種類の基質（コーヒー豆由来アラビノガラクトサン、カラマツ由来アラビノガラクトサン、アラビアガム、カードラン、キシラン、マンナン、カルボキシメチルセルロース、ペクチンおよびアミロース）を 20mM 酢酸緩衝液（pH4.6）に 1%（w/v）となるように溶解し酵素活性を測定した。生豆由来アラビノガラクトサンを基質としたときの酵素活性を 100%として相対活性値で表した。

#### 1-2-12. アラビノガラクトサン分解試験

0.5%（w/v）アラビノガラクトサンを溶解した 20mM 酢酸緩衝液（pH4.6）70ml にガラクトナーゼを終濃度 4mg 添加後、45°Cで反応させた。反応液を 0.5、1、2、3、4、5、6、12、24、48 および 72 時間後に 1ml ずつ取り出し、Somogyi-Nelson 法で還元糖を定量した。また取り出した反応液に 99.5%エタノールを 3 倍量加え、遠心分離(10000rpm、10min)して未反応の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-アラビノガラクトサンを沈殿させた。この上清に含まれる全糖量をフェノール硫酸法で定量して、分解率を求めた。

#### 1-2-13. 酵素反応生成物の薄層クロマトグラフィー試験

20mM 酢酸緩衝液(pH4.6)に 1%（w/v）コーヒー豆由来アラビノガラクトサンとガラクトナーゼ（40mU/ml）を加え、45°Cで反応させた。一定時間ごとにサンプリングし 2M 酢酸を加えて反応を停止しさせた。反応液をシリカゲル薄層プレートにスポットし 1-propanol : ethanol : H<sub>2</sub>O /7 : 1 : 2（v:v:v）で展開後、硫酸を噴霧、加熱してスポットを発色させた<sup>52)</sup>。

## 1-2-14. オリゴ糖資化試験

酵素反応生成物の微生物資化試験を行った。まず  $\beta$ -(1→3)-D-アラビノガラクトタンをガラクタナーゼで処理して、得られた分解物を活性炭カラムクロマトでアラビノース、ガラクトースおよび  $\beta$ -(1→6)-D-ガラクトビオースに単離した。生成物は TLC 分析で同定した。資化試験には腸内細菌 4 属 7 種 10 株

Table 2. Culture strains for viability test.	
Strain	
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192T	( <i>Bifidobacterium</i> 属 3 種 7 株、
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1273	<i>Lactobacillus</i> 属 2 種 2 株、
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7016	<i>Escherichia coli</i> 1 株、 <i>Serratia</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1255T	<i>marcescens</i> 1 株) を用いた (Table
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1209	2)。
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1254	<i>Bifidobacterium</i> 属の培地には
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217T	Casein peptone(Difco Lab.) 10.0g、
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 3070	Yeast extract (Difco) 5.0g、Meat
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NBRC 14252	extract (Difco) 5.0g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3.0g、
<i>Escherichia coli</i> NBRC 3070	Tween80 1.0ml、精製水 1000 ml、
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 3046	

pH 6.8 を使用した。高圧滅菌 (121°C、20 分) 後、濾過滅菌したアスコルビン酸と L-cystein-HCl を最終濃度 1.0% および 0.05% になるよう無菌的に添加した。炭素源 (グルコース、アラビノース、ガラクトースおよび  $\beta$ -(1→6)-D-ガラクトビオース) も濾過滅菌し、最終濃度 0.5% となるよう添加した。

供試株はグルコースを炭素源とした同培地で前培養 (37°C、24 時間) し、 $1.0 \times 10^6$  cfu/tube となるように接種した。資化性の有無または強弱は培養液の pH の低下で判定した。つまり、pH 4.5 未満のものを(+++), pH 4.5 以上 5.0 未満のものを(++), pH 5.0 以上 5.5 未満のものを(+), pH 5.5 以上 6.0 未満のものを(±), pH 6.0 以上のものを(-)で表示した。

### 1-3. 実験結果および考察

#### 1-3-1. コーヒー抽出残渣からアラビノガラクトタンの抽出

コーヒー抽出残渣 100g (水分 7%) を 1000  $\mu$ m 未満に破碎し、蒸留水 1500ml に懸濁後、121°C で 3 時間加熱抽出した。得られた抽出液上清に 4 倍量のエタノールを加え、粗アラ

ビノガラクトタン

2.48g (dry weight)

を沈殿させた (収率

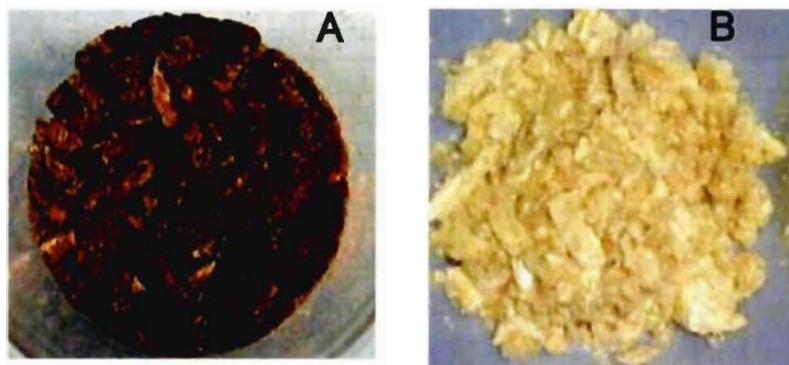
2.7%)。粗アラビノ

ガラクトタンから精製

アラビノガラクトタン

1.08g を得た (収率

1.1%) (Fig. 4. A, B)。

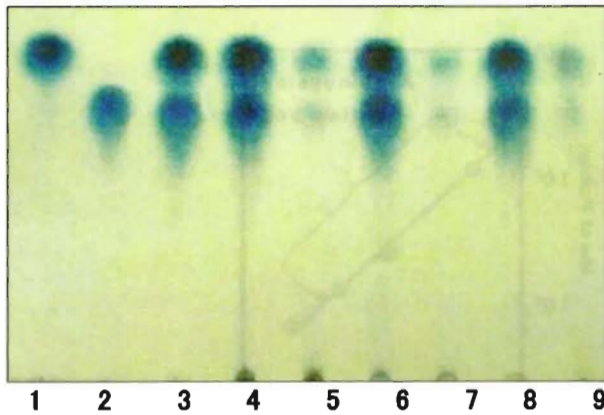


**Fig. 4.** Arabinogalactan from coffee bean.

A, crude arabinogalactan; B, purified arabinogalactan.

#### 1-3-2. アラビノガラクトタン (AG) 酸加水分解物の TLC 分析

3 種類のアラビノガラクトタン (粗 AG, レーン 5 ; 精製 AG, レーン 7 ; 市販カラマツ由来, レーン 9) を酸加水分解し、得られた分解物を TLC 分析したところ、いずれのアラビノガラクトタンからもアラビノースとガラクトースのみ検出された。この結果から、コーヒー抽出残渣から単離した標品はアラビノガラクトタンであることを明らかにした (Fig. 5)。



**Fig.5.** TLC of hydrolysates of coffee bean and larch wood arabinogalactan(AG) by trifluoroacetic acid hydrolysis.

1 , arabinose ; 2 , galactose ; 3 , arabinose+galactose ; 4 , hydrolysates of crude coffee bean AG+ arabinose + galactose ; 5, hydrolysates of crude coffee bean AG ; 6, hydrolysates of coffee bean AG + arabinose + galactose ; 7, hydrolysates of purified coffee bean AG ; 8, hydrolysates of larch wood AG ; 9, hydrolysates of larch wood AG + arabinose+galactose

### 1-3-3. コーヒー抽出残渣から抽出したアラビノガラクトンの平均分子量

精製アラビノガラクトンを SephadexG-200 カラムクロマトグラフィーに供したところ、ブロードなピークを示した (Fig. 6)。ゲルろ過から求めた精製アラビノガラクトンの分子量(モード値)は 122,000、分子量分布は 122,000~7,500 であった (Fig. 7)。北畠はカラマツから抽出した Type II アラビノガラクトンの分子量を測定し、シベリア産 18,400、北海道産 18,700、長野県産 21,400 と報告している<sup>53)</sup>が、これらの値と比較するとコーヒー抽出残渣から抽出したアラビノガラクトンの分子量は大きかった。また分子量分布も 122,000~7,500 で、カラマツ由来のアラビノガラクトンと比較するとばらつきが大きかった。

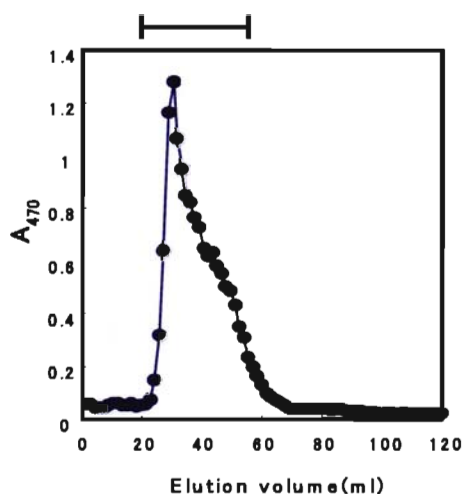


Fig. 6. GPC-chromatography of arabinogalactan from coffee bean.

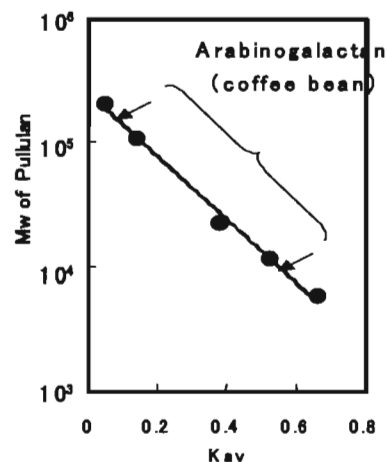


Fig. 7. Molecular weight of arabinogalactan from coffee

#### 1-3-4. *A. fumigatus* No.232 の培養

*A. fumigatus* No.232 は 0.5%アラビノガラクトランを唯一の炭素源とする培地で良好に成育し、培養液中の $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-ガラクターナーゼ活性は菌糸の増殖とともに上昇し、培養7日後にもっとも高くなった。

#### 1-3-5. 酵素の精製

培養ろ液中のガラクターナーゼは4段階のステップで精製した (Table 3)。

Table 3. Summary of purification of galactanase from *A. fumigatus* No.232.

	Volume(ml)	Protein (mg)	Enzyme Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Yield(%)	Fold
culture filtrate	4500.0	725.1	135.0	0.19	100.0	1.0
ammonium sulphate	478.1	70.0	34.4	0.49	9.7	2.6
SP-Sephadex G-50	135.0	22.1	33.1	1.50	3.0	8.1
Sephadex G-100	126.6	9.2	32.9	3.57	1.3	19.2

The standard assay reaction contained a 1% solution of the arabinogalactan(w/v)from coffee bean in 20mM acetate buffer (pH 4.6), and was incubated with the enzyme preparation at 40°C for 30min in a total volume of 0.4ml. The reaction mixture was stopped by adding 0.2ml of Nelson 's reagent.

硫酸塩析で得られた沈殿を透析後、SP-Sephadex G-50 カラム (2.8×40cm) に吸着させ、NaCl (0~0.5M) グラジエントをかけて溶出したところ、1本のガラクターナーゼピークが得られた(Fig. 8A)。活性画分を濃縮し、Sephadex G-100 カラム (1.5×100cm) でゲル濾過したところ、1本のガラクターナーゼピークが得られた(Fig. 8B)。この精製酵素は SDS-PAGE で単一バンドを示し(Fig. 9)、19.2倍精製され、回収率は1.3%であった。

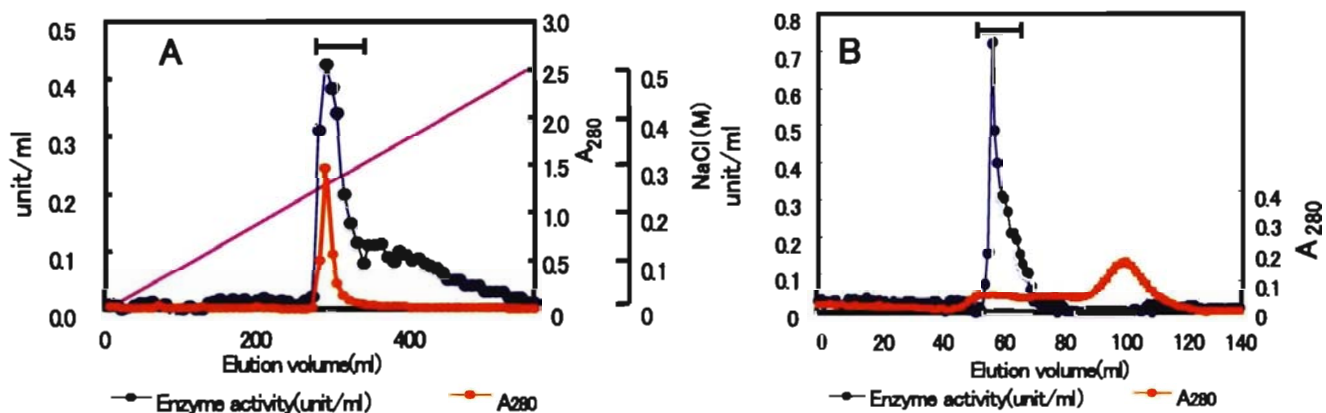


Fig. 8. Purification of galactanase from *Aspergillus fumigatus* No.232.

A: SP-Sephadex G-50    B: Sephadex G-100

### 1-3-6. ガラクタナーゼの分子量

分子量マーカーと一緒に SDS-PAGE した精製酵素の分子量は 86,000Da と推定された (Fig. 9)。一方、Sephadex G-100 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで求めた native 酵素の分子量は 80,000Da であったことから、*A. fumigatus* No.232 が生産したガラクタナーゼは分子量 80,000~86,000 のモノマータンパク質であることを明らかにした。

No.232 株が生産するガラクタナーゼの分子量 (86,000Da) は、*Irpex lacteus* のガラクタナーゼ (51,000Da) や *Aspergillus niger* (66,000Da) が生産する酵素と比較して大きかった。しかし *A. fumigatus* が生産する酵素は、65,000~130,000Da と報告されており<sup>54-60)</sup>、本酵素の分子量も既報の結果と類似していた。

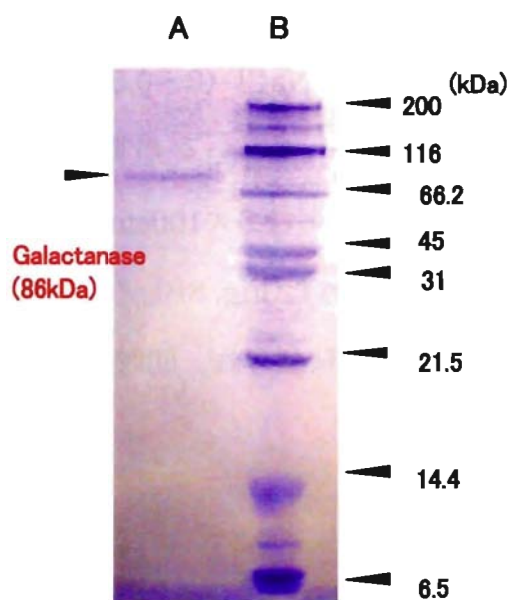


Fig. 9. SDS-PAGE of purified galactanase from *A.fumigatus* No.232.

Lane A, purified galactanase (2  $\mu$  g).

Lane B, Molecular weight markers of protein standards.

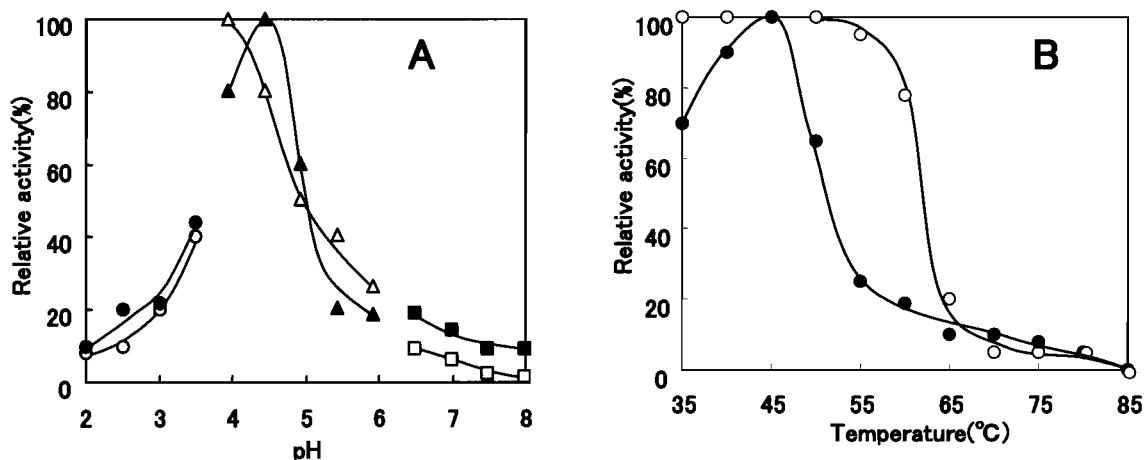
### 1-3-7. 精製酵素の最適 pH と温度および安定性

本酵素の最適 pH は 4.6 で、pH 8.0 以上もしくは pH 2.0 以下では 10%以下の活性しか示さなかった。また pH 4.0 で最も安定であり、pH 8.0 以上では活性を示さなかった。本酵素の最適反応 pH 4.6 は *Aspergillus niger*<sup>46)</sup> 由来のガラクタナーゼ (pH4.6) や *Irpex lacteus*<sup>52)</sup> (pH 4.6)、*Rhizopus niveus*<sup>47)</sup> (pH 5.0) と同じように酸性域にあった。既報のガラクタナーゼは pH 4.0, 4°Cで 24 時間保



存したときも安定であったが、本酵素の pH 安定域は pH3.5~5.0 の範囲で狭かった。

本酵素の最適温度は pH4.6 のとき 45°C で、50°C 以下で 30min 保持しても失活しなかった。しかし、70°C で 30min 保つと 10% 以下に失活した (Fig. 10)。既報のガラクタナーゼは 50°C 以下でも失活しなかったが、アッセイ系のインキュベート時間が短い (10 分) ため、単純に比較できない。本酵素は 50°C で 30 分インキュベートしても、活性を 100% 保持していたことから、既報の酵素より熱安定性は高いと思われる。



**Fig. 10.** Effect of pH and temperature on stability and activity of galactanase from *A. fumigatus* No.232.

The reaction conditions are described in the text. A, Effect of pH on activity (●:glycine-HCl buffer, ▲:acetate buffer, ■:phosphate buffer) and stability(○:glycine-HCl buffer, △:acetate buffer, □:phosphate buffer). B, Effect of temperature on activity (●) and stability(○).

### 1-3-8. 金属塩が酵素活性に与える効果

1mM  $Mn^{2+}$ と  $Cu^{2+}$ は精製ガラクタナーゼ活性を 60.2%と 72.4%に低下させ、 $Hg^{2+}$ は酵素を完全に失活させた (Fig. 11)。EDTA は活性を全く阻害しなかったことから、本酵素は活性の発現に金属を要求しないと考えられる。

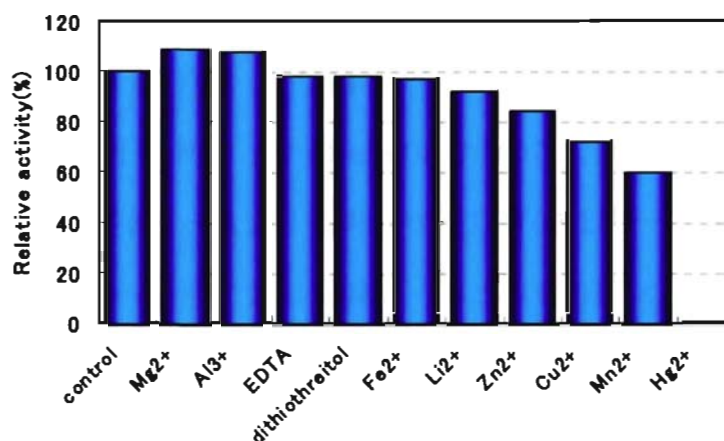


Fig. 11. Effect of various compounds on galactanase activity.

The enzyme was preincubated with 1mM various chemicals at 45°C for 1h in 20mM acetate buffer. Residual activities were then assayed under the standard conditions.

### 1-3-9. 酵素の動力学的特徴

基質にコーヒー豆とカラマツ由来のアラビノガラクトンを用いて、基質濃度が酵素活性に与える効果を検討した。本酵素の生豆由来アラビノガラクトンに対する  $K_m$  値 0.89mg/ml で、カラマツ由来アラビノガラクトン (4.74mg/ml) に比べて小さかったことから、本酵素はコーヒー生豆由来アラビノガラクトンに高い親和性をもっていた (Fig. 12)。本酵素は  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-ガラクトシル結合をもつ主鎖を加水分解して、アラビノガラクトン側鎖は分解しない。一方、カ

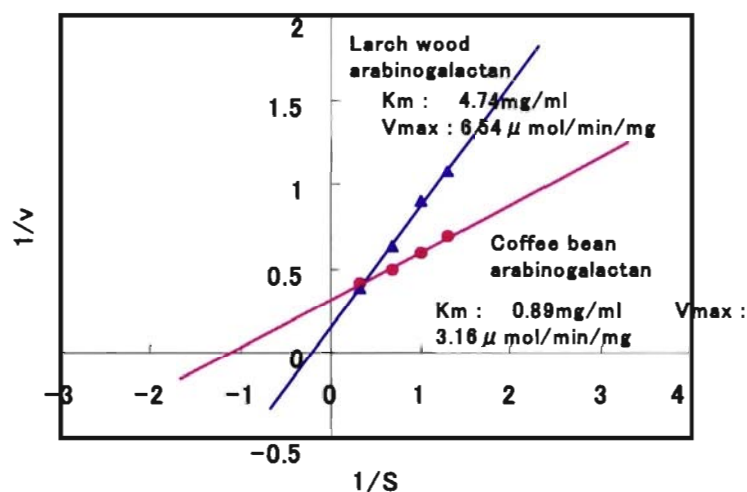


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots of galactanase from *A.fumigatus* No.232 against arabinogalactan.

●, coffee bean; ▲, larch wood.

ラマツ由来アラビノガラクトタンは、生豆由来アラビノガラクトタンよりも  $\beta$ -(1→6)-D-ガラクトシル結合をもつ長い分岐側鎖が結合している<sup>47, 61)</sup> ので、本酵素が作用しにくいと考えた。本酵素の *K<sub>m</sub>* 値は 既報の *A. fumigatus* 生産ガラクタナーゼと比べて低く、アラビノガラクトタンに対して高い親和力をもつことが示唆された。

*V<sub>max</sub>* 値は生豆由来アラビノガラクトタン (3.56  $\mu$  M/min/mg) よりカラマツ由来アラビノガラクトタン (6.54  $\mu$  M/min/mg) が高かった。

### 1-3-10. ガラクタナーゼの基質特異性

本酵素はアラビノガラクトタン (コーヒー豆およびカラマツ由来) 以外にアラビアガム、 $\beta$ -(1→3)-D-グルカン結合をもつカードランからも還元糖を遊離した (Fig. 13)。キシランやマンナン、ペクチンからも分解物が若干確認された。分解物の糖組成を分析したところ、いずれもガラクトースが検出されたことから基質に混在していたガラクトタンが分解されたと考えられる。本酵素は  $\beta$ -(1→4)-グルコシド結合や  $\alpha$ -(1→4)-グルコシド結合をもつカルボキシメチルセルロースやアミロースには作用しなかった。

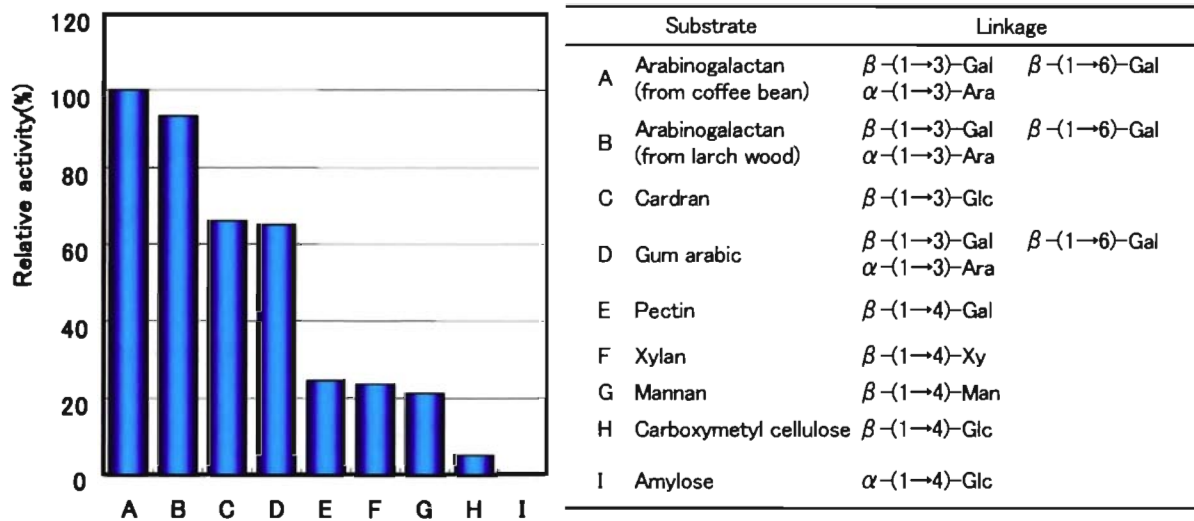


Fig. 13. Substrate specificity of galactanase on the various substrates.

Reaction mixtures (1.0ml) contained various polysaccharides (1%, w/v) and the enzyme (0.04units/ml) in 20mM acetate buffer (pH 4.6).

### 1-3-11. $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-アラビノガラクトン分解試験

0.5%(w/v)アラビノガラクトンを基質として本酵素を反応させたとき、反応に伴って還元糖が遊離し、反応後 24 時間でほぼ定常状態になった。このとき遊離

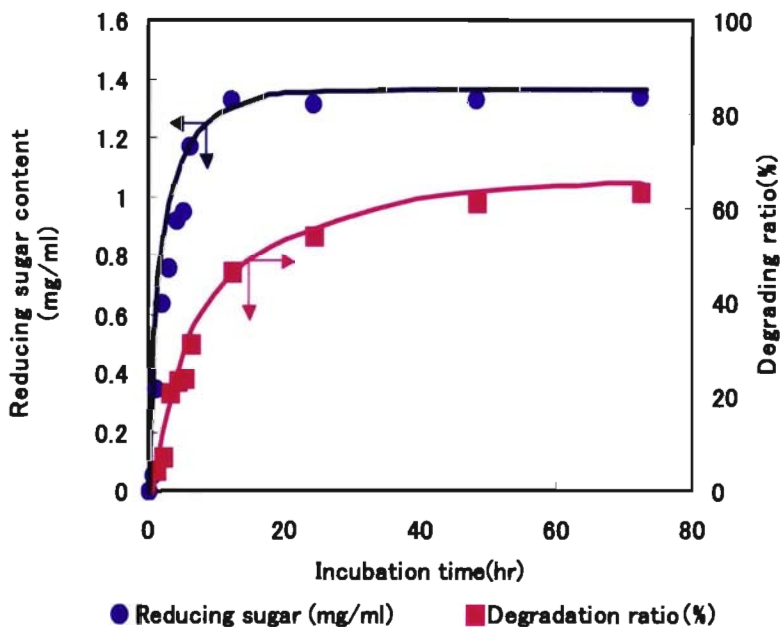


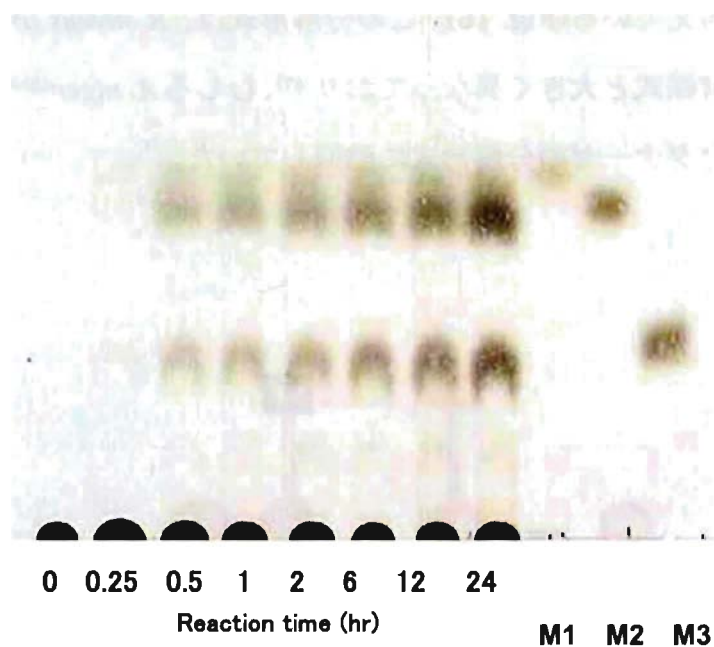
Fig. 14. Hydrolysis of arabinogalactan from coffee bean by galactanase.

Reaction mixture, consisting of 70ml of a 0.5%(w/v)arabinogalactan solution in 20mM acetate buffer(pH4.6) and galactanase(4mg protein) ,were incubated at 45°C.

した還元糖は 1.34mg/ml であった。遊離した全糖量（エタノールで沈殿しなかった糖類）を定量し分解率を求めたところ、反応 24 時間後で 63.0%に達した (Fig.14)。Hashimoto は<sup>47)</sup>コーヒー豆由来のアラビノガラクトランを *Rhizopus niveus* の生産する酵素で分解しているが、本酵素活性は Hashimoto らの 7.1 倍であった。

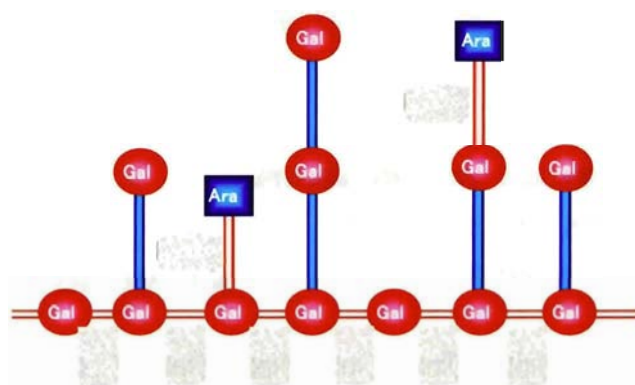
#### 1-3-12. アラビノガラクトラン酵素分解物の TLC 分析

コーヒー豆由来のアラビノガラクトランに精製酵素を加えてインキュベートし、経時的にサンプリングした反応液を薄層クロマトグラフィーで分析した結果、反応初期の段階からアラビノース、ガラクトースおよびオリゴ糖とほぼ同じ位置にスポット (Rf 0.67, Rf 0.62, Rf 0.36) が出現した (Fig. 15)。Rf 0.36 のス



**Fig. 15.** TLC of hydrolysis products from arabinogalactan by galactanase. A reaction mixture (1.0ml) containing arabinogalactan from coffee bean (1%,w/v) and the enzyme (0.04U/ml) in 20mM acetate buffer (pH 4.6) was incubated at 40°C. At intervals, the reaction was stopped by boiling and each sample (15  $\mu$ l) was then spotted on a TLC plate. Markers (M) : M1,Arabinose; M2,Galactose; M3,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)- D-Galactobiose (reagent).

ポットをかき取り抽出後、活性炭カラムクロマトグラフィーで精製した。得られた物質を酸分解（1M トリフルオロ酢酸によって 100°C、2 時間加熱）、もしくは *E. coli* 由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼで加水分解して、生成物がガラクトース 2 量体であることを確認した。またこのスポットは市販  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトビオースと同じ Rf 値を示したことから、Rf 0.36 のスポットをガラクトビースと同定した。また、酵素反応開始初期から  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトビオースと微量のガラクトトリオース(Rf 0.15)と思われるオリゴ糖を蓄積したことから、コーヒー豆由来のアラビノガラクトタン側鎖の重合度は 2~3 個と推察される。従って本酵素は  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-あるいは  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-結合を選択的に切断してアラビノース、ガラクトースを遊離させ、分解されなかった  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-結合をもつオリゴ糖が残る形式で分解されると考えている(Fig. 16)。この分解形式は、*R. niveus* が生産するガラクタナーゼの分解様式と大きく異なっており<sup>47)</sup>、むしろ *A. niger*<sup>45)</sup>や *I. Lacteus*<sup>52)</sup> が生産するガラクタナーゼの分解形式に酷似していた。



**Fig. 16.** Diagrammatic representation of degradation of coffee bean arabinogalactan by galactanase. Arrows indicate that the action of galactanase.

### 1-3-13. 腸内細菌によるオリゴ糖の資化性

コーヒー抽出残渣から調製した Type II アラビノガラクトタンを本酵素で分解し、得られた  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトビオースとグルコース、アラビノース、ガラクトースの腸内細菌による資化性を、PYF 液体培地を用いた嫌気培養 (37°C で 96 時間) した培養液の pH 変化から判定した。 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-ガラクトビオースは *Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus plantarum* によって資化され酸を生成した (Table 4) ことから、腸内の善玉菌の生育を促進し酸を生産させることにより悪玉菌の増殖を抑制するプロバイオティックな効果が期待される。

Table 4. Effect of glucose, arabinose, galactose and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactobiose on the viabilities of various microorganisms

Strain	Glucose	Galactose	Arabinose	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galactobiose
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192T	+++	++	++	+++
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1273	++	++	+	++
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7016	++	++	+	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1255T	++	++	+	++
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1209	++	++	+	+++
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1254	++	++	+	+++
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217T	+++	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 3070	++	++	-	+++
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NBRC 14252	+++	+++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i> NBRC 3070	+	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 3046	+	+	-	-

### 1-4. まとめ

*A. fumigatus* No.232 の培養液から  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-ガラクタナーゼ (EC 3.2.1.90) をイオン交換クロマトグラフィー (SP-Sephadex G-50)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-100) によって、電気泳動的に均一になるまで精製した。精製酵素の分子量は 86kDa で、最適 pH は 4.0、温度は 45°C であった。本酵素は pH4.0、45°C 以下で最も安定で、Hg<sup>2+</sup> イオンにより完全に失活した。

ガラクタナーゼの Michaelis 定数 ( $K_m$ ) は、コーヒー豆由来アラビノガラクトタンを基質にしたとき 0.89mg/ml で、最大反応速度( $V_{max}$ ) は 3.16units/mg であった。本酵素は、Type II アラビノガラクトタンのような  $\beta$  - (1→3)結合や  $\alpha$  - (1→3)結合を加水分解し、酵素反応の初期段階からアラビノース、ガラクトース、ガラクトビオースに分解したことから、exo 型分解様式をもつ酵素と思われる。

ヒト腸内フローラ構成菌種に対するこれらの糖の資化性を調べた。 $\beta$  -(1→6)-D-ガラクトビオースは *Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus plantarum* に資化され多量の酸を生成して培養液の pH を低下させた。一方腸内有害菌である *Escherichia coli* および *Serratia marcescens* にも資化されたが、酸は生成されなかった。これらの結果からコーヒー生豆から抽出したアラビノガラクトタンを酵素分解して得たオリゴ糖には、ヒト腸内フローラの改善効果をもつことを明らかにすることができ、プロバイオティクスとしての応用が期待される。



## 第二章 コーヒー生豆に含まれるクロロゲン酸類の分離とその機能性評価

### 2-1. 緒言

コーヒー生豆の品質は、栽培種、栽培地、収穫期、精製方法（水洗式、乾式）、輸送、保存など様々な要因で決定されるが、輸入生豆の品質は、成熟するまでに摘果したり、強風などで落下してしまった未熟果の混入割合によって大きく左右される。等級の低い生豆ロットには欠点豆の混入率が高く、とくに未熟果の混入割合がコーヒーの等級を決定する最も大きな要因となっている。

コーヒー生豆にはクロロゲン酸類が4~10%含まれている。現在商業的に栽培されているコーヒーの多くはアラビカ種(*Coffea arabica*)とロブスタ種(*Coffea canephola ver. robusta*)で、ロブスタ種の生豆には80~100mg/gのクロロゲン酸類が含まれており、アラビカ種と比較してその含有量は有意に高いことが明らかにされている<sup>62)</sup>。このクロロゲン酸類に注目して、機能性食品素材として積極的に利用していくためには、まずコーヒー生豆中のクロロゲン酸含有量を、果実の成熟度、産地、銘柄ごとに正確に把握しておく必要がある。そこでまずコーヒー果実の成熟度と生豆中のクロロゲン酸類量の関連性を調べた。

De Menezes<sup>63)</sup>は、コーヒー豆の成熟に従って全クロロゲン酸類(CQA、FQA、diCQA)に占めるクロロゲン酸(CQA)の割合が高くなると報告している。つまり未成熟果ではジカフェオイルキナ酸(diCQA)の含有比率が高く、これがコーヒーの品質とくに味覚バランスに悪い影響を与えるといわれている。これら等級の低いコーヒー豆は市場に出まわらないで廃棄されることが多い。そこで我々は、これら低級豆に含まれるクロロゲン酸類を機能性食品素材として活用する方法を検討した。

クロロゲン酸類は、顕著な抗酸化活性<sup>64, 65)</sup>、肝保護活性<sup>66-68)</sup>、HIVインテグラーゼ阻害<sup>69-72)</sup>、マクロファージの活性化<sup>73)</sup>など様々な生理機能を有している。

また 5-CQA にはリノレン酸の脂質過酸化抑制効果<sup>64)</sup>が、1,3-diCQA には $\gamma$ 線照射によって引き起こされる 5-CQA の酸化抑制効果が報告されている<sup>65)</sup>。

しかし、コーヒー生豆に含まれているCQAやフェルラ酸 (FQA)、diCQA異性体のもつ様々な機能性を同一条件下で比較した研究は著者の知る限りまだない。そこで、コーヒー生豆からCQA、FQA、diCQA異性体を単離し、それらの機能性を *in vitro*, 同一条件下で比較した。さらにクロロゲン酸類を機能性食品素材として応用していくにあたって、消費者に馴染みやすい缶コーヒーへの応用を考え、缶コーヒーに添加したクロロゲン酸類の製造工程中での変動について分析した。

## 2-2. 実験材料および実験方法

### 2-2-1. 試料

鹿児島県内で栽培されているアラビカ種果実を成熟度の異なる時期に採取し、測色色差計 (CR-300、MINOLTA 株式会社) を用いて色差 (Lab 値) を測定した。そして色調の違いに基づいて採取果実を 7 段階に分類した (Fig. 17, 18)。

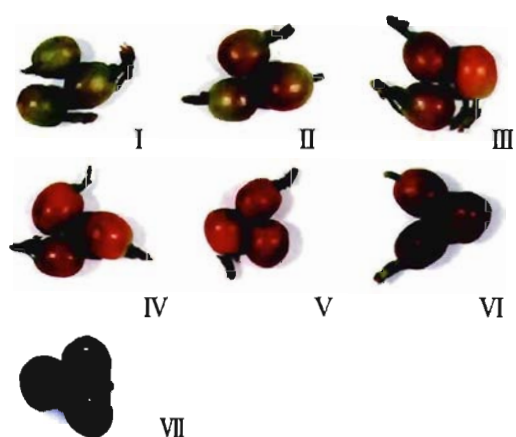


Fig. 17. Coffee cherry samples.

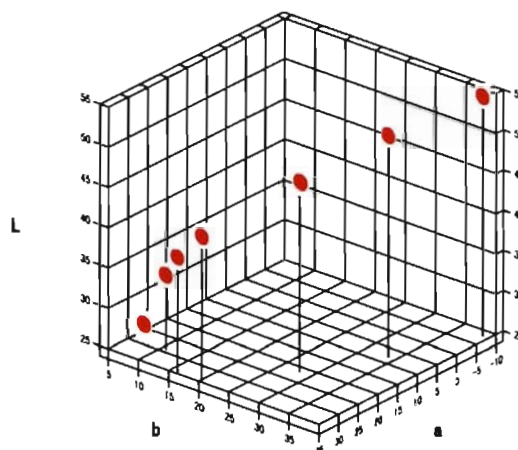


Fig. 18. Color tone of coffee cherry

## 2-2-2. コーヒー果実

### から生豆の単離

まず果肉とパーチメント（種殻）付きのコーヒー豆に分離した後、得られたパーチメントコーヒーを天日で1日乾燥してから、パーチメントとシルバースキン（種皮）を除去して生豆を得た（Fig. 19）。

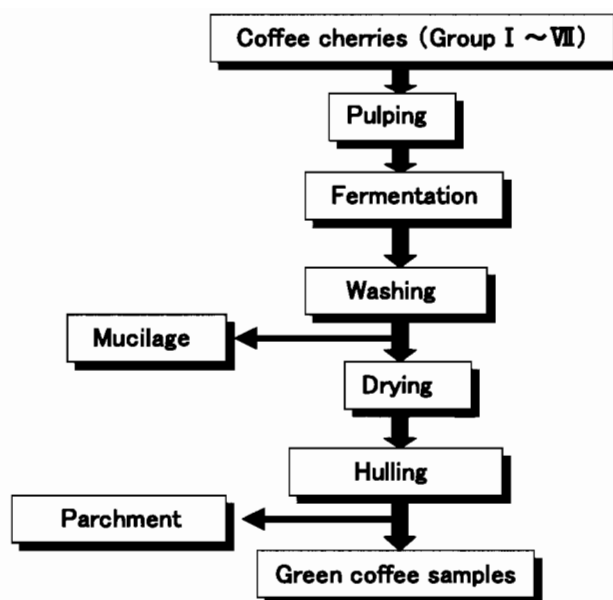


Fig. 19. Preparation for the samples (wet processing method).

## 2-2-3. 官能試験

テストロースター（プロバット社、BRZ-4）を用いて7試験区から得た生豆をミディアムローストになるように焙煎した後、コーヒーミル（BONMAC、BM-570M）で細挽きに粉砕した。官能試験には、粉砕した焙煎豆10gに熱水150mlを注ぎペーパーフィルターを用いて抽出したコーヒーを用いた。官能試験はパネラー10名で行った。カテゴリーは酸味、苦味、渋味、濃厚感、後味の5つとし、尺度は-3~+3の7段階に分けて絶対評価した。また異味、異臭の評価とその強度は0~+6の7段階で評価した。

## 2-2-4. クロロゲン酸類の分離定量

生豆は液体窒素で凍結後、粉砕機（分析粉砕機 R-8、日本理化学機械株式会

社) を用いて 1.0mm のふるいを通過するサイズに粉碎し試料とした。試料は 70%(w/v)メタノールで 20 分間還流抽出をおこない、3 回抽出を繰り返した後、定容した。限外ろ過した試料中のクロロゲン酸類 (異性体組成) は、HPLC で定量した<sup>74)</sup>。定量は市販クロロゲン酸 (5-CQA) を用いて Clifford らの吸光度比に基づいておこなった<sup>75)</sup>。この方法で定量した 5-CQA の添加回収率は 94.9 ~103.9%(n=5)であった。

## 2-2-5. 市場コーヒー生豆中のクロロゲン酸異性体の組成

供試試料には 17 産地、31 銘柄のコーヒーを用いた (Table 5)。

Table 5. Analytical samples of coffee bean.

<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephola</i> var. <i>robusta</i>
BRAZIL SANTOS No.2 #18	INDONESIA WIB
BRAZIL SANTOS No.4/5 #14/16	INDONESIA AP-1
COLOMBIA EXCELSO	INDONESIA EK-1
COLOMBIA MARAGO	INDONESIA MANDHELING
COLOMBIA SUPREMO	INDONESIA TORAJA
CUBA CRYSTAL MOUNTAIN	IVORY COAST
DOMINICA	UGANDA
EL SALVADOR	VIETNAM
ETHIOPIA MOCHA DJIMMAH	
ETHIOPIA MOCHA SIDAMO	
GUATEMALA E..P.W	
GUATEMALA SHB	
HAWAII KONA EXTRA FANCY	
HAWAII KONA No.1	
INDIA	
JAMAICA BLUE MOUNTAIN No.1	
JAMAICA PEABERRY	
JAMAICA PRIMEWASHED	
KENYA AA	
MEXICO E..P.W	
NICARAGUA	
PERU CHANCHAMAYO	
TANZANIA KIBO	

## 2-2-6. コーヒー生豆からクロロゲン酸類の単離

等級の異なる生豆からクロロゲン酸類を単離した。供試生豆には 2002 年に収穫されたインドネシア産ロブスタ種を使用し、等級の低い生豆には EK-1 grade4(ジャワ島産)を、等級の高い生豆には WIB (スマトラ島産) を用いた。カフェー酸、キナ酸、3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (3,4-diOH HCA) は SIGMA-Aldrich (St.Louis, MO)、Sephadex LH-20 は Amersham Biosciences AB (Uppsala, Sweden) から購入した。他の分析用試薬はナカライテスク (京都) から購入した。

## 2-2-7. クロロゲン酸類の単離方法

コーヒー生豆中のクロロゲン酸類は Uritani らの報告を参考に単離した<sup>76)</sup>。

2 種類の供試生豆 100 g を粉碎し、70% (v/v) メタノール水溶液 1 L を加えて 80 °C で 20 分間、3 回抽出を繰り返した。抽出液は 50 ml まで減圧濃縮後、4 °C に 48 時間保ってクロロゲン酸類とカリウムイオン、カフェインが等モルずつ会合した黄褐色の沈殿を得た<sup>76, 77)</sup>。この沈殿物に飽和酒石酸溶液を加えて生成した酒石酸カリウムの白色沈殿を除去した。つぎにクロロホルムを添加してクロロホルム層に移行したカフェインを除去した。水層を Sephadex LH-20 カラム (450×26 mm i.d.) に供し、0.2% (v/v) 酢酸溶液にメタノール濃度勾配 (0-70 %) をかけて展開した (60 ml/h)。溶出液は 325 nm の吸光度を測定した。得られたピークを回収、濃縮した後、分取 HPLC PLC-561 system (GL Sciences Inc.) で目的のピークを分取した。分離条件を Table 6 に示した。

Table 6. Preparative condition of chlorogenic acids

column	Inertsil ODS-3 250 × 19 mm i.d. (GL Sciences Inc.)
column temp	40°C
mobile phase	solvents A (20% CH <sub>3</sub> OH in 0.2% acetic acid) and B (methanol)
gradient	0.0 min, A=100%, 60.0 min, A: B=1:1, 70.0 min, B=100 %, 80.0 min, A=100 %
detection	UV 326 nm.

※All samples were eluted at 15 ml/min.

各ピークフラクションは再び Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーをおこなって精製した。精製クロロゲン酸類は凍結乾燥を行ってから $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 2-2-8. 単離したクロロゲン酸類の構造解析

高速原子衝突イオン化質量分析(FAB-MS)にはJEOL Tandem-MStation JMS-700 TKM mass spectrometer (JEOL Ltd.,)を用いた。UVスペクトルはU3310 spectrometer (日立製作所)、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルはJEOL GSX-500 (500MHz) (JEOL Ltd.,)を用いて測定した。

#### 2-2-9. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉活性

DPPH ラジカル捕捉活性は、Yoshikawa ら<sup>78)</sup>の方法に従って測定した。0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5) 2.0mlに 500ml/L エタノール-0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5)に溶解したクロロゲン酸類溶液 2.0ml と 0.2mM DPPH (ナカライテスク)-エタノール溶液 1.0ml を添加して、室温、暗黒条件下で正確に 30 分保った後、その溶液の吸光度 (517nm) を測定した。クロロゲン酸類の濃度を変えて吸光度を測定し、横軸にクロロゲン酸類濃度、縦軸に吸光度をプロットしてグラフを描き、近似曲線から DPPH ラジカルの吸光度(クロロゲン酸類無添加のコントロール)を 50%減少させるのに必要なクロロゲン酸類濃度 (50% reduction) を算出した。比較対照にはキナ酸、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (3,4-diOH HCA) を使用した。

#### 2-2-10. スーパーオキシドアニオン消去活性

スーパーオキシドアニオン消去活性は Xanthine-Xanthine oxidase (XOD) 系を用いてスーパーオキシドフリーラジカルを産生させる Matushige ら<sup>79)</sup>の方法に従って測定した。0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 10.2) 700  $\mu\text{l}$ に 3mM キサンチン 50

$\mu\text{l}$ 、3mM EDTA  $50\mu\text{l}$ 、1.5mg/ml 牛血清アルブミン  $50\mu\text{l}$ 、0.75mM ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)  $50\mu\text{l}$  とクロロゲン酸類溶液  $50\mu\text{l}$  を添加して室温で 10 分間保った。この溶液に 1unit/ml XOD (ナカライテスク) を  $50\mu\text{l}$  添加し  $25^{\circ}\text{C}$  で 20 分間保ってから、6mM  $\text{CuCl}_2$  を  $50\mu\text{l}$  添加して反応を停止させ、吸光度 (560nm) を測定した。クロロゲン酸類の濃度を変えて吸光度を測定し、横軸にクロロゲン酸類濃度、縦軸に吸光度をプロットしてグラフを描き、近似曲線からコントロール (クロロゲン酸類無添加) の吸光度を 50% 減少させるのに必要なクロロゲン酸類濃度 (50%reduction) を算出した。比較対照にはカフェー酸、3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (3,4-diOH HCA) を用いた。

#### 2-2-11. チロシナーゼ阻害活性

クロロゲン酸類のチロシナーゼ阻害活性は Tada<sup>80)</sup>らの方法をもとに L-チロシンと L-DOPA を基質に用いて行った。

##### a) L-チロシンを基質としたチロシナーゼ阻害活性

0.55mM L-チロシンと 10mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)、マッシュルームチロシナーゼ 60units、クロロゲン酸類を含む反応液 2ml を  $37^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させた後、475nm の吸光度を測定した。チロシナーゼ阻害活性はコントロールに対する比をチロシナーゼ阻害活性とし、次式によりもとめた。

$$\text{チロシナーゼ阻害活性(\%)} = [A - (B - C)] / A \times 100$$

A = 供試試料を添加していない反応液の吸光度(コントロール)

B = 供試試料を添加した反応液の吸光度

C = サンプルの吸光度

クロロゲン酸類の濃度を変えてチロシナーゼ阻害活性をもとめ、横軸にクロ

クロゲン酸類濃度を、縦軸にチロシナーゼ阻害率をプロットしてグラフを描き、回帰式からチロシナーゼ活性を 50% 阻止するのに必要なクロゲン酸類濃度を算出した(50% reduction)。比較対照にはアルブチン、アスコルビン酸、カフェー酸を用いた。

#### **b) L-DOPA を基質としたチロシナーゼ阻害活性**

0.85mM L-DOPA と 19mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)、マッシュルームチロシナーゼ 60units、クロゲン酸類を含む反応液 2ml を 25°C で反応させ、15 秒間隔で 3 分間生成したドーパキノンの吸光度 (475nm) を測定した。この値を横軸に測定時間を縦軸にプロットして得られた回帰式を求め、この式から 1.75 分と 2.75 分の 475nm の吸光度を算出した。チロシナーゼ阻害活性はコントロールに対する比をチロシナーゼ阻害活性とし、次式よりもとめた。

$$\text{チロシナーゼ阻害活性(\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A = 供試試料を添加していない反応液(コントロール)の 1.75 分と 2.75 分の吸光度の差

B = 供試試料を添加した反応液の 1.75 分と 2.75 分の吸光度の差

クロゲン酸類の濃度を変えてチロシナーゼ阻害活性を求め、横軸にクロゲン酸類濃度を、縦軸にチロシナーゼ阻害活性をプロットしてグラフを描き、回帰式からチロシナーゼ活性を 50% 阻止するのに必要なクロゲン酸類濃度を算出した。

比較対照にはアルブチン、アスコルビン酸、カフェー酸を用いた。

#### **2-2-12. ヒアルロニダーゼ阻害活性**

ヒアルロニダーゼ阻害活性は、Morgan-Elson 法を応用した前田ら<sup>81)</sup>の方法を参考に測定した。



100mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解したクロロゲン酸類溶液 200  $\mu$ l にヒアルロニダーゼ 40units を添加し、37°C で 20 分間予備加温した。同緩衝液に溶解した 0.01%(w/v) compound 48/80 (ナカライテスク) を 200  $\mu$ l 加えて、37°C で 20 分間インキュベートしてヒアルロニダーゼを活性化させた。この溶液に最終濃度 0.4mg/ml となるようヒアルロン酸を加え、37°C で 20 分反応させた後、0.4N NaOH を 200  $\mu$ l 加えて氷冷し反応を停止させた。0.5N NaOH に溶解した 4.95%(w/v) ホウ酸溶液を 200  $\mu$ l 反応液に加え、100°C で 3 分間加温した後、再び氷冷した。この溶液に *p*-Dimethylaminobenzaldehyde 試薬を 6ml 加え、37°C で 20 分間反応させた後、585nm の吸光度を測定した。ヒアルロニダーゼ阻害活性は次式によりもとめた。

$$\text{ヒアルロニダーゼ阻害活性(\%)} = [(A-B)-(C-D)] / (A-B) \times 100$$

A = 供試試料を添加していない反応液の吸光度(コントロール)

B = 酵素を添加していない反応液の吸光度(Blank)

C = 試料溶液の吸光度

D = 供試試料、酵素を添加していない反応液の吸光度(試料 Blank)

クロロゲン酸類の濃度を変えてヒアルロニダーゼ阻害活性をもとめ、横軸にクロロゲン酸類濃度を、縦軸にヒアルロニダーゼ阻害活性をプロットしてグラフを描き、回帰式からヒアルロニダーゼ活性を 50% 阻止するのに必要なクロロゲン酸類濃度を算出した(50% reduction)。また、比較対照にはクロモグリク酸ナトリウム (DSCG, 抗炎症剤) と (+)-catechin を用いた。

### 2-2-13. ガン細胞増殖抑制活性

クロロゲン酸類のヒト由来培養細胞に対する増殖阻害活性を測定した。供試

細胞にはヒト由来の接着ガン細胞である KB 細胞（ヒト鼻咽頭ガン由来）と MCF-7 細胞（ヒト乳ガン由来）、浮遊ガン細胞である U937 細胞（ヒト組織球形リンパ腫由来）を使用した。KB 細胞は島根県立保健環境科学研究所 持田恭博士より分譲していただいた。MCF-7 細胞は ATCC (HTB 22, USA) から、U937 細胞はヒューマンサイエンス財団（大阪）から入手した。正常細胞とガン細胞に対する増殖阻害活性を比較するためにヒト由来接着性 WI-38 細胞（肺繊維芽細胞由来正常細胞）と、これを SV40 ウイルスで形質転換しガン化させた WI-38 VA13 sub 2 RA 細胞（VA 細胞）をヒューマンサイエンス財団から入手した。

U937 細胞は、100ml/L 牛胎児血清 (FBS, Flow Laboratories) -RPMI medium (1640 培地、Sigma Aldrich Co.) を用いて 37°C、5%炭酸ガス孵卵器の中で培養した。KB 細胞は 20ml/L 子牛血清 (CS, Flow Lab.) - Eagle's minimal essential medium (MEM 培地、日水製薬) で、MCF-7 細胞と WI-38 細胞、WI38VA 細胞は 100ml/L 牛胎児血清- MEM 培地を用いて、U937 細胞は 100ml/L FBS-RPMI medium を用いて 37°C、5%炭酸ガス孵卵器の中で培養した。全ての培地にはペニシリン 100U/mL、ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml およびカナマイシン 60  $\mu$ g/ml を添加した。

供試培養細胞をクロロゲン酸類添加培地で培養し、ガン細胞増殖抑制活性を WST-1 法<sup>82)</sup>で測定した。そして、ガン細胞の増殖を 50%抑制させるのに必要なクロロゲン酸類濃度 (50% reduction、IC<sub>50</sub>) を算出した。

浮遊性ガン細胞 (U937) は 96 穴組織培養用マイクロプレート (Falcon) の各 well に 1×10<sup>6</sup> cells/ml に調整した細胞懸濁液を 50  $\mu$ l 分注して 37°C で 3 時間保った後、目的の濃度に希釈したクロロゲン酸類溶液 50  $\mu$ l を添加して、全量を 100  $\mu$ l とした。24 時間培養後、WST-1 試薬 (株式会社同仁化学研究所) を 10  $\mu$ l 添加し 3 時間インキュベートした後、プレートアナライザー (東洋測器株式

会社)で主波長 450nm、副波長 630nm の吸光度を測定して、細胞の生存率を算出した。

接着性培養細胞 (KB、MCF-7、WI-38、WI-38VA) は 96 穴組織培養用マイクロプレート (Falcon) の各 well に、 $5 \times 10^3$  cells/ml に調整した細胞懸濁液を 100  $\mu$ l 分注して 37°C で 1 日前培養し、底面に培養細胞の単層を形成させた。培養液上清を除去した後、培地で目的の濃度に希釈したクロロゲン酸類溶液を 100  $\mu$ l 添加した。24 時間培養後、WST-1 試薬を添加して、細胞の生存率を算出した。ガン細胞増殖抑制活性は以下の式から求めた。

ガン細胞増殖抑制活性(%) =  $\{[(\text{サンプル無添加培養液の } 450\text{nm の吸光度}) - (\text{培地の } 450\text{nm の吸光度})] - [(\text{サンプル添加培養液の } 450\text{nm の吸光度}) - (\text{サンプル添加培地の } 450\text{nm の吸光度})] / [(\text{サンプル無添加培地の } 450\text{nm の吸光度}) - (\text{培地の } 450\text{nm の吸光度})]\} \times 100$ .

また、クロロゲン酸類添加培地で培養した U937 細胞を Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) で染色し、蛍光顕微鏡を用いて核の変化を観察した。

#### 2-2-14. 抗変異原性試験

ウムラック AT (日本抗体研究所) キットを用いて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として抗変異源活性を測定した。供試菌 *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 には、突然変異に関わる *umu* 遺伝子に転写・翻訳の開始部位を欠く *lacZ* 遺伝子を融合した *umuC'*-*lacZ* 融合遺伝子が形質転換法で導入されている。変異原物質によって SOS 反応が誘発されると、*umu* 遺伝子プロモーターの調節下にある *umuC'*-*lacZ* 融合遺伝子が発現して  $\beta$ -galactosidase 活性を持つ *umuC'*-*LacZ* 雑種蛋白が形成される。したがって、 $\beta$ -galactosidase 活性は SOS 反応すなわち変異原性の強さを反映している。

96 穴マイクロプレートに終濃度 0.85mM になるように調製したクロロゲン酸

類と 10%(w/v)DMSO に溶解した 7 種類の変異原物質 Trp-P-1 ( 3-amino-1,4-dimethyl- 5H-pyrido[4,3-*b*]indole ) , Trp-P-2 ( 3-amino-1-methyl-5H-pyrido- [4,3-*b*]indole ) , AF-2 (alpha-2-furyl-5-nitro-2-furanacrylamide) , 2-AA (2-Amino- anthracene) , B[a]p(1,2- benzopyrene) , 4-NQO ( 4-nitroquinoline N-Oxide ) , IQ (2-amino-3-methylimidazo- [4,5-*f*]quinoline)をそれぞれ 10  $\mu$ l 加えた。変異原物質の最終濃度は Yamada ら<sup>83)</sup>、Yoshimoto ら<sup>84, 85)</sup>、Saito ら<sup>86)</sup>の報告を参考に Table 7 に示した。AF2 を添加した well には Nutrient broth で前培養した *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 を 100  $\mu$ l 加え 37°C で 2 時間インキュベートした。残り 6 種類の変異原物質 (Trp-P-1、Trp-P-2、2-AA、B[a]p、4-NQO、IQ) はヒト肝臓に取り込まれてから代謝活性化されるので、S-9 MIX とともに試料をインキュベートしてから菌液を添加した。37°C で 120 分間保った後、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 の生産する菌体外  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

供試試料のみ添加した反応液の酵素活性を 100 とし、供試試料と変異原物質を添加した反応液の活性を相対活性で表示した。

Table 7. Final concentration of reagents.

Reagent	Final conc.(ng/well)
*Trp-P-1(3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole)	20
*Trp-P-2(3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole)	100
AF-2(alpha-2-furyl-5-nitro-2-furanacrylamide)	3
*2-AA(2-Aminoanthracene)	30
*B[a]p(1,2-benzopyrene)	20
*4-NQO(4-nitroquinoline N-Oxide)	4
*IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline)	50

\*The antimutagenicity was tested with S-9 mix.

### 3-2-15. クロロゲン酸類の機能性食品素材への応用

クロロゲン酸類を機能性食品素材として利用するために、消費者にとって馴染みやすい缶コーヒーへの応用を検討した。現在市場に流通している多くの缶コーヒーには深煎りされたコーヒー豆が使用されていて、クロロゲン酸類とくに高い生理機能を有するdiCQAは殆ど含まれていない。

クロロゲン酸類を缶コーヒーに添加する場合、その製造工程や保存中にクロロゲン酸類がどのように変動するのかを把握しておく必要がある。缶コーヒーは抽出、調合、充填、巻き締め、殺菌、冷却という工程を経て製造されており、なかでも殺菌工程は高温（121.1℃）で数分～数十分保持されるため、その熱によってクロロゲン酸類が分解されてしまう可能性がある。そこでクロロゲン酸類を添加した缶コーヒーをテスト製造し、クロロゲン酸類の挙動を分析した。

缶コーヒーはTable 8に示した原材料と配合比率を用いてパイロットプラントで製造した。コーヒー生豆（EK-1grade 4）から99.5%エタノールで抽出したクロロゲン酸類（クロロゲン酸類含有量，50%）を、生豆中のクロロゲン酸類含有量（0.1g/100ml）になるよう添加した。加熱殺菌条件はブラックタイプで121.1℃、6分、ミルク入りタイプで121.1℃、30分とした。試作した缶コーヒーに含まれているクロロゲン酸類を定量した。

Table 8. Composition of trial product of canned coffee (g/100ml product).

Sample	Coffee bean	Raw coffee bean extract*	Milk	Sugar	Sodium hydrogen carbonate	Emulsifier
Black type	5.3	0.1	—	—	—	—
With milk type	5.3	0.1	17.0	5.4	0.1	0.2

\*50% Chlorogenic acid

## 2-3. 実験結果および考察

### 2-3-1. 成熟度の異なる生豆から抽出したコーヒーの官能試験

成熟度別に7段階に分けたコーヒー果実からコーヒー飲料を調製し官能試験した。I群の豆から抽出したコーヒーには強い草臭（grassy）と非常に強い苦味と渋味が感じられ、酸味は全く感じられなかった。また後味も非常に悪く、コーヒー独特の風味に欠けていた。II群以降から徐々に苦味、渋味の評点が下

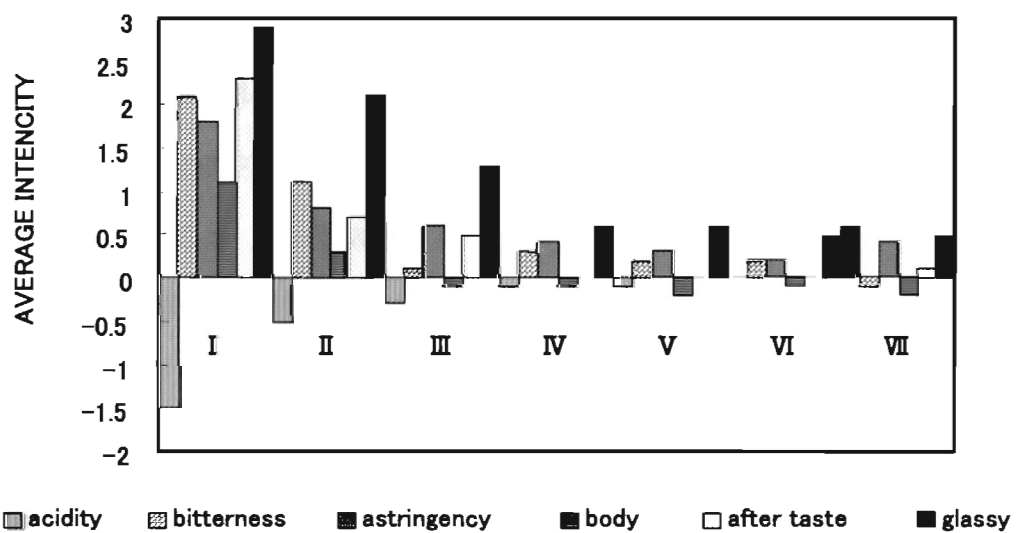


Fig. 20. Sensory evaluation for each of the maturity of *Coffea arabica* ver. *typica*.

がり、酸味の評点が上昇した。また、コーヒーとしての風味に調和がとれるようになってきた (Fig. 20.)。

### 2-3-2. 成熟度の異なる生豆中のクロロゲン酸量と組成

供試生豆から得た抽出物を HPLC 分析し、出現したピークの retention time を Ky ら<sup>87)</sup>の結果と対照して、7種類のクロロゲン酸類を検出した (Fig. 21.)。

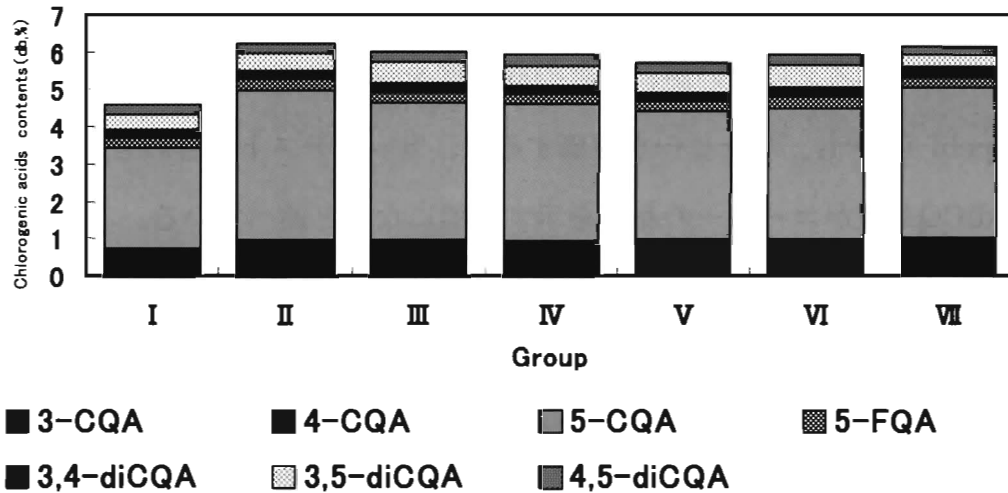


Fig.21. Changes in chlorogenic acid contents with maturity of *Coffea arabica* var. *typica*.

3-CQA、4-CQA、5-CQA は I 群から VII 群へ成熟度が増すにつれて増加していく傾向にあったが、diCQA 量に変化は認められなかった。未熟豆 (I 群、II 群) の CQA/diCQA 比が低かったことから、コーヒーは生合成した CQA と diCQA を胚乳部に蓄積し、成熟するにつれて一部の diCQA が CQA に生分解していると推察される。

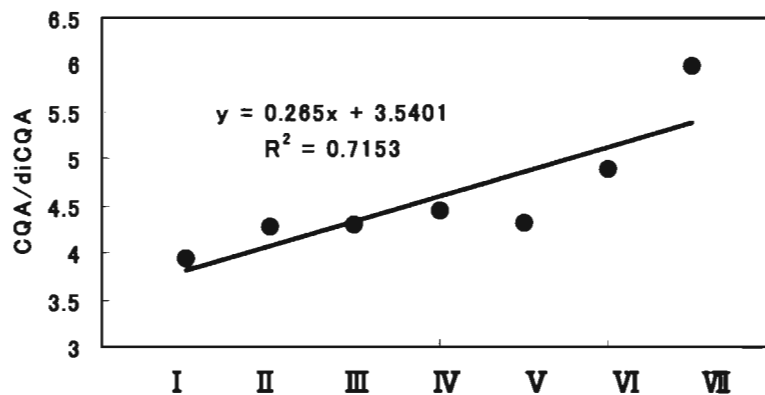
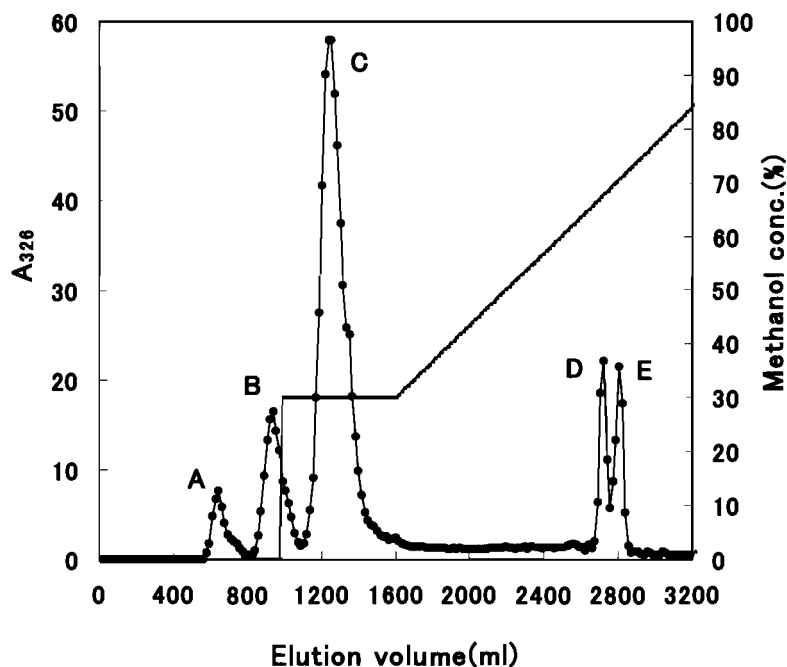


Fig.22. Relationships between the maturity of coffee cherry and CQA/diCQA value.

コーヒー生豆中の CQA/diCQA 比と成熟段階の間には正の相関 ( $R^2=0.7153$ ) が認められ、CQA/diCQA 値の上昇とともに官能評価も高くなった (Fig. 20, 22.)。しかし、CQA や diCQA は焙煎によって分解してしまって、コーヒー抽出液からはほとんど検出されない。したがって、CQA や diCQA が官能評価を下げる直接の要因とは考えにくい、生豆の成熟度を示す指標としては有効である。Ohiokpehi ら<sup>73)</sup>も、コーヒーを評価する際、カップテストと合わせて生豆中の CQA/ diCQA 値がコーヒーの品質を示す指標になると述べている。

### 2-3-3. 生豆からクロロゲン酸類の単離

粉砕した生豆のメタノール抽出物を Sephadex LH-20 カラムにかけたところ、326nmに吸収をもつ5つのピーク (A~E) が得られた (Fig. 23)。



**Fig.23.** Chromatogram of the 70% MeOH extract from green coffee beans by Sephadex LH-20 column chromatography. The fractions containing hydroxycinnamic acid derivatives were eluted with a linear gradient of methanol (0-70%) in 0.2% (v/v) acetic acid aqueous solution at 60ml/hr.



ピーク2と5は、分取HPLCでさらに2つのピークに分かれた。Sephadex LH-20 カラムクロマトと分取HPLCを組み合わせることによって、7種類の物質を効率よく分離することができた。

HPLC分析で出現したピークのretention timeは、Ohiokpehaiら<sup>75)</sup>、Kyら<sup>87)</sup>の結果と類似していた。しかし、彼らの条件でHPLC分析すると、ピークが近接して明瞭に分離させることが困難であった。そこで、移動相に添加している2mM リン酸を0.2 %(v/v) 酢酸に置き換えたところ、ピークの分離が改善され7種類の物質を容易に分離することができた。

#### 2-3-4. 生豆から単離した物質の同定

生豆から単離した7種類の物質のHPLC分析結果と最大吸収波長、FAB-MS およびMS-MS データ、<sup>1</sup>H-NMR データを Fig. 24.と Table 9, 10 にまとめた。物質1, 2 および4 はFAB-MS 分析で *m/z* 354 に分子イオンピークを与えた。このフラグメントをMS/MS 分析すると、ポジティブイオンモードで *m/z* 163 に、ネガティブイオンモードで *m/z* 191 にフラグメントピークが出現した。*m/z* 163 フラグメントは陽イオン化にともなうカフェオイル基由来のカルボニル酸素と、*m/z* 191 フラグメントはキナ酸由来のフラグメントと同定した<sup>88)</sup>。これ

Table 9. Identification of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from green coffee beans using their spectral characteristics in HPLC, positive and negative ions

compd	HPLC retention time(min)	positive ions			negative ions		estimated MW	identification
		MS[M+1] <sup>+</sup>	MS-MS( <i>m/z</i> )	MS[M-1] <sup>-</sup>	MS-MS( <i>m/z</i> )			
1	14.5	355	163	353	191		354	3-CQA
2	17.7	355	163	353	191		354	4-CQA
3	23.6	355	177	367	191		354	5-FQA
4	14.8	369	163	353	191		368	5-CQA
5	38.6	517	163,355	515	135,173,173,179,191,353		516	3,5-diCQA
6	35.8	517	163,355		135,173,173,179,191,353		516	3,4-diCQA
7	44.0	517	163,355		135,173,173,179,191,353		516	4,5-diCQA

らの MS 分析結果から、3 種類の物質はクロロゲン酸と同定した。

クロロゲン酸 1、2 および 4 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、カフェー酸とキナ酸のスペクトルを合わせたもので (Table 10)、キナ酸の C-3、C-4 および C-5 プロトンのいずれかのケミカルシフト値が低磁場側にシフトしていた。Corse ら<sup>89)</sup> は、フェルロイルキナ酸類の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルについて、キナ酸の C-3、C-4 および C-5 プロトンのケミカルシフト値はキナ酸とフェルラ酸との結合位置と直接的に関係していると述べている。また Morishita ら<sup>90)</sup> や Islam らは<sup>91)</sup>、ケミカルシフト値が低磁場側にシフトとしたキナ酸の OH 基にカフェー酸がエステル結合していると報告している。

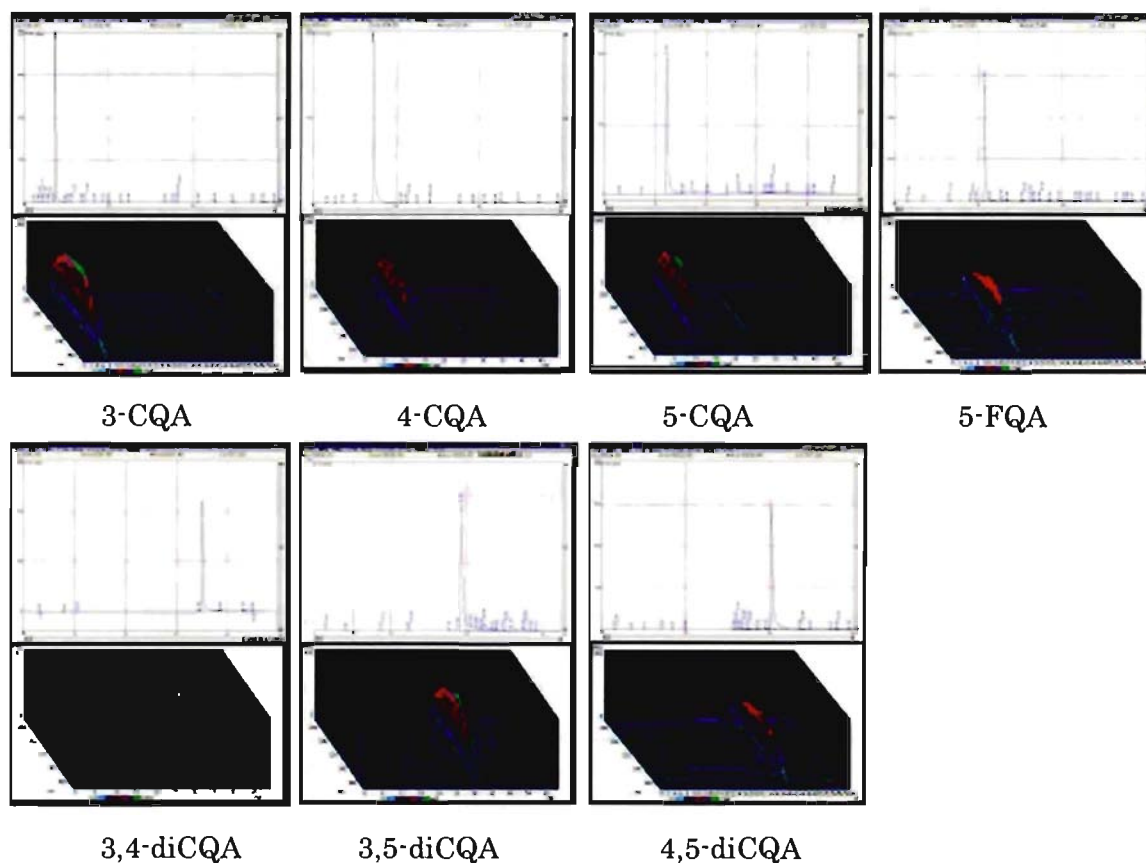


Fig. 24. HPLC Chromatogram of seven hydroxycinnamic acid derivatives isolated from green coffee beans.

これら報告に基づいて、クロロゲン酸 1, 2 および 4 を 3-CQA、5-CQA、4-CQA と同定した。

5-CQA の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは市販のクロロゲン酸と一致していた。また 3-CQA と 4-CQA と同定したクロロゲン酸 1 と 4 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルも、Morishita ら<sup>90)</sup>のスペクトルと酷似していた。さらにクロロゲン酸 1, 2 と 4 の HPLC リテンションタイムは Ky ら<sup>87)</sup>の結果と一致していた。

物質 3 は FAB-MS 分析で  $m/z$  354 に分子イオンピークを与えた。このフラグメントを MS/MS 分析すると、ポジティブイオンモードで  $m/z$  177 に、ネガティブイオンモードでは  $m/z$  191 と 194 にフラグメントを与えた。 $m/z$  177 フラグメントは、フェルロイル基に由来し、 $m/z$  191 フラグメントはキナ酸由来、 $m/z$  194 はフェルロイル基由来のフラグメントと同定した<sup>89)</sup>。また物質 3 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは Morishita ら<sup>90)</sup>のデータに酷似していたことから、物質 3 は 5-FQA と同定した。

Table 10. <sup>1</sup>H-NMR spectral data of compounds 1-7, QA, CA, and FA.

carbon	compound					Quinic acid(QA)	Cafeic acid(CA)	Ferulic acid(FA)
	1	2	3	4	5			
2	2.18	2.19	2.22	2.18		2.18		
3	5.66	4.32	4.21	4.30		4.01		
4	3.94	5.04	3.82	3.94		3.68		
5	4.32	4.35	5.42	4.32		4.18		
6	2.28,2.01	2.29,2.02	2.29,2.02	2.29,2.02		2.21,1.94		
2	6.99	7.00	7.21	7.00			7.02	7.19
5	6.73	6.75	6.81	6.75			6.76	6.79
6	6.88	6.91	7.08	6.91			6.93	7.05
7	6.19	6.21	6.32	6.21			6.18	6.36
8	7.50	7.52	7.58	7.52			7.51	7.55
1-OH	4.82	4.83	4.88	4.81		4.80		
4-OH	4.07or 4.66	4.07or 4.65	4.08or 4.66	4.12or 4.65		4.01or 4.61		
5-OH	4.07or 4.66	4.07or 4.65	4.08or 4.66	4.12or 4.65		4.01or 4.61		
7-OH	12.10	12.06	12.09	12.04		12.01		
3-OH	9.49	9.46		9.42			9.40	
4-OH	9.11	9.10	9.11	9.06			9.02	9.02
OCH <sub>3</sub>			4.07					4.12

carbon	compound		
	5	6	7
2	2.18	2.20	2.18
3	5.49	5.68	4.33
4	3.95	5.12	5.06
5	5.43	4.35	5.64
6	2.30,2.12	2.29,2.03	2.35,2.14
2,2	7.11,7.09	7.03,7.00	7.06,7.03
5,5	6.80,6.78	6.74,6.73	6.76,6.73
6,6	7.00,6.98	6.91,6.88	6.91,6.88
7,7	6.38,6.28	6.29,6.21	6.24,6.21
8,8	7.63,7.61	7.62,7.53	7.59,7.56
1-OH	5.07	5.04	5.02
4-OH	4.41or 4.95	4.38or 4.92	4.36or 4.89
5-OH	4.41or 4.96	4.38or 4.92	4.36or 4.89
7-OH	12.39	12.39	12.36
3,3-OH	9.79,9.76	9.81,9.77	9.78,9.76
4,4-OH	9.48,9.42	9.45,9.42	9.44,9.41

物質 5~7 は FAB-MS で  $m/z$  516 に分子イオンピークを与えた。このフラグメントを MS/MS 分析すると、ポジティブイオンモードで  $m/z$  355 と 163 に、ネガティブイオンモードでは  $m/z$  353、191、179、173、135 にフラグメントが出現した。 $m/z$  355 と 166 のフラグメントはカフェオイル基が遊離して生成したクロロゲン酸とカフェオイル基由来のカルボニル酸素と考えられる。一方、 $m/z$  353 のフラグメントはカフェオイル基が遊離したクロロゲン酸、 $m/z$  191 と

173 はキナ酸由来、 $m/z$ 179 と 135 はカフェー酸に由来すると同定した<sup>88)</sup>。これらの MS 分析結果から、物質 5~7 はジカフェオイルキナ酸の異性体と同定した。さらに  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルでキナ酸の C-3、C-4 および C-5 位のプロトンのケミカルシフト値が低磁場側にシフトしていたことから、物質 5~7 をそれぞれ 3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA と同定した。またジカフェオイルキナ酸 5~7 の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルは Morishita ら<sup>90)</sup>、Basnet ら<sup>66)</sup>、Islam ら<sup>91)</sup>のデータに酷似していた。さらに Ky ら<sup>87)</sup>の報告したジカフェオイルキナ酸類の HPLC リテンションタイムとも類似していた。

Table 8. Yield of hydroxycinnamic acid derivatives in WIB and EK-1 Grade 4 (Grams per 100g of Dry Weight Basis).

compounds	WIB	EK-1 grade4
3-CQA	0.69 ± 0.03	0.85 ± 0.04
4-CQA	1.53 ± 0.13	1.46 ± 0.06
5-CQA	5.55 ± 0.31	4.38 ± 0.19
5-FQA	1.40 ± 0.08	1.12 ± 0.03
3,4-diCQA	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.04
3,5-diCQA	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.04
4,5-diCQA	0.34 ± 0.07	0.44 ± 0.12

Grade の異なる 2 種類の生豆 (EK-1 grade 4 と WIB) 100g から単離した 7 種類のクロロゲン酸異性体の収量を Table 8 にまとめた。クロロゲン酸の総量は、高品質な WIB 生豆で高く、とくに 5-CQA が多く含まれていた。一方、diCQA 量にはほとんど差がなかったことから、コーヒー豆の成熟に伴い CQA 異性体が増加するという De Menezes の結果<sup>63)</sup> を支持する結果が得られた。

### 2-3-5. 市販生豆中のクロロゲン酸量と組成

31 銘柄の市販生豆から 7 種類のクロロゲン酸が検出された (Fig. 25.)。ロブスタ種の総クロロゲン酸量は 9.24–10.5% で、アラビカ種 (6.3–7.69%) より多かった。これらの値は、すでに報告されているクロロゲン酸量<sup>62)</sup> とほぼ一致していた。とくにインドネシア産ロブスタ種には diCQA が多く含まれていた (1.4–2.2%) ことから、インドネシア産ロブスタ種の未熟豆は、新たなクロロゲン酸類の有望な資源になると期待される。

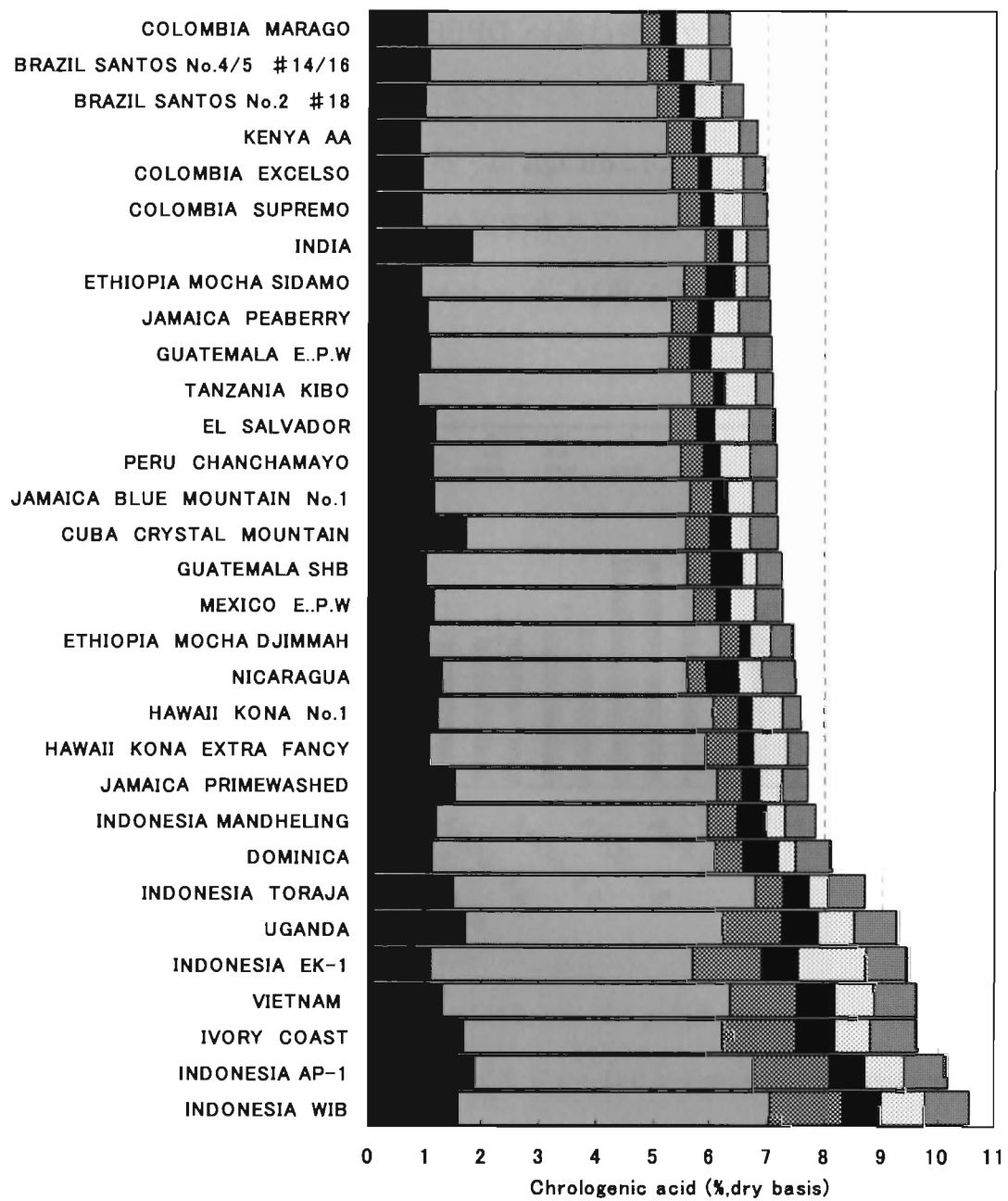


Fig. 25. Chlorogenic acid isomers content in commercial green coffee bean.

□, 3-CQA; ■, 4-CQA; □, 5-CQA; ▨, 5-FQA; ▩, 3,4-diCQA; ▤, 3,5-diCQA; ▧, 4,5-diCQA

### 2-3-6. クロロゲン酸類の抗酸化活性

生豆から単離したクロロゲン酸は高い DPPH ラジカル消去活性 ( $IC_{50}$ , 5.6 ~10  $\mu$ M) とスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性 ( $IC_{50}$ , 4.3~36  $\mu$ M) を示した (Fig. 26, 27.)。とくに diCQA は、抗酸化剤として広く用いられている  $\alpha$ -tocopherol や ascorbic acid より有意に高い DPPH ラジカル消去活性を示し、3-CQA、4-CQA および 5-FQA も  $\alpha$ -tocopherol より高い活性を示した ( $p<0.01$ )。

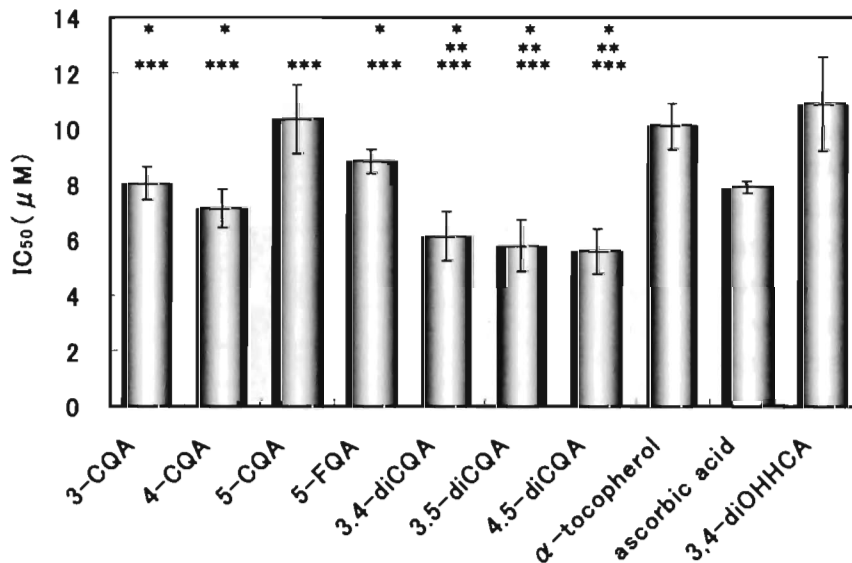


Fig. 26. DPPH radical scavenging activity of chlorogenic acid isomers.

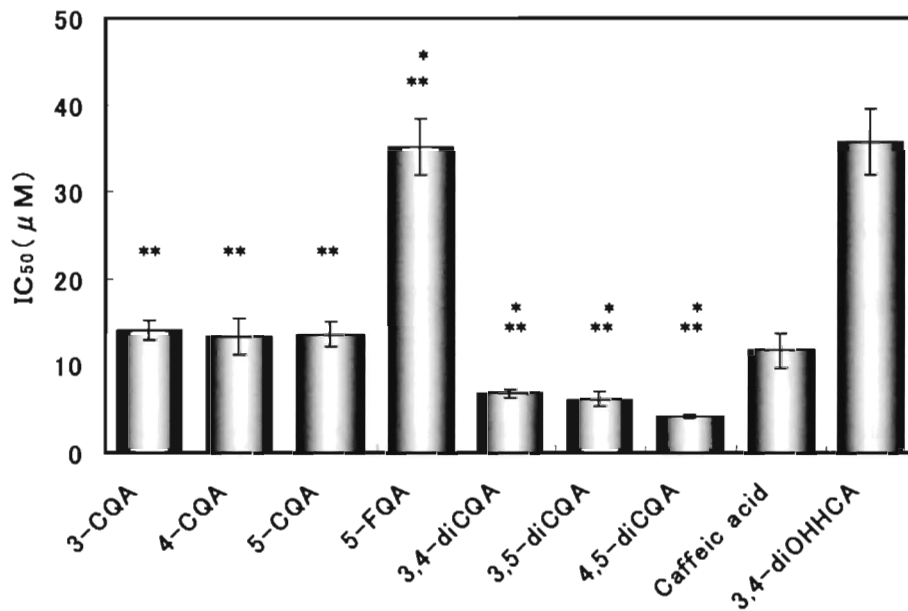
Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). \*:  $p<0.01$  vs.  $\alpha$ -tocopherol, \*\*:  $p<0.01$  vs. ascorbic acid, \*\*\*:  $p<0.01$  vs. 3,4-diOH HCA.

diCQA は、CQA、5-FQA およびカフェー酸より顕著に高いスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性を示した ( $p<0.01$ )。また CQA はカフェー酸と同程度の活性を、5-FQA は非常に弱い活性を示したが、キナ酸と 3,4-diOH HCA からは活性が検出されなかった (Fig. 26)。

CQA とカフェー酸には 1 個、diCQA 類には 2 個のカフェオイル基が存在して



いる。また、C-7位が飽和した3,4-diOH HCAやカフェオイル基のC-3位がメトキシル化された5-FQAのスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性は、CQAやカフェー酸の1/2以下に低下していたことから、C-7位の二重結合はカルボニル基やベンゼン環の二重結合、水酸基と共役してラジカルの受容体となりえるほか、ラジカルがカフェオイル基から容易に水素原子を奪い安定化すると考えられる。これらの結果から、クロロゲン酸類の抗酸化活性の発現にはカフェオイル基（とくにC-7位の二重結合とOH基）が必要で、活性の強さはカフェオイル基の数に依存していると考えた。



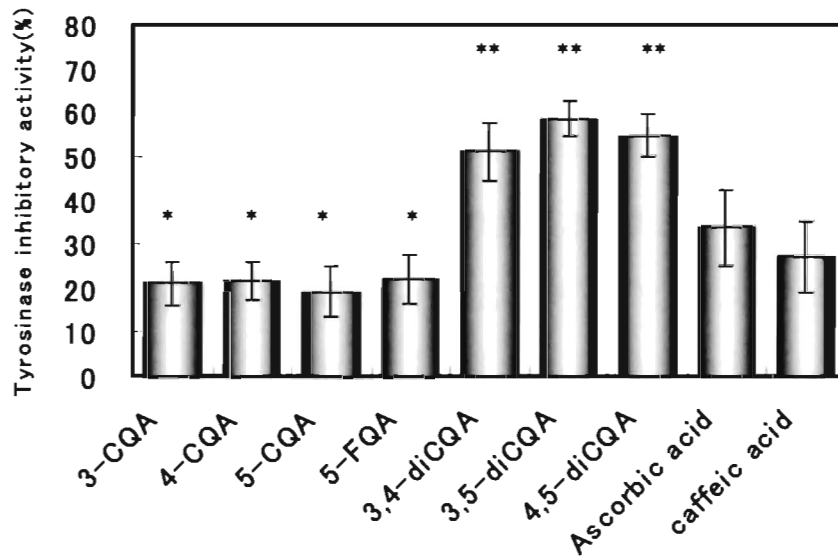
**Fig. 27.** Superoxide anion radical scavenging activity of cinnamoyl acid derivatives isolated from coffee bean. Results are expressed as the mean± S.D. (n=5). \*: p<0.01 v.s. caffeic acid. \*\*: p<0.01 v.s. 3,4-diOHHCA.

Nakatani ら<sup>92)</sup>は、プルーン (*Prunus domestica* L.) に含まれる 3-CQA、4-CQA および 5-CQA に高い抗酸化活性があったと報告している。また 3-CQA、4-CQA および 4, 5-diCQA は  $\alpha$ -tocopherol や cysteine よりも顕著な DPPH ラジカル消去活性を示し、3, 5-diCQA は 5-CQA より高い活性を示したと報告されている<sup>91)</sup>。さらに Lee<sup>93)</sup>は、ポリフェノールの抗酸化活性は一般的にキナ酸に結合しているカフェオイル基の数に依存していると報告している。今回得られた結果は、これらの結果と一致していた。

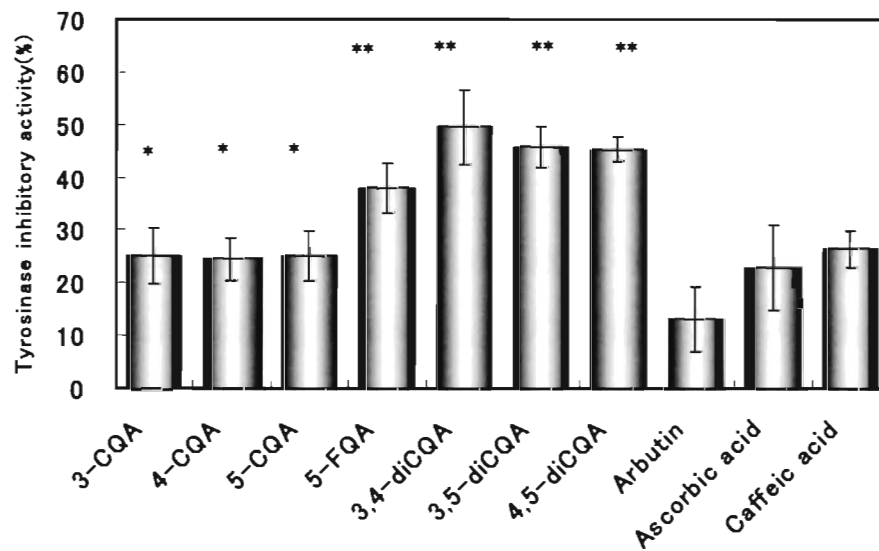
### 2-3-7. クロロゲン酸類のチロシナーゼ阻害活性

典型的なチロシナーゼ阻害剤であるアルブチンとアスコルビン酸は、90  $\mu$  M で L-tyrosine から dopachrome の生成を 13%と 23%阻害したが、L-DOPA を基質としたときは 0.34%しか阻害しなかった。しかし、diCQA は L-tyrosine から dopachrome の生成を 45~50%阻害し、L-DOPA を基質としたときも 51~59%阻害した (Fig. 28, 29.)。これらの値はポジティブコントロールと比較しても有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。

3,4-diOH HCA にはチロシナーゼ阻害活性が認められなかったことから、カフェオイル基の C7 位の二重結合がチロシナーゼ阻害活性の発現に必須であると考えられる。桂皮酸と cinnamic aldehyde も 0.70mM と 0.98 mM ( $IC_{50}$ ) でチロシナーゼを阻害したが、phenylpropionaldehyde は全く阻害しなかったと報告されている<sup>94)</sup>。これらの結果から、カフェオイル基の C7 位の二重結合はチロシナーゼのアミノ酸残基 (第一級アミノ基) とシッフ塩基を形成することによって、チロシナーゼを阻害していると考えた。



**Fig. 28.** Tyrosinase inhibitory activity of cinnamoyl acid derivatives isolated from coffee beans using L-tyrosine as a substrate. Each sample was tested at  $90 \mu\text{M}$ . Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). \*:  $p < 0.05$  v.s. arbutin, \*\*:  $p < 0.01$  v.s. arbutin and ascorbic acid.



**Fig. 29.** Tyrosinase inhibitory activity of cinnamoyl acid derivatives isolated from coffee beans using L-DOPA as a substrate. Each sample was tested at  $90 \mu\text{M}$ . Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). \*:  $p < 0.05$  v.s. arbutin, \*\*:  $p < 0.01$  v.s. arbutin, ascorbic acid, and caffeic acid.

5-FQA も CQA と同程度のチロシナーゼ阻害活性を示した。桂皮酸誘導体はチロシンと分子構造が似ており、チロシンと拮抗することによってメラニン生成を阻害すると報告されている<sup>95)</sup>。クロロゲン酸やフェルラ酸もチロシナーゼの拮抗阻害剤として作用していると推察される。

Shimozono ら<sup>96)</sup>は、サツマイモに含まれる3種類の diCQA がマウスメラノーマ細胞のメラニン合成を阻害したと報告している。

これらの結果から、等級外の生豆から抽出したクロロゲン酸類は、抗酸化剤や美白化粧品素材へ応用できると期待される。

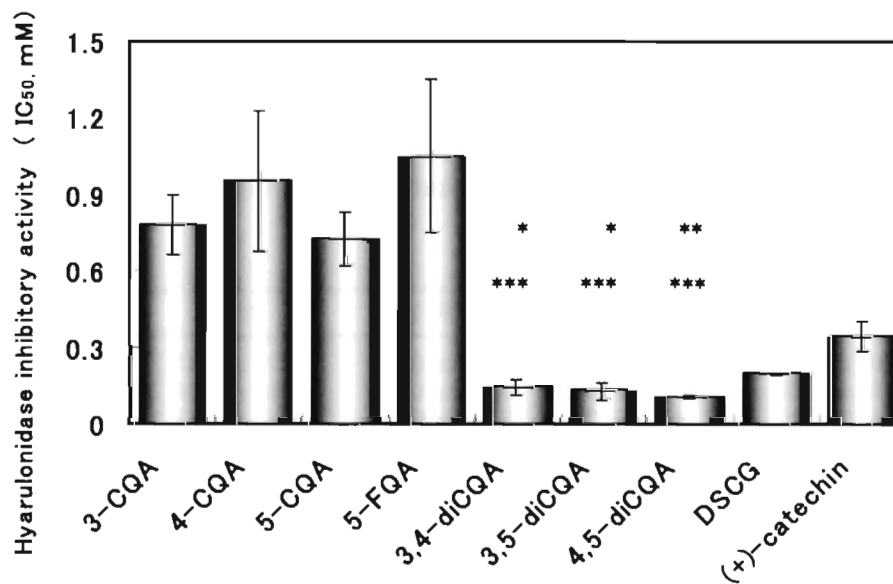
### 2-3-8. ヒアルロニダーゼ阻害活性

CQA のヒアルロニダーゼ阻害活性 ( $IC_{50}$ ) は 0.72~0.95mM、5-FQA は 1.05 mM であった。とくに diCQA には顕著な活性 ( $IC_{50}$ , 0.11mM ~0.18mM) が認められ、抗ヒスタミンや抗ヒアルロニダーゼ阻害剤として用られているクロモグリク酸ナトリウム ( $IC_{50}$ , 0.19mM) や (+) - カテキン ( $IC_{50}$ , 0.34mM) より有意に高い阻害活性を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 30.)。

Kuppusamy ら<sup>97)</sup>は、フラボノイド類がヒアルロニダーゼを阻害するためには、C 環の 2 位と 3 位の間の二重結合、5、7、4'位の未置換水酸基と 4 位のケトン基が必要であったと報告している。本実験でも diCQA は CQA と比較して 2 倍以上の活性が認められたが、その活性発現については、先に述べた抗酸化活性の発現のようにカフェオイル基（とくに C-7 位の二重結合と OH 基）の存在とカフェオイル基の数だけでは説明できず、さらなる検討が必要である。

ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸の加水分解酵素で、生体内では結合組織が再構築されるときに活性化される。しかし炎症反応がおこったときにも活性化されて、結合組織のマトリックスを破壊し、炎症系細胞の透過性を高めると考えられている。

ヒアルロニダーゼ阻害活性と肥満細胞からの脱顆粒抑制活性には相関があると Kakegawa ら<sup>98,99)</sup>は報告しているが、I 型アレルギーの全貌がまだ明らかにされていないので、両者の相関を説明する詳細なメカニズムはまだ示されていない。しかし、クロロゲン酸類がヒアルロニダーゼ活性を強く阻害したことは、花粉症などの I 型アレルギーを抑制する可能性も示唆される。



**Fig. 30.** Hyarulonidase inhibitory activity of cinnamoyl acid derivatives isolated from coffee beans. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D.(n=5). DSCG: cromoglycic acid sodium salt.

\* :  $p < 0.05$  v.s. DSCG, \*\* :  $p < 0.01$  v.s. DSCG, \*\*\* :  $p < 0.01$  v.s. (+)-catechin.

### 2-3-9. ガン細胞増殖抑制試験

生豆から単離したクロロゲン酸のガン細胞増殖抑制効果 (IC<sub>50</sub>) を Table 11 に示した。クロロゲン酸は 5 種類の細胞に対して用量依存的に増殖を抑制した (Fig. 31.)。なかでも KB 細胞に対して最も顕著な抑制活性を示し、IC<sub>50</sub> は 0.14-0.53mM CQA、0.56mM 5FQA、0.1-0.18mM diCQA であった ( $p < 0.01$ )。

KB 細胞の増殖を低濃度で抑制した物質は、著者が調べた限りでは CQA と diCQA が最初である。また diCQA は WI38、WI38VA および MCF-7 細胞の増殖を CQA や 5-FQA より有意に低い濃度で阻害した ( $p < 0.01$ )。これらの実験結果から、カフェオイル基の数が接着性ガン細胞の増殖阻害に重要な役割を果たしていると考えている。

Table 11. Antiproliferative activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from coffee beans on several cancer cell lines (IC<sub>50</sub>).

Compounds	U937	KB	MCF-7	WI38	WI38VA
3-CQA	1.20 ± 0.31	0.18 ± 0.02	0.80 ± 0.44	5.87 ± 2.47	4.93 ± 0.84
4-CQA	0.74 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.92 ± 0.48	3.56 ± 0.09	5.99 ± 2.08
5-CQA	1.54 ± 0.27	0.14 ± 0.02	0.74 ± 0.38	5.87 ± 2.47	8.18 ± 3.42
5-FQA	3.07 ± 0.55	0.56 ± 0.03	1.62 ± 0.81	3.46 ± 0.41	4.65 ± 0.48
3,4-diCQA	0.57 ± 0.01	0.16 ± 0.02 *	0.31 ± 0.15 *	0.50 ± 0.03 *	0.75 ± 0.05 *
3,5-diCQA	0.56 ± 0.05	0.18 ± 0.01 *	0.32 ± 0.16 *	0.52 ± 0.04 *	0.47 ± 0.03 *
4,5-diCQA	0.76 ± 0.06	0.10 ± 0.01 *	0.37 ± 0.19 *	0.62 ± 0.03 *	0.58 ± 0.02 *

Results are expressed as the mean ± SD (n=4). \* :  $p < 0.01$  v.s. CQAs (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA) and 5-FQA.

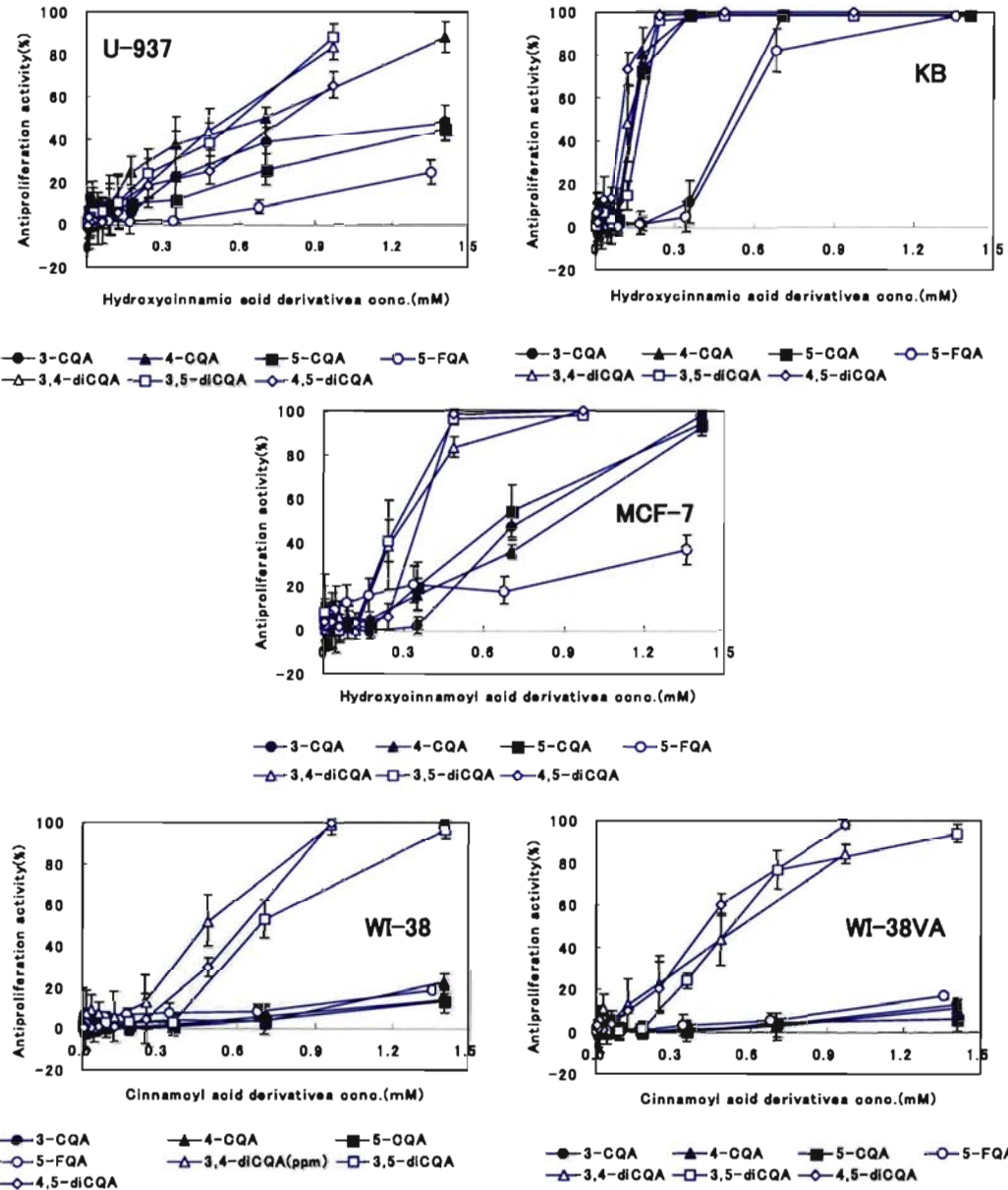
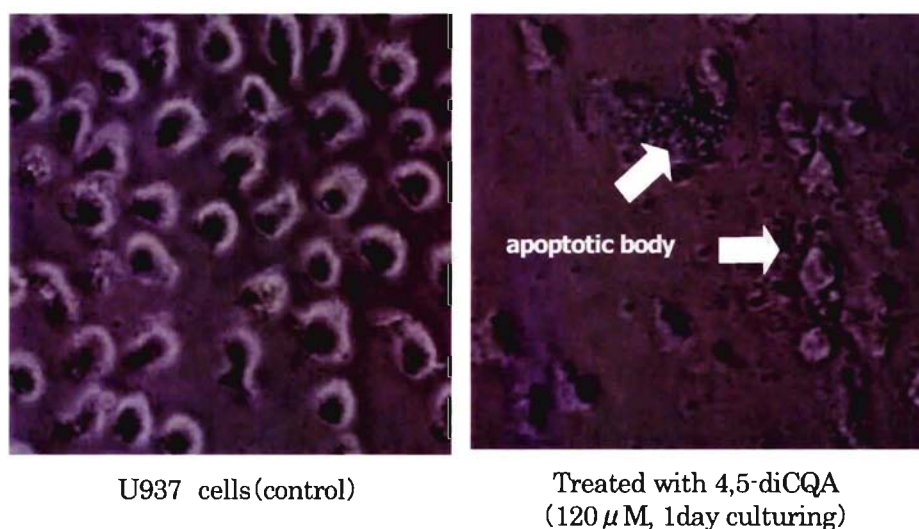


Fig.31. Antiproliferative activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from coffee beans on several cancer cell lines. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D.(n=4).

Nagaoka ら<sup>67)</sup>は、diCQA メチルエステル異性体や triCQA がラット大腸ガン 26-L5 細胞、ヒト HT-1080 fibrosarcoma, マウス B16-BL6 メラノーマ細胞、ヒト肺ガン A-549 細胞の増殖を 2.94-148  $\mu$  M ( $IC_{50}$ ) で抑制したと報告している。培養細胞の系統や  $IC_{50}$  値は異なっているが、本研究で得られた結果を支持している。

WI38 正常細胞と WI38VA ガン化細胞に対する CQA と diCQA の IC<sub>50</sub> 値に有意差が認められなかったことから、クロロゲン酸類は WI38 正常細胞に対して細胞毒性を示すと考えられる。5-FQA のガン細胞増殖抑制活性は diCQA や CQA に比べると低かった ( $p < 0.01$ )。同様の結果がスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性でも得られており、カフェオイル基の C3 位の OH 基がこれらの活性発現に重要な役割を果たしている推測される。

U937 細胞を 120  $\mu$  M 4,5-diCQA 添加培地で 24 時間培養すると細胞の形態変化が観察された。diCQA 無添加培地で培養した細胞の周縁には微柔毛が観察され、細胞が輝いていたのに対して (Fig. 32A)、diCQA 添加培地で培養した細胞では微柔毛が消失し、細胞の輝きも失われており、アポトーシス小体と思われる細胞の断片が観察された (Fig. 32B)。



**Fig. 32.** Micrographs of U937 cells treated with diCQA.



### 2-3-10. 抗変異原活性

クロロゲン酸類は複素環アミンの Trp-P-1、Trp-P-2、IQ、および芳香族アミンの 2-AA に対しては顕著な抗変異原性を示したが、キノリン構造を持つ AF-2 や 4-NQO に対しては抗変異原性を示さなかった (Fig. 33)。diCQA は CQA より 1.96、1.71、1.96 倍高い抗変異原性を示したことから、Trp-P-1、Trp-P-2、IQ に対する抗変異原性の強さは、カフェオイル基の数に依存していると考えられる。Yoshimoto ら<sup>85)</sup> は、サツマイモの葉から単離したカフェー酸、3-CQA、3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA および 3,4,5-triCQA が Trp-P-1 誘導性の *S. typhimurium* TA98 復帰変異を効果的に阻止したことを明らかにし、クロロゲン酸異性体の抗変異原性の発現には、カフェオイル基の数が重要であると述べている。今回、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 の *umu* 遺伝子を用いてアッセイしたが、同様の結果が得られた。

コーヒー抽出液が AF-2 に対して強い抗変異原性を示すことが西沢ら<sup>100)</sup> によ

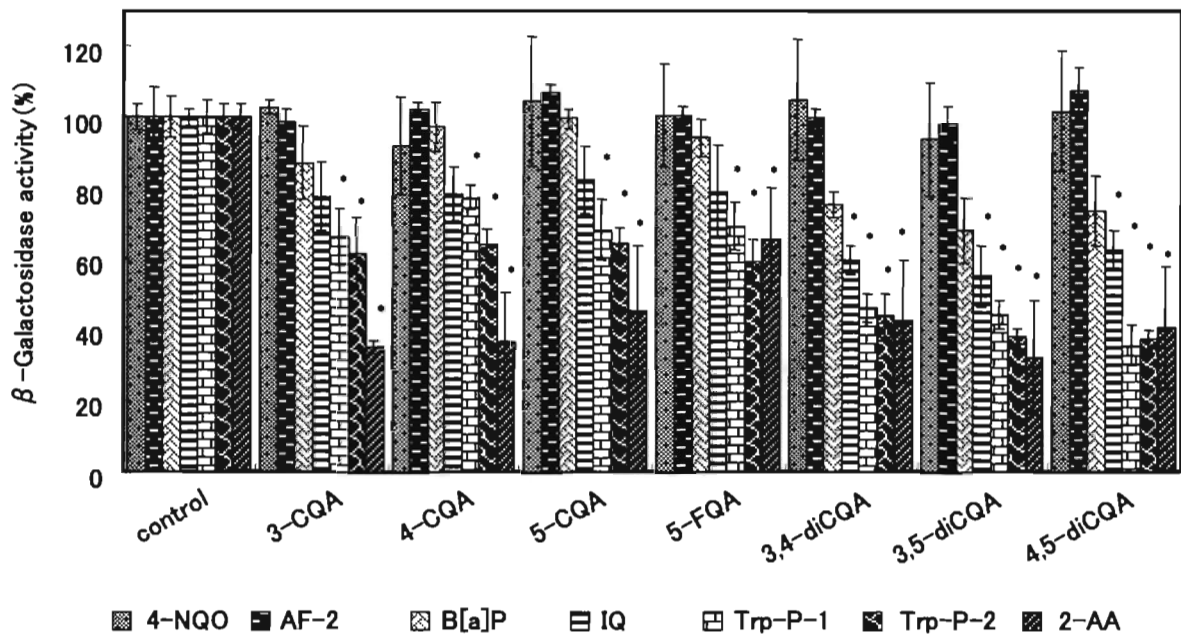


Fig. 33. Antimutagenic activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from coffee beans. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). \* :  $p < 0.01$  v.s. control.

って報告されている。我々が行った予備実験でも、焙煎豆やコーヒー抽出残渣の熱水抽出物が AF-2 や 4-NQO の変異原性を強く抑制することを見いだした。これらの結果は、焙煎豆にはクロロゲン酸とは異なる抗変異原性物質が含まれていることを示している。Obana ら<sup>101, 102)</sup>は、市販インスタントコーヒーと焙煎豆から *umu* 遺伝子の発現を抑制する物質の単離を試みて、活性成分は有機溶媒には抽出されない水溶性物質で、分子量 1000 以下、特異な UV 吸収を持たない物質であると報告している。

Yamada ら<sup>89)</sup>は、カフェー酸と構造が類似した桂皮酸、クマル酸およびフェルラ酸にも抗変異原性があることを明らかにしている。5-FQA は CQA とほぼ同程度の抗変異原性を示したことから、カフェオイル基の C-3 位のメトキシル化は抗変異原性に影響を与えないと推察される。

### 2-3-11. 缶コーヒーに添加したクロロゲン酸異性体の変動

生豆から抽出したクロロゲン酸異性体を添加した缶コーヒーを試作した。加熱殺菌が缶コーヒー中の CQA 異性体量に与える効果を HPLC で分析したところ、ブラックタイプでは 100%、ミルク入りタイプでも 82.4%のクロロゲン酸が残存していた (Fig. 34)。

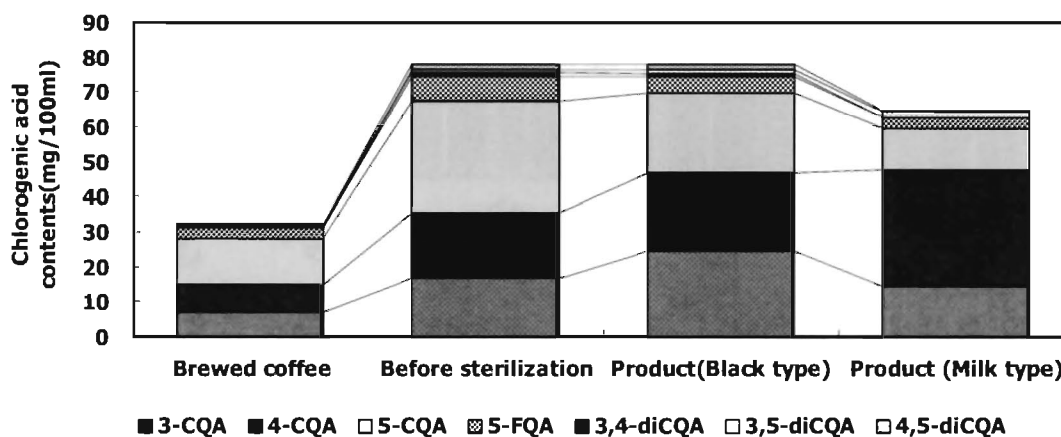


Fig. 34. Changes in the chlorogenic acids concentration in canned coffee.

とくに高い生理活性をもつ diCQA もブラックタイプで 102%、殺菌条件の厳しいミルク入りタイプでも 62.9%残存していたことから、添加したクロロゲン酸類は厳しい熱殺菌でも分解されずに残存することを明らかにすることができた。これらの結果から、高い生理活性を有するクロロゲン酸異性体を機能性食品素材として飲料へ応用できる道筋をつけることができた。

ミルク入りタイプでクロロゲン酸残存量が低下したのは、コーヒー抽出液(pH 5.0)の中和と長時間の加熱殺菌処理(30分)のためと考えられる。牛乳中の乳タンパク質(カゼイン)が酸沈殿しないように、抽出液を pH 7.0 前後に中和した。クロロゲン酸は酸性域では比較的安定であるが、中性からアルカリ域では不安定なので、中和と長時間加熱の2つの工程が残存量を低下させた要因になっていると考えられる。

## 2-4. まとめ

等級の異なるインドネシア産ロブスタ種のコーヒー生豆 (EK-1 grade 4 と WIB) から、メタノール抽出、Sephadex LH 20 カラムクロマトと分取 HPLC を組み合わせて7種類の桂皮酸誘導体を単離した。得られた物質は HPLC、MS、<sup>1</sup>H-NMR 分析をおこなって、3-、4-、5-CQA、5-FQA、3,4-、3,5-、4,5-diCQA と同定した。EK-1 grade 4 と WIB 生豆には 10.4 および 9.1g/100g のクロロゲン酸異性体が含まれていた。WIB 生豆には 5-CQA が多く含まれていたが、diCQA 量に差は認められなかった。

CQA と diCQA には顕著な DPPH フリーラジカル消去活性やスーパーオキシドアニオン消去活性、チロシナーゼ阻害活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性、複素環アミンに対する抗変異源性が認められ、これらの活性の強さは diCQA > CQA > 3,4-diOH HCA の順であった。そしてこれらの活性発現には、カフェオイル基の数と C7 位に存在する二重結合、カフェオイル基の C-3 位の OH 基が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、diCQA は接着性ガン細胞とくに KB 細胞に対して顕著な増殖抑制活性を示した。

生豆から抽出したクロロゲン酸類を添加した缶コーヒーを試作したところ、121.1°Cで6分加熱処理したブラックタイプでは 100%残存し、中和後ミルクを添加し 121.1°Cで30分加熱殺菌したミルク入りタイプでも 82.4%残存していた。また高い生理活性をもつ diCQA も殺菌条件の厳しいミルク入りタイプで 62.9%残存していた。これらの結果から、資源として活用されていない等級外コーヒー生豆を天然クロロゲン酸類の資源として活用する新たな道筋を示すことができた。

### 第三章 クロロゲン酸を用いた機能性成分の酵素合成

#### 3-1. 緒言

Caffeic acid phenylethyl ester (2-CAPE) はプロポリスに含まれる機能性成分として知られている。プロポリスは古代エジプトでは死体をミイラ化するための防腐・保存用に使ったといわれ、東欧では外科、皮膚科、耳鼻咽喉科、歯科、婦人科、獣医科などのさまざまな領域で利用されてきた<sup>20)</sup>。また、抗酸化、抗菌、抗炎症作用、腫瘍細胞増殖抑制効果も報告されている<sup>21-23)</sup>。Chen ら<sup>24)</sup> は 2-CAPE がカスパーゼ-3 の活性化と Bcl-2 の発現を抑制して、Bax の発現を活性化することによりヒト白血病培養細胞 HL-60 にアポトーシスを誘導すること明らかにした。

一方、第2章で明らかにしたように diCQA にも様々な生理活性が認められた。

このように多様な生理活性をもつ 2-CAPE や diCQA を安定して供給するためには、天然物から抽出する方法と化学合成法がまず頭に浮かぶ。しかし、天然物にはごく微量の 2-CAPE と diCQA しか含まれていないため、大量の原材料が必要でコストも高くて現実的な方法とはいえない。一方、化学合成法としては 2-CAPE では CA と 2-Phenethyl alcohol (2-PA) に塩化チオニルなどを用いてカフェー酸を塩素化した後、アルコール類と反応させる方法など多数報告されている<sup>25-27)</sup>。しかし CA の価格が高く、反応に使用した酸触媒や塩素化剤を除去する必要があり、製品の安全性という点で問題が残る。また、diCQA の生理活性を報告した論文は数多くあるが、すべてコーヒーやサツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) などから単離した物質<sup>96)</sup>で、diCQA を化学合成した報告は調べた限りではまだない。そこで、本研究では微生物酵素を用いて 2-CAPE と diCQA を合成する方法を検討した。

クロロゲン酸加水分解酵素 (EC 3.1.1.42, Chlorogenate hydrolase,

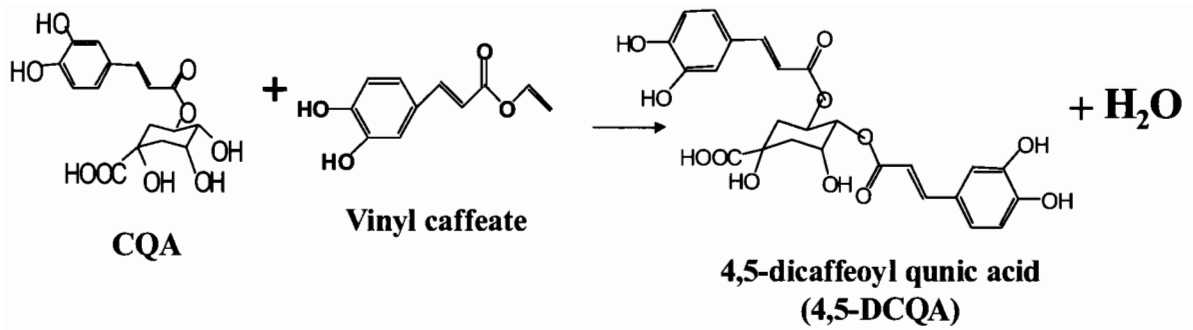
Chlorogenic acid esterase, CQA esterase) は、CQA や Caffeoyl tartaric acid, *p*-Coumaroyl tartaric acid のエステル結合を加水分解する酵素で、すでに *Aspergillus niger*<sup>103)</sup> と *Aspergillus japonicus*<sup>104)</sup> から精製されている。また、*A. japonicus* が産生する CQA esterase は果汁褐変防止剤および苦味除去剤として市販されている。

本研究では 2-CAPE と cinnamoylcaffeoyl quinic acid を酵素合成する最適反応条件を確立し、得られた物質の生理活性を検討した。

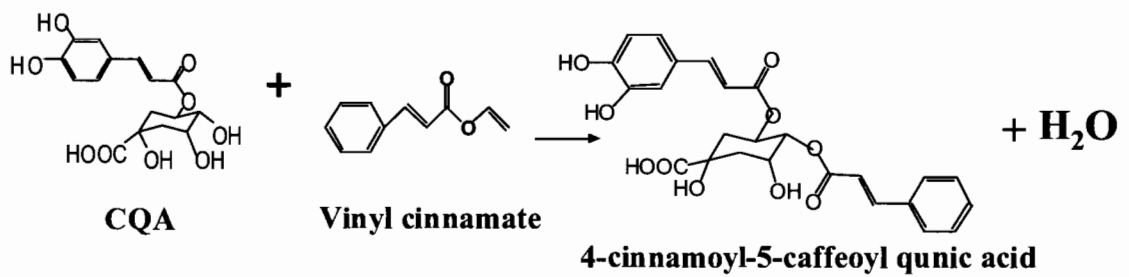
CQA や CA は水よりアルコールへの溶解度が高い。そこで CQA esterase を 25% (v/v) エタノール水溶液中で CQA に作用させたところ、加水分解活性は 50% に低下したが反応液から 320nm に吸収極大をもつ新たな物質を見いだした。そして機器分析でこの物質をカフェー酸エチルエステルと同定した。この結果から、本酵素は加水分解反応以外にエステル置換反応も触媒できることを見いだした。そこで、CQA と (2-PA) を基質とし、CQA esterase のエステル置換反応を利用して 2-CAPE を酵素合成できるか検討した。

次に CQA から diCQA への酵素合成を検討した。Nakajima<sup>105)</sup> らはアセトニトリル中で Vinyl cinnamate とアルブチン (4-hydroxy-phenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) にリパーゼを作用させると、アルブチン桂皮酸エステルが生成することを明らかにしている。

そこで、有機溶媒中で CQA と Vinyl caffeate にリパーゼを作用させると、diCQA が合成できるのではないかと考えた (Fig. 35)。ところが Vinyl caffeate は市販されていないので、市販 Vinyl cinnamate と CQA から Cinnamoylcaffeoyl quinic acid に変換できるリパーゼのスクリーニングと最適反応条件の確立を試みた (Fig. 36)。さらに、酵素合成した CAPE と Cinnamoylcaffeoyl quinic acid の生理活性を *in vitro* で検討した。



**Fig. 35.** Enzymatic transformation model from CQA and vinyl caffeate into diCQA



**Fig. 36.** Enzymatic synthesis of 4-cinnamoyl-5-caffeoyl quinic acid from vinyl cinnamate and CQA

## 3-2. 実験材料および実験方法

### 3-2-1. クロロゲン酸エステラーゼによるカフェー酸フェネチルエステル類への酵素変換

#### 3-2-1-1. 試料

*A. japonicus* 由来のクロロゲン酸エステラーゼ (CQA esterase) はキッコーマン株式会社から、Tannase は和光純薬工業株式会社から購入した。また、6種類のリパーゼ (Lipase QL Meito、Lipase AL Meito、Lipase PL Meito、Lipase OF Meito、Lipase MY-30 Meito、Lipase F-AP15 Meito) は名糖産業株式会社から、8種類のリパーゼ (Lipase G Amano50、Lipase R Amano G、Lipase AS Amano、Lipase AYS Amano、Lipase M Amano 10、Lipase PS Amano、Lipase PS-C Amano II、Lipase PS-D Amano I) はアマノエンザイム株式会社から供与いただいた。クロロゲン酸 (5-CQA) とカフェー酸 (CA) は東京化成工業株式会社から、2-フェニルエタノール (2-PA) は和光純薬工業から購入した。その他とくに記載しなかった試薬は和光純薬工業、ナカライテスク、関東化学、東京化成工業から購入した。

#### 3-2-1-2. 酵素のスクリーニング

CQA と 2-PA から 2-カフェー酸フェネチルエステル (2-CAPE) に変換できる酵素を CQA esterase と Tannase、14種の市販リパーゼからスクリーニングした。

10mM CQA-50mM リン酸緩衝液(pH 6.5)と 2.5M 2-PA を 37°Cで 10分間予備加温後、酵素溶液 (50mg/ml) 0.4ml 加えて反応を開始した (反応液 2.0ml)。37°Cで 15時間反応後、70°Cで 20分保って酵素反応を停止させた。反応液中の



生成物は TLC と HPLC で検出、定量した。

リパーゼは、各酵素の最適温度と最適 pH でスクリーニングした。またエステル置換反応が進行しやすいように 8.2M 2-PA の条件でも酵素反応を行った。

TLC 分析にはシリカゲルプレート (MERCK シリカゲル 60F<sub>254</sub> TLC アルミニウムシート) を使用し、クロロホルム : メタノール : 酢酸/9 : 1 : 0.25 (v/v/v) で展開後、紫外線を照射してスポットを検出した。2-CAPE、CQA、CA の HPLC 分析には HPLC SCL-6A system (Shimadzu Co.) と Cosmosil 5C18-AR-II カラム (4.6 mm I.D.×250 mm ; nacalai tesque Inc.) を使用した。移動相にはリン酸酸性水 (pH 2.5) とメタノールを使用し、10 分間でメタノール濃度 (v/v) を 30 から 60%になるようにグラジエントをかけ、その後 15 分間メタノール 100%で流した。カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min で分析し吸光度 330nm で検出した。

### 3-2-1-3. 反応生成物の精製と同定

TLC と HPLC で生成物が確認できた反応液から、分取用 HPLC を使って目的ピークを分取し、減圧濃縮した。分取用 HPLC には Waters 600E system controller (MILLIPORE) , Waters 486 Tunable Absorbance Detector (MILLIPORE)と Cosmosil 5C18-AR-II カラム (10 mm I.D. × 250 mm ; nacalai tesque Inc.)を使用した。移動相にはリン酸酸性水 (pH 2.5) : アセトニトリル/6 : 4 (v/v)を使用し、カラム温度 40°C、流速 5.0ml/min で流し、吸光度 330nm で検出した。

精製した反応生成物はエタノールに溶解し LC-MS (HP1100 HPLC, HEWLETT PACKARD, JEOL The M stationJMS-700YKM, JEOL Ltd.) と <sup>1</sup>H-NMR (JEOL EX-270, JEOL Ltd.) で機器分析を行った。

#### 3-2-1-4. CQA esterase を用いた CQA と 2-PA から 2-CAPE への酵素変換

「酵素のスクリーニング」に記載した方法を基本として、CQA 濃度 (5.03~40.6mM) と 2-PA 濃度 (0.04~1.67M)、反応温度 (25~50°C) を変えて酵素反応をおこない 2-CAPE 生成量を測定した。

#### 3-2-1-5. CQA と 1-PA から 1-CAPE への酵素変換

2.5M 1-PA と 10mM CQA-50mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) を 40°C で 10 分間予備加温後、CQA esterase (0.24mg Protein/ml) もしくは Tannase (150U/ml) 溶液 0.4ml 添加して反応を開始した (反応液 2.0ml)。40°C で 5 h 反応後、70°C で 20 分間インキュベートして酵素反応を停止させた。この反応液を TLC と HPLC で分析した。TLC 分析にはシリカゲルプレートを使用し、クロロホルム : メタノール : 酢酸/20 : 1 : 0.3 (v/v/v) で展開後、紫外線を照射してスポットを検出した。1-CAPE と CQA、CA の HPLC 分析条件は先に記した。

#### 3-2-1-6. 反応生成物の精製と機器分析

反応液 300 ml にクロロホルム 285 ml を加えて抽出後、遠心分離 (3,000 rpm、30 min) して上層と中間層、下層に分離した。中間層はエタノール抽出し下層と合わせて、エタノールで平衡化した Sephadex LH-20 カラム (15mm I.D. × 910mm) でゲルろ過を行い、330 nm の吸光度を測定した。目的ピークを集め減圧濃縮後、HPLC で分取して精製標品を得た。精製標品は LC-MS と <sup>1</sup>H-NMR で機器分析をおこなった。

#### 3-2-1-7. CQA esterase と Tannase の光学特異性

1-CAPE には不斉炭素が存在するので、CQA esterase と Tannase が触媒する酵素反応の光学特異性を求めた。

2.5M 1-PA (ラセミ体、S 体、R 体) と 10mM CQA-50mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に CQA esterase (0.24 mg Protein/ml) もしくは Tannase (150U/ml) 溶液 0.4ml 加えて 40°C と 37°C で 5 時間酵素反応を行なった (反応液 2.0ml)。生成した(R)-と(S)-1-CAPE の割合は Chiralpak AD-RH カラム (4.6mm I.D. × 150mm, ダイセル化学工業株式会社) を用いた HPLC 分析で求めた。移動相にはリン酸酸性水 (pH 2.5) とアセトニトリルを使用し、10 分間でアセトニトリル濃度 (v/v) が 10% から 40% になるようにグラジエントをかけ、その後アセトニトリル 35% で流した。カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min で分析し吸光度 330 nm で検出した。

#### 3-2-1-8. ハロゲン置換反応 (ハロゲン化物のスクリーニング)

PA の代わりに Phenethyl halide を用いて CAPE の合成を試みた。Phenethyl halide (2-phenylethyl chloride、2-phenylethyl bromide、2-phenylethyl iodide、1-phenylethyl chloride、1-phenylethyl bromide) 0.6ml と 10mM CQA-50mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.0ml を、45°C で 10 min 予備加熱後、CQA esterase (0.24mg Protein/ml) または Tannase (150U/ml) 溶液 0.4ml 添加して反応を開始した (反応液量 2.0ml)。45°C で 24h 反応後、70°C で 20min インキュベートして酵素反応を停止させた。生成物は TLC と HPLC で分析した。

#### 3-2-1-9. CQA から 2-CAPE への最適変換条件の検討

CQA 濃度 (5~40mM) と反応時間(0~24 h)、緩衝液濃度(50~1000mM) および pH (3~8)、PEBr 濃度 (0.15~7.5M)、反応温度 (40~55°C) を変えて反応をおこない、2-CAPE 生成量を測定した (反応液 2.0ml)。なお、pH 3~6 はクエン酸緩衝液、pH 6~8 はリン酸緩衝液を用いた。

### 3-2-1-10. Phenyl bromide 化合物の側鎖長がカフェー酸エステル合成に与える効果

Phenyl bromide (Benzyl bromide、Phenylethyl bromide、Phenylpropyl bromide、Phenylbutyl bromide) 0.6ml と 10mM CQA-50mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.0ml を、45°C で 10 min 予備加温後、CQA esterase (0.24 mg Protein/ml) 0.4ml 添加して反応を開始した (反応液 2.0ml)。45°C で 24 h 反応後、70°C で 20min インキュベートして酵素反応を停止させた。反応液中の生成物は TLC と HPLC で分析した。

### 3-2-1-11. 縮合反応(CA から 2-CAPE への最適条件の検討)

反応液の pH (1~8) と PEBr 濃度 (0.15~5.99M)、CA 濃度 (1~20mM)、温度 (40~55°C) を変えて反応をおこない、2-CAPE 生成量を測定した。なお、pH 1~2 は塩酸-塩化カリウム緩衝液、pH 3~6 にはクエン酸緩衝液、pH 6~8 にはリン酸緩衝液を用いた。

### 3-2-1-12. 縮合反応基質のスクリーニング

CQA 以外に 17 種類の新たな基質を用いて酵素反応をおこなった。検討した新たな基質は鎖長の異なる Phenyl alkanolic acid 4 種 (*p*-Hydroxy benzoic acid、Protocatechuic acid、*trans*-Styryl acetic acid、5-Phenyl penta-2,4-dienoic acid)、桂皮酸類 8 種 (Caffeic acid、Cinnamic acid、*p*-Coumaric acid、*m*-Coumaric acid、*o*-Coumaric acid、Ferulic acid、4-Amino cinnamic acid、4-Nitro cinnamic acid)、フェニルプロピオン酸 2 種[3-(3,4-Dihydroxy phenyl)propionic acid、3-Phenyl propionic acid]、アミノ酸 2 種(Phenylalanine、Tyrosine)、フェニルプロパン構造を持たない 6-Hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid である。受容体に 6.5M メタノールもしくは 2.5M 2-PA、2.2M

PEBr 0.6ml と 10mM CQA-200mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 1.0ml を 45°C で 10 min 予備加熱後、CQA esterase (0.24 mg Protein/ml) 溶液 0.4ml 添加して反応を開始した (反応液 2.0ml)。45°C で 24h 反応後、70°C で 20 min インキュベートして酵素反応を停止させた。生成物は TLC と HPLC で分析した。HPLC 分析には HPLC SCL-6A system (Shimadzu Co.) と Cosmosil 5C18-AR- II カラム (4.6 mm I.D.×250 mm, nacalai tesque Inc.) を使用した。移動相にはリン酸酸性水 (pH 2.5) とメタノールを使用し、17 min でメタノール濃度 (v/v) が 30% から 80% になるようにグラジエントをかけ、その後 10 min は 80% メタノール、さらに 100% メタノールで 10 min 流した。カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min で、検出は基質の吸収極大にあわせて 250~330 nm の範囲で分析した。

### 3-2-1-13. 酵素反応機構

#### a) CQA と PEBr および CA と PEBr における酵素反応機構

0.27~2.99M PEBr と 5~40mM CQA-200mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) からなる反応液 2.0ml と、0.75~2.25M PEBr と 5~20mM CA-200mM リン酸緩衝液 (pH3.0) からなる反応液 2.0ml を、45°C で 10 分間予備加熱後、CQA esterase 溶液 (0.96mg Protein/ml) を添加して反応を開始した。5h 反応後、アセトン 2ml を添加して酵素反応を停止させた。反応液中の生成物は HPLC で定量し Lineweaver-Burk plot を作成した。

#### b) メタノールを用いたエステル置換反応

6.56M メタノールと 2~10mM エステル化合物 (CQA、Cinnamic acid ethyl ester、Cinnamic acid benzyl ester) -200mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) からなる反応液 2.0ml を 45°C で 10 分間予備加熱後、CQA esterase 溶液 (0.96mg Protein/ml) を添加して反応を開始した。5 h 反応後、アセトン 2ml を添加して

酵素反応を停止させた。反応液中の生成物は HPLC で定量し Lineweaver-Burk plot を作成して  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $V_{max}/K_m$  を算出した。

#### c) CQA 置換反応

6.56M メタノール、2.51M 2-PA、2.25M PEBBr と 2~10mM CQA-200mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) からなる反応液 2.0ml を用いて、「メタノールを用いたエステル置換反応」に記した方法にしたがって  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $V_{max}/K_m$  を算出した。

#### d) メタノールを用いた縮合反応

6.56M メタノールと 2~10mM Cinnamic acid, *p*-Coumaric acid, Caffeic acid, 3-(3,4-Dihydroxy phenyl) propionic acid-200mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) からなる反応液 2.0ml を用いて、「メタノールを用いたエステル置換反応」に記した方法にしたがって  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $V_{max}/K_m$  を算出した。

#### 3-2-1-14. カフェー酸フェネチルエステル類の生理活性

反応液から単離した 1-および 2-CAPE の生理活性 (DPPH ラジカル捕捉活性, スーパーオキシドアニオン消去活性, 抗ガン活性) は「第 2 章」に記した方法にしたがって測定した。

#### 3-2-1-15. インフルエンザウイルス増殖阻止活性

インフルエンザウイルスは国立感染症研究所から分譲された Influenza AH1N1 型ウイルス (A/USSR/92/77 株, A ソ連型) と B 神奈川/3/76 (B 神奈川型) を使用した。インフルエンザウイルスを感染させる細胞には、国立公衆衛生院より分譲されたイヌ腎臓由来の Madin Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を用いた。

MDCK 細胞はプラスチック製組織培養用シャーレ (Nunc. A/S, Denmark) を用いて、70 g/l 炭酸水素ナトリウム水溶液 (大塚製薬株式会社) で pH 7.4 に調

整した MEM 培地 5 ml [CS (100 ml/L)、L-グルタミン(2.92  $\mu$  g/mL)、ペニシリン G カリウム(100 U/mL)、カナマイシン(60  $\mu$  g/mL)、硫酸ストレプトマイシン(100  $\mu$  g/mL)を含む] 中で、37°C、5%炭酸ガス孵卵器の中で培養した。抗ウイルス活性の測定には 48 時間培養した対数増殖期にある MDCK 細胞を用いた。

12 穴組織培養用プレート (Nunc) に培養した MDCK 細胞にインフルエンザウイルス (20 PFU/well) を接種し、35°C で 60 分間 MDCK 細胞にウイルスを吸着させた。リン酸緩衝食塩水 (PBS, Sigma) で細胞を 2 回洗浄後、CAPE を添加した維持培養液 [70 g/L NaHCO<sub>3</sub> 5 ml、50 g/L bovine serum albumin 8.0 ml、trypsin (2000 単位)1.0 ml、300 g/L glucose 2.0 ml を含む Dullubecco's modified eagle's medium (Gibco) 200 ml] 2.0 ml を加えた。35°C、炭酸ガス孵卵器内で 72 時間培養後、プレートを 2 回凍結融解してから遠心分離で細胞片を沈殿させ、ウイルスを含む上清を回収した。これをウイルスの力価測定用試料とした。

ウイルス力価測定はプラーク法でおこなった。直径 35 mm の組織培養用プレートに MDCK 細胞(2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells)を播込み、37°C、炭酸ガス孵卵器で 4 日培養して単層を形成させた。培養液を除いて PBS で洗浄後、10 倍段階希釈したウイルス力価測定用試料液 0.2 ml をシャーレに添加し、35°C で 60 分間ウイルスを MDCK 細胞に吸着させた。吸着後、PBS で細胞を洗浄し、11.5 g/L 寒天 (Bact agar, Gibco) を含む維持培養液 2 ml を重層した。なお、B 神奈川型の維持培地には 10g/L DEAE-Dextran (MW 5,000,000)水溶液を維持培地 100 ml あたり 1 ml 添加した。35°C、炭酸ガス孵卵器内で 3 日培養後、ニュートラルレッドを含む維持培養液を重層して、プラーク数を数えウイルス力価を算出した。そして、コントロールに対する比をインフルエンザウイルス増殖阻止率(%)とし、次式から算出した<sup>106)</sup>。

$$\text{インフルエンザウイルスの増殖阻止率(\%)} = [(C - S) / C] \times 100$$

C=コントロールのウイルス力価

S=供試試料のウイルス力価

### 3-2-1-16. 2-CAPE のインターフェロン誘発効果

12 穴組織培養用プレートに培養した MDCK 細胞に 2-CAPE (10 ppm) もしくはインターフェロン誘発剤 Poly (I:C) (SIGMA, 25 ppm)<sup>107)</sup> を添加した維持培養液を 2 ml 添加し、37°C で 24 時間培養した。培養液を除去、洗浄後、インフルエンザウイルス (20 PFU/well) を接種し、35°C で 60 分間 MDCK 細胞にウイルスを吸着させた。その後、上記と同様の手順でウイルス力価を測定した。

### 3-2-1-17. ウイルス感染阻害実験

ウイルス (800 PFU/ml) 懸濁液に終濃度 10 ppm 2-CAPE-0.001 容 エタノール水溶液を添加、35°C で 60 分間保った後、超遠心分離 (40,000 rpm, 4°C, 2 時間) でウイルスを沈殿させ PBS で洗浄した。沈殿物にウイルス希釈液 0.5 ml (70 g/L NaHCO<sub>3</sub> 5 ml、Dullubecco's modified eagle's medium 200 ml) を添加し 4°C で 3 時間保った後、プラーク法でウイルス力価を測定した。

## 3-2-2. リパーゼを用いた CQA と vinyl cinnamate からジフェニルプロピルキナ酸類への酵素変換と生理活性

### 3-2-2-1. 酵素のスクリーニング

CQA と Vinyl cinnamate (VCi, Lancaster) から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid(CCQA)に変換できる酵素と溶媒の組み合わせをスクリーニングした。供試酵素には 2-1-1. 2) 酵素のスクリーニングで使用した 14 種の市販リパーゼを、



CQA を溶解する溶媒には4種類の溶媒 (50mM リン酸緩衝液 pH 7.0、メタノール、DMSO、DMF) を検討した。

市販リパーゼ 50 mg と 10mM CQA を含む溶媒 0.6 ml を 40°C で 5 分間予備加温後、2.3M VCi 0.4 ml 添加して反応を開始した。酵素は粉末状態で溶媒に懸濁した状態で反応させた。40°C で 24 時間反応後、80°C に 1 時間保って酵素反応を停止させた。コントロールは 121°C で 20 分間オートクレーブ処理した酵素を同条件で反応させた。反応液中の生成物は HPLC で分析した。HPLC 分析条件は 2-1-1. 2) にしたがった。

### 3-2-2-2. 反応生成物の精製と同定

反応液 35 ml を減圧濃縮し、酢酸 (2 ml/L) で平衡化した Sephadex LH-20 カラム (26 mm I.D. × 300 mm) にアプライし、同溶液で展開して CQA を溶出させた。その後、メタノールで展開し 325 nm の吸収フラクション 250 ml を集め減圧濃縮後、HPLC で目的のピークを分取した。減圧濃縮した溶液に水を加えて 4°C で再結晶し精製標品を得た。

分取用 HPLC には HPLC LC-10 system (Shimadzu Co.) と HiQsil C18 v カラム (φ 5 μm) (4.6 mm I.D. × 250 mm; KYA TECH Corp.) を使用した。移動相には蒸留水とメタノールを使用し、20 分間でメタノール (v/v) が 30% から 100% になるようにグラジエントをかけ、その後 10 分間でメタノール 30% に戻るようにプログラムした。カラム温度は 40°C、流速は 1.0 ml/min、溶出液は吸光度 329 nm で検出した。

精製した反応生成物はエタノールに溶解し FAB-MS (JEOL The Mstation JMS-700YKM, JEOL Ltd.) と <sup>1</sup>H-NMR (JEOL EX-270, JEOL Ltd.) で機器分析を行った。

### 3-2-2-3. Lipase AL を用いた CQA と VCi から CCQA への変換条件の検討

「4-2-2-1. 酵素のスクリーニング」に記した方法を基本として、CQA 濃度 (1~30mM) と VCi 濃度 (0.12~3.07 M)、反応温度 (35~45°C)、酵素量 (250~1500U) を変えて反応を行い、CCQA 生成量を測定した。

## 3-3. 実験結果および考察

### 3-3-1. クロロゲン酸エステラーゼによるカフェー酸フェネチルエステル類への酵素変換

#### 3-3-1-1. CQA と 2-PA から CAPE への酵素変換

市販リパーゼ 14 種を CQA と 2-PA に作用させたが、反応液から新たな生成物を検出することができなかつた。しかし、CQA esterase と Tannase で処理した反応液から、Rf 0.55 と r.t. 16.2 min に新たなスポットとピーク (Peak A) が検出された (Fig. 37.)。これらの値は 2-CAPE 標準物質と一致した。

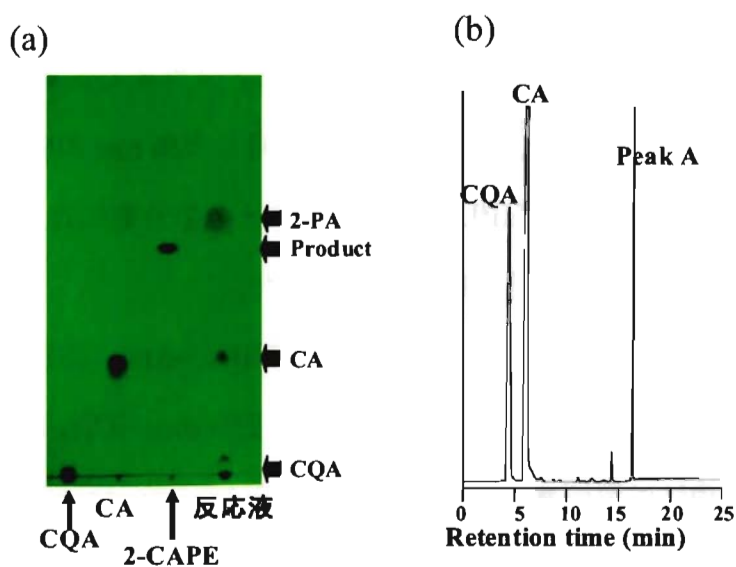


Fig. 37. Reaction products from reaction liquid with CQA esterase

(a) TLC ; (b) HPLC

### 3-3-1-2. 反応生成物の精製と機器分析

CQA esterase 反応液中に検出された Peak A を HPLC で分取した。精製物を LC-MS で分析すると、ESI ネガティブ イオンモードで  $m/z$  283 に脱プロトン化分子が認められたことから、分子量を 284 と決定した(Fig. 38.)。また、 $^1\text{H-NMR}$  の各ピーク(Fig. 39.)は、Fig. 40.に示した各原子に帰属することができた。 $\delta$  2.97 (t, 2H,  $J=7\text{Hz}$ , H at  $\text{CH}_2$ ), 4.35 (t, 2H,  $J=7\text{Hz}$ , H at  $\text{CH}_2$ ), 4.91 (s, 2H, H at OH), 6.20 (d, 1H,  $J=16\text{Hz}$ , H at C8), 6.77 (d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_5$ ), 6.9 (m, 1H, H at  $\text{C}_6$ ), 7.02(m, 1H, H at  $\text{C}_2$ ), 7.2-7.3 (m, 3H, H at  $\text{C}_{3,4,5}$ ), 7.5 (d, 2H,  $J=16\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_2$  and  $\text{C}_6$ ), 7.72(d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_7$ )

これらの結果から、CQA esterase が CQA と 2-PA から変換した物質を 2-CAPE と同定した。またこの結果から CQA esterase は加水分解反応の他にエステル置換反応も触媒できることを明らかにすることができた。

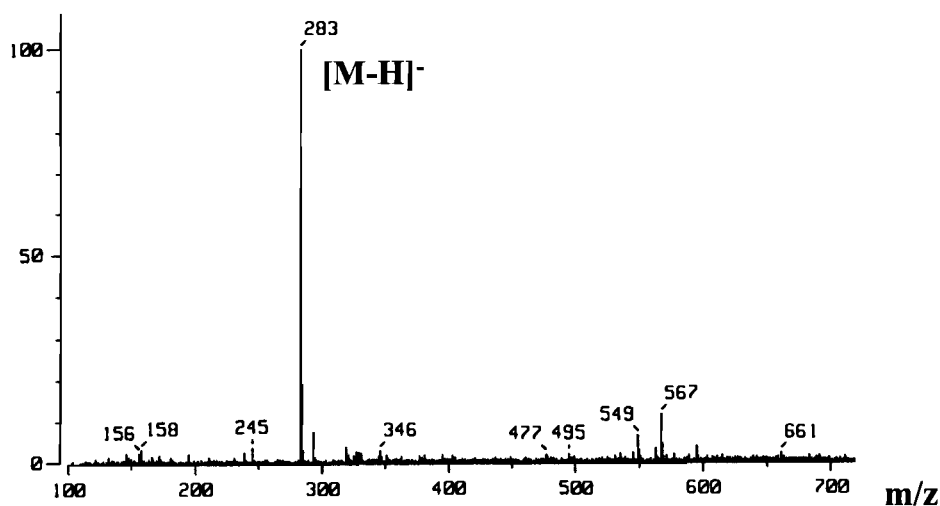
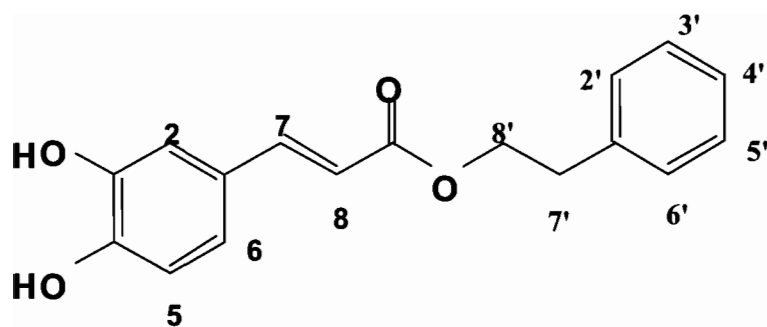


Fig.38. LC-MS of the purified product.



**Fig. 39.** Structure of reaction product

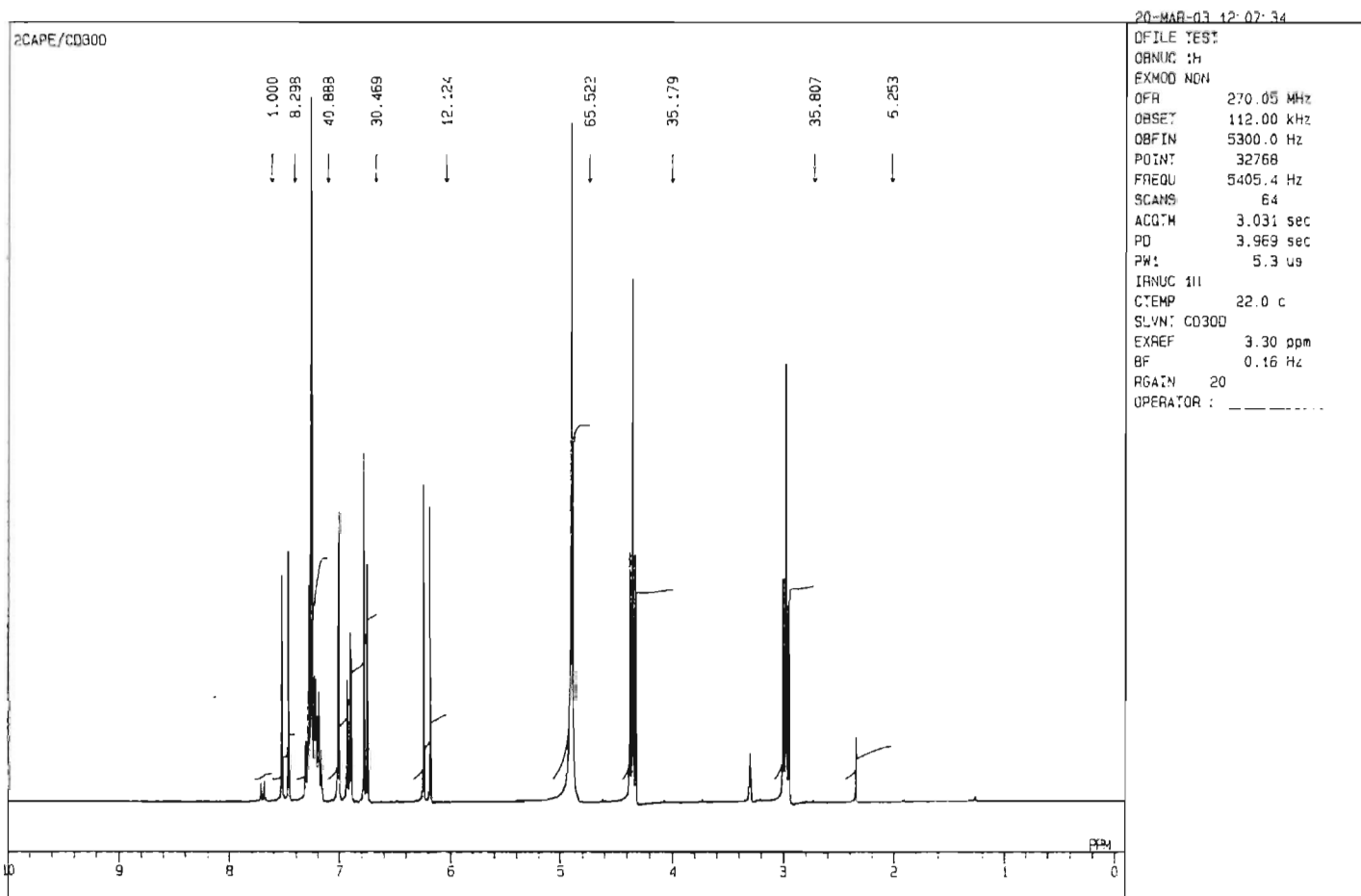


Fig.40. <sup>1</sup>H NMR of the reaction product

### 3-3-1-3. CQA esterase を用いた CQA と 2-PA から 2-CAPE への最適変換条件の検討

0.04M 2-PA、10.2mM CQA-リン酸緩衝液 (pH 6.5)、CQA esterase (0.24mg Protein/ml) からなる反応液 2.0ml を 45°C で 4 h 反応させると、5.1mM 2-CAPE が生成した (CQA に対するモル変換率 50%)。また、Tannase を用いたときの最適条件は、0.8M 2-PA、10mM CQA-リン酸緩衝液 (pH 6.5)、酵素 (150U/ml) からなる反応液 2.0ml を 37°C で 4 h 反応させると、2.4mM 2-CAPE が生成した (モル変換率 24%)。

加水分解酵素がエステル置換反応を触媒するとき、反応液に水が存在すると加水分解反応が主要な反応となり、エステル置換反応はほとんど起こらなくなる。逆に、2-PA 濃度が高くなると酵素が失活する可能性が高い。そこで固定化酵素を検討した。0.8M 2-PA と 10mM CQA-リン酸緩衝液 (pH 6.0) からなる反応液 2.0 ml にキトパール BCW-2503 に固定化した CQA esterase (9.6 mg Protein/g) 0.05 g/ml を添加し、50°C で 25 h 反応させたところ、5.2mM 2-CAPE が生成した (モル変換率 52%)。固定化酵素を用いても反応系に少量の水が存在するため、モル変換率を高めることができなかった。

### 3-3-1-4. CQA-1-PA 二相系でのエステル置換反応

2-PA の代わりに 1-PA を基質に用いた反応液から Rf 0.25 に新たなスポット (Fig. 41-a) と、新たなピーク (r.t. 16.3 min、Peak B) が検出された (Fig. 41-b)。

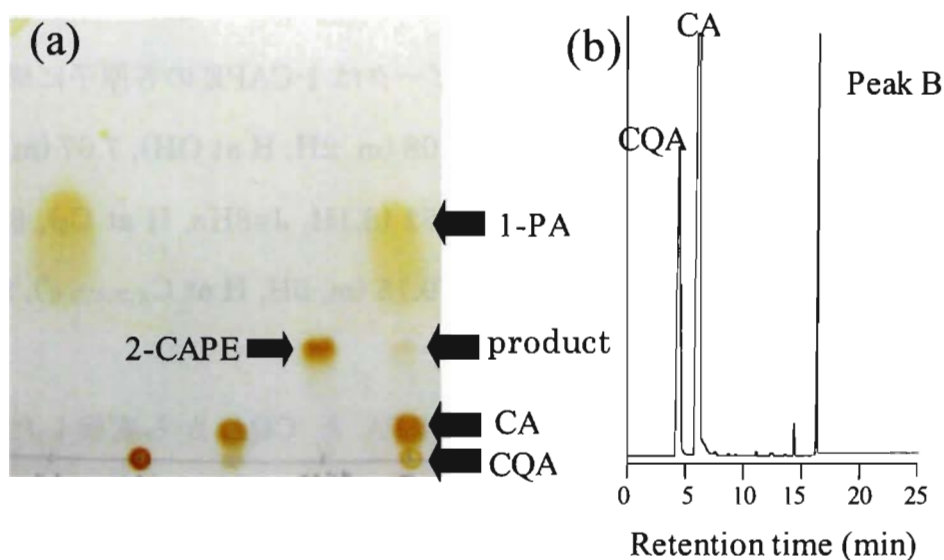
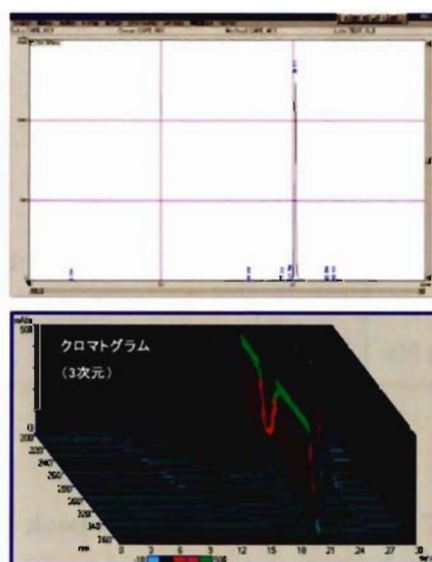


Fig.41. TLC(a) and HPLC(b) analysis of the reaction liquid

### 3-3-1-5. 反応生成物の精製

反応液 300ml にクロロホルム 285 ml を加え振とう後、遠心分離して 3 層(上, 中, 下) に分離した。下層と中層のエタノール抽出液を回収し Sephadex LH-20 カラムでゲルろ過後、330 nm に吸収を持つ画分を減圧濃縮して 122 mg の物質を得た。これを HPLC で Peak B を分取し、最終精製物 47 mg を得た(Fig. 42)。



Analytical conditions:  
 HPLC: LC-10(SHIMADZU)  
 Column: HiQsil C18v KYA TECH Corp.  
 ( $\phi$  5  $\mu$  m) (4.6  $\times$  250mm I.D.)  
 Eluent : (A) H<sub>2</sub>O/MeOH =80/20(v/v)  
 (B) MeOH  
 (A)/(B) 100/0 $\rightarrow$ 40/60 (0 $\sim$ 10min)  
 (A)/(B) 40/60 $\rightarrow$ 0/100 ( $\sim$ 20min)  
 Flow rate: 1.0ml/min  
 Column temp: 40 $^{\circ}$ C  
 Detector: UV 329nm

Fig. 42. HPLC analysis of purified products.

### 3-3-1-6. 精製標品の機器分析

精製標品は ESI ネガティブ イオンモードで  $m/z$  283 に脱プロトン化分子を示した (Fig. 43.)。また、 $^1\text{H-NMR}$  の各ピークは 1-CAPE の各原子に帰属することができた  $\delta$  3.30 (m, 3H, H at  $\text{CH}_3$ ), 5.08 (m, 2H, H at OH), 7.67 (m, 1H, H at  $\text{C}_7$ ), 8.03 (d, 1H,  $J=16\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_8$ ), 8.52 (d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_5$ ), 8.68 (m, 1H, H at  $\text{C}_6$ ), 8.78 (s, 1H, H at  $\text{C}_2$ ), 8.98-79.15 (m, 5H, H at  $\text{C}_{2',3',4',5',6'}$ ), 9.29 (d, 2H,  $J=16\text{Hz}$ , H at  $\text{C}_2'$  and  $\text{C}_6'$ ) (Fig. 44.)。

これらの結果から、CQA esterase が 1-PA と CQA から変換した物質は 1-CAPE と同定した。これらの結果から、CQA esterase は 2-PA だけでなく 1-PA もエステル置換反応の基質として利用できることを明らかにすることができた。

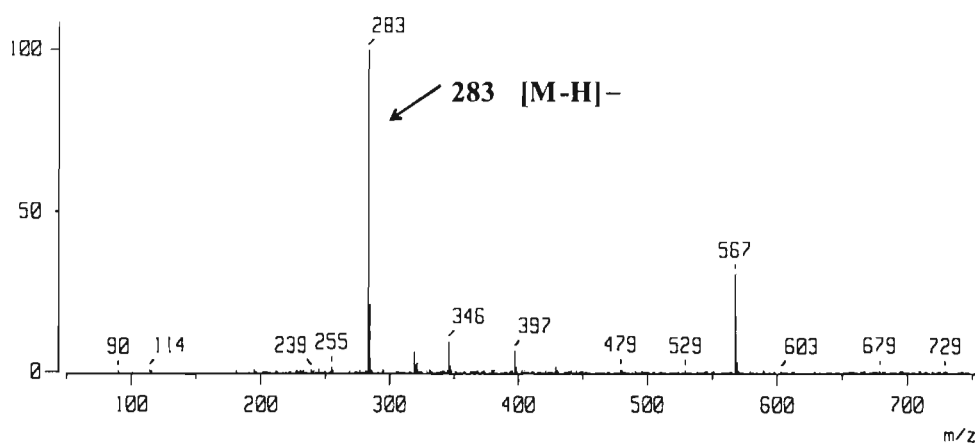
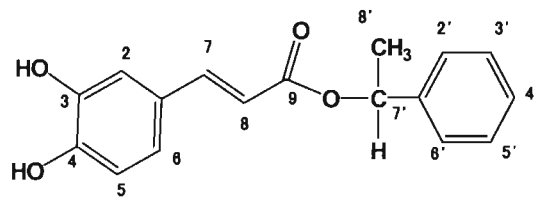
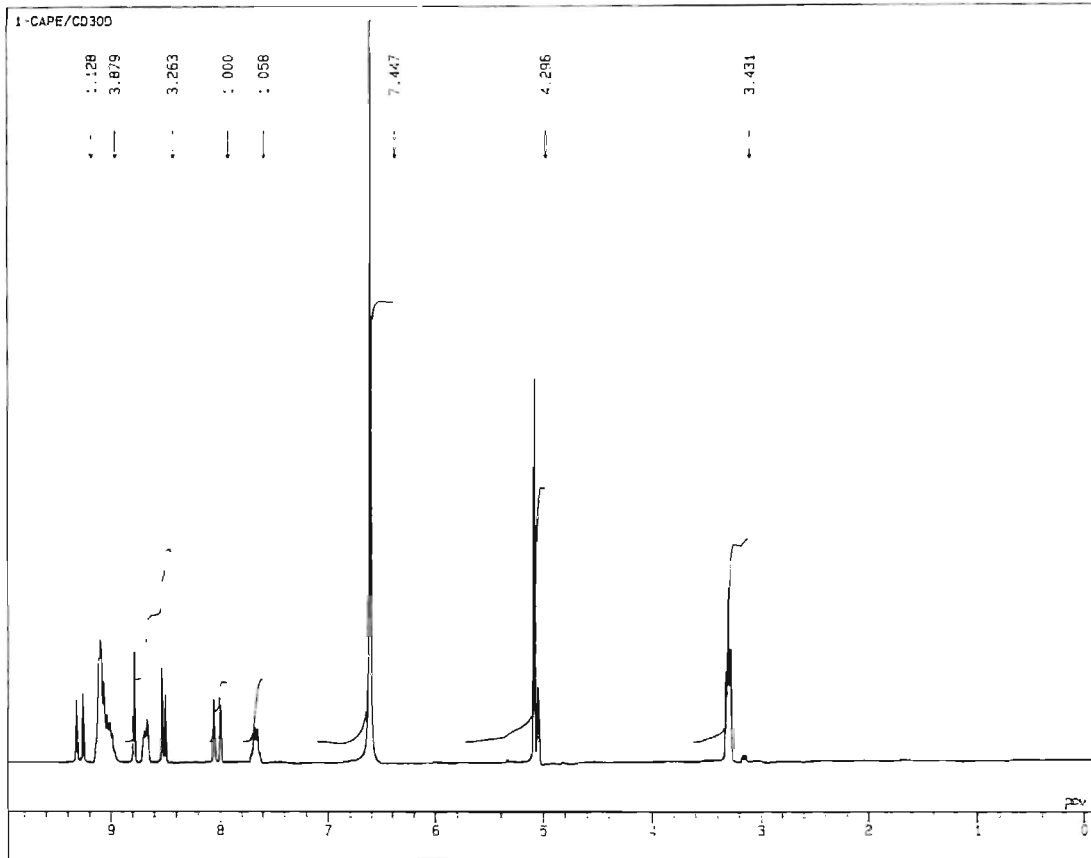


Fig. 43. LC-MS of purified sample of peak B.





M.W. 284

Fig. 44.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of purified sample of peak B.

### 3-3-1-7. CQA esterase と Tannase の光学特異性

CQA esterase は R 体より S 体の 1-PA を認識して、(S)-1-CAPE を 3 倍多く生成した(Fig. 45-a, b)。また、ラセミ体 1-PA を基質に用いたときに得られた (S)-1-CAPE の e.e.値は 50%(Fig. 45-c)、Tannase では 30%であった (Fig. 45-d)。

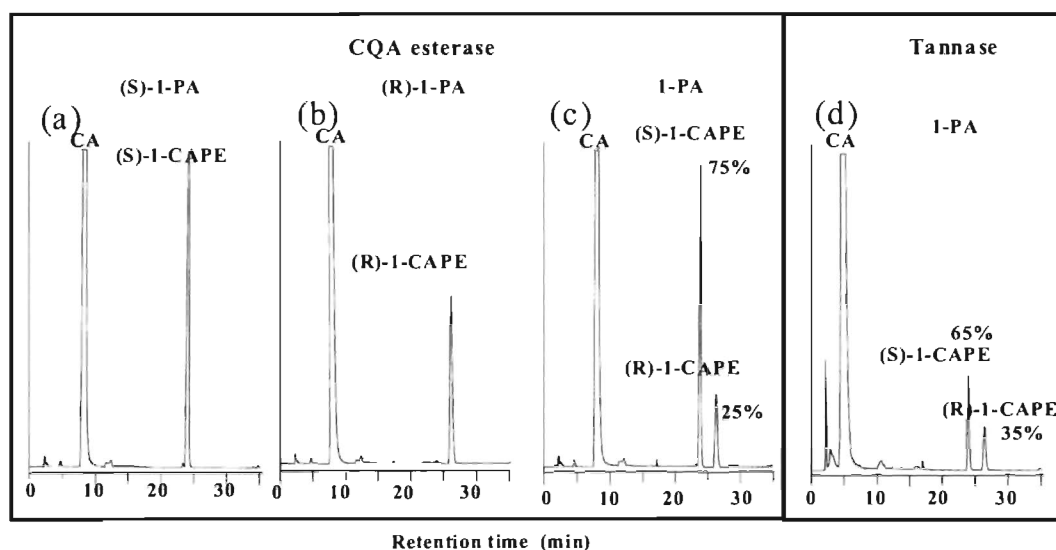


Fig. 45. Optical specificity of the reaction catalyzed by CQA esterase and Tannase.

(a), the products from CQA and (S)-1-PA by CQA esterase; (b), the products from CQA and (R)-1-PA by CQA esterase; (c), the products from CQA and racemic 1-PA by CQA esterase; (d), the products from CQA and 1-PA by tannase.

CQA esterase は Tannase よりエステル置換反応における光学特異性が高く、S 体をより多く生成することを明らかにした。

### 3-3-1-8. 臭素置換反応

CQA esterase や Tannase で生成した CAPE 類は PA 層に蓄積していて、PA と CAPE を分離するのは難しかったので、PA の代わりに Phenethyl halide を基質に用いて CAPE を酵素合成できれば、得られた CAPE を反応系から分離しやすくなると考え実験を行った。

Table 12. The detection of products from phenethyl halide by CQA esterase

Phenylethyl halides	Substitution reaction
2-Phenylethyl chloride	-
2-Phenylethyl bromide	+
2-Phenylethyl iodine	-
1-Phenylethyl chloride	±
1-Phenylethyl bromide	±

+, detected one new peak other than caffeic acid

-, detected no peaks other than caffeic acid

2-phenylethyl chloride と 2-phenylethyl iodide を基質に用いても新たな生成物は検出されなかったが、2-phenylethyl bromide (PEBr) から生成物を検出することができた (Table 12)。しかし Tannase では、いずれの Phenethyl halide を用いても新たな生成物を確認することができなかった。

得られた生成物は 2-CAPE と同じ Rf 値 (Rf 0.59) にスポットが出現し、また、同じ r.t. (16.2 min) にピークが検出された (Fig. 46-a,b)。

単離した生成物を LC-MS 分析したところ、ESI ネガティブイオンモードで  $m/z$  283 に脱プロトン化分子が認められたことから生成物を 2-CAPE と同定した。これらの結果から CQA esterase は加水分解反応とエステル置換反応以外に、新たに臭素置換反応も触媒できることを見出した。

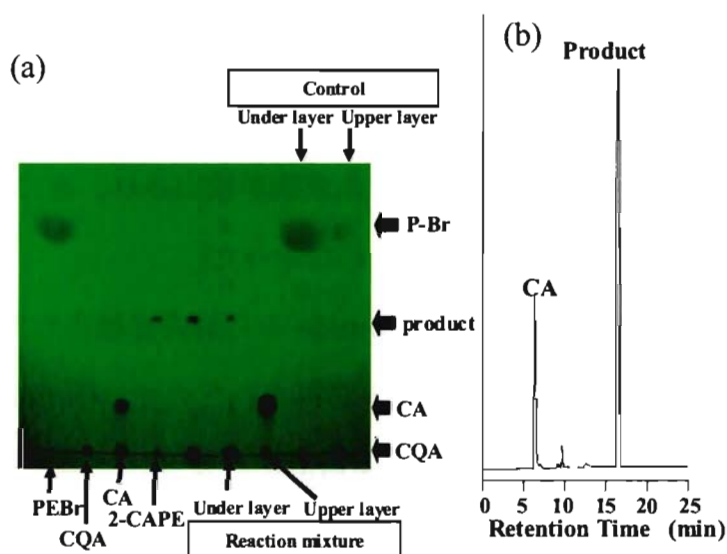


Fig. 46. The detection of products by TLC (a) and HPLC (b) analysis.

1-phenylethyl chloride と 1-phenylethyl bromide を基質に用いた反応液からは、HPLC 分析で多数のピークが検出された。これらのピークは酵素無添加のコントロールからも検出されたことから、化学反応によって生成したと考えられる。

### 3-3-1-9. Phenyl bromide 化合物の炭素鎖長がカフェー酸エステル類合成に与える効果

phenyl 基に鎖長の異なる側鎖が結合した臭化物を受容体として臭素置換反応を行った結果、2-Phenylethyl bromide と 3-Phenylpropyl bromide から TLC と HPLC 分析で新たな生成物を検出することができた (Table 13)。Benzyl bromide からは多数の生成物が検出され、逆に 4-Phenylbutyl bromide からは新たな生成物が検出されなかった。

3-Phenylpropyl bromide から酵素変換された物質は r.t. 16.8 min、 $m/z$  297 に  $[M-H]^-$  フラグメントが得られたので、Caffeic acid phenyl- propyl ester と同定した。つまり CQA esterase は受容体に用いた Phenyl bromide の種類に対応したカフェー酸エステル類に変換していた。

Table 13. Effect of carbon chain length of phenyl bromide compounds on the production of caffeic acid esters.

Phenyl bromide	Substitution reaction	Conversion rate(%)
Benzyl bromide	±	N.D.
Phenylethyl bromide	+	4.6
Phenylpropyl bromide	+	2.3
Phenylbutyl bromide	-	N.D.

+, detected one new peak other than caffeic acid

-, detected no peaks other than caffeic acid

±, detected a number of peaks

Benzyl bromide は Phenyl 基のすぐ隣の  $\alpha$  位の炭素に臭素が結合しているため、Br の反応性が高く、化学反応が起こって多種類の生成物が生成したと考えられる。一方、2-Phenylethyl bromide や 3-Phenylpropyl bromide は、Phenyl 基と臭素の距離が適当で、化学反応が起こるほど高いエネルギーをもたないが、酵素 (CQA esterase) のような触媒が存在すると反応が進行すると考えられる。しかし、4-Phenylbutyl bromide になると Phenyl 基と臭素の距離が離れすぎて、Phenyl 基による臭素の電子吸引力が低下して反応は起こらなかったと推測される。

また、これらの化合物の大きさも重要で、酵素の基質結合部位にあった大きさの化合物のみが基質として認識された可能性も考えられる。

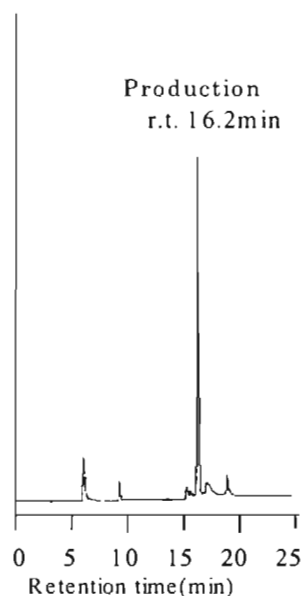
#### 3-3-1-10. CQA esterase を用いた臭素置換反応の最適条件の検討

2.2M PEBr と 20mM CQA-200mM クエン酸緩衝液 (pH 3)、CQA esterase (0.24 mg Protein/ml) からなる反応液 2.0ml を 45°C で 24 h 保つと、2-CAPE が 0.93  $\mu$  mol 生成した (モル変換率 4.6 %)。

#### 3-3-1-11. 縮合反応

CQA esterase は Cinnamoyl 基や Caffeyoyl 基, *p*-Coumaroyl 基をもつ化合物を加水分解すること<sup>14)</sup>と、エステル置換および臭素置換反応でも Caffeyoyl 基が受容体へ結合していたことから、CQA esterase は桂皮酸骨格を認識して酵素基質複合体を形成していると考えた。さらに本酵素は、桂皮酸エステル化合物だけでなく、桂皮酸化合物も基質として認識できるのではないかと考えた。つまり桂皮酸化合物と 2-PA や PEBr から縮合反応を触媒してエステル化合物 (たとえば 2-CAPE) に変換できるのではないかと考えた。そこで、PEBr と CA に CQA esterase を作用させたところ、新たな生成物が得られた (Fig. 47.)。

この物質は r.t. 16.2 min にピークを示し  $m/z$  284 に  $[M-H]^-$  フラグメントを示したことから 2-CAPE と同定した。この結果から CQA esterase は CA と 2-PA から 2-CAPE に変換する縮合反応も触媒できることが明らかにできた。



**Fig. 47.** HPLC analysis of the reaction liquid from CA and PEBr by CQA

### 3-3-1-12. CA と PEBr から 2-CAPE への最適変換条件の検討

2.99M PEBr と 10mM CA-200 mM クエン酸緩衝液 (pH 4)、CQA esterase(0.24 mg Protein/ml)からなる反応液 2.0ml を 50°C で 24h 酵素反応させると、1.33  $\mu$  mol 2-CAPE が生成した (変換率 6.7%)。

この変換率はハロゲン置換反応 (変換率 4.6%) より高いものの、エステル置換反応 (変換率 50%) に比べると圧倒的に低かった。この結果から、CQA esterase が 2-CAPE を酵素合成するのにもっとも適した反応はエステル置換反応であると言える。

### 3-3-1-13. 縮合反応の基質特異性

CQA esterase が触媒する縮合反応の基質をスクリーニングするとともに、本酵素の活性中心付近の立体構造を考察した。検討した基質（供与体）には、桂皮酸骨格をもつ化合物ともたない化合物、Phenyl 基に異なる鎖長の置換基が結合した化合物、また異なる置換基（-OH, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>）が結合した 17 種類の化合物を検討した（Table 14, 15）。

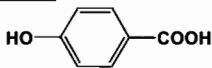
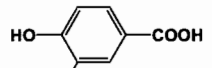
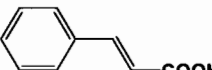
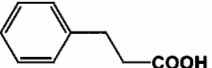
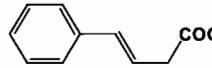
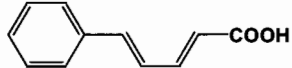
また、受容体には一相系となるメタノールと二相系を構成する 2-PA を使用した。検討した基質の中から新たな生成物が確認できた場合は、基質を PEBr に置き換えて酵素反応をおこなった。

### 3-3-1-14.. 鎖長の異なる phenyl alkanolic acid のスクリーニング

フェニルプロパノイドのプロパノイド鎖長が異なる 5 種類の供与体のうち、Cinnamic acid と 3-Phenyl propionic acid から対応するエステル化物のピークを HPLC で検出することができた（Table 14）。この結果から CQA esterase は Phenyl propionic acid 骨格を持つ化合物を基質として認識していると考えた。また、メタノールを受容体とした縮合反応では Cinnamic acid（変換率 3.7%）より 3-Phenyl propionic acid（変換率 8.1%）が高い変換率を示した。Cinnamic acid は Phenyl 基に対して二重結合を持つ側鎖が同じ平面上に位置し、側鎖が自由に回転しにくい立体構造をしているのに対して、3-Phenyl propionic acid は二重結合を持たないので、側鎖は Phenyl 基に対して立体的に突きだし、自由に回転することができる。つまり、反応が起こる基質のカルボキシル末端部位の回転できる範囲が、Cinnamic acid より 3-Phenyl propionic acid の方が大きい。ため、酵素の活性中心付近の構造にあった立体的配置をとりやすい 3-Phenyl propionic acid が高い変換率を示したと推察される。

なお、受容体をメタノールから 2-PA に変えると変換率が低下した。これは水相と二相系を形成する 2-PA は界面でしか酵素と接触する機会がないので、メタノールに比べると変換率が低かったと考えられる。さらに 3-Phenyl propionic acid の UV 吸収極大 ( $\lambda_{\max}$ :258.7nm) の分子吸光係数 ( $\log_{10}E=2$ ) が 2-CAPE に比べると小さいため、HPLC 分析で生成物を高感度に検出できなかった可能性も考えられる。分析方法を変えれば 3-Phenyl propionic acid と 2-PA の反応液からもエステル化物が検出できる可能性があると思われる。

Table 14. Screening of phenyl alkanolic acids.

	MeOH	2-PA	PEBr
 p-Hydroxybenzoic acid	N.D.	N.D.	N.T.
 Protocatechuic acid	N.D.	N.D.	N.T.
 Cinnamic acid	3.7	1.1	3.1
 3-Phenylpropionic	8.1	N.D.	N.T.
 trans-Styryl acetic acid	N.D.	N.D.	N.T.
 5-Phenylpenta-2,4-dienoic	N.D.	N.D.	N.T.

Numerical values in the table was conversion rate(%).

+, detected one new peak other than substrate

N.D., detected no peaks other than substrate

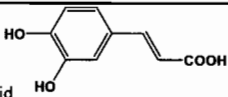
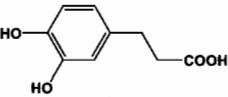
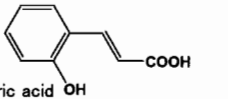
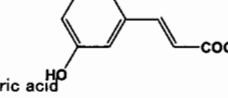
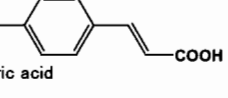
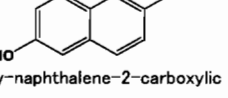
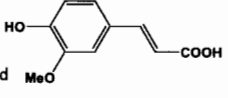
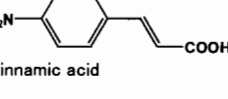
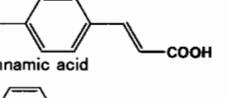
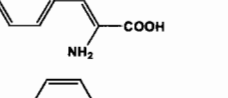
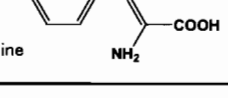
### 3-3-1-15. 桂皮酸類とアミノ酸のスクリーニング

CQA esterase が Cinnamic acid とメタノールあるいは 2-PA、2-PEBr との間で縮合反応を触媒できたことから、さらに 8 種の桂皮酸類と 2 種のアミノ酸、6-Hydroxynaphthalene-2-carboxylic acid が本酵素の基質 (供与体) となるか検討した。



受容体にメタノールを用いたときの変換率は 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid > *p*-Coumaric acid > Caffeic acid > 6-Hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid > *m*-Coumaric acid > Ferulic acid = 4-Amino cinnamic acid の順に高かった (Table 15)。Phenyl 基の置換基に注目すると、Caffeic acid や *p*-Coumaric acid のように *p* 位にヒドロキシル基をもつ化合物の変換率が高かった。しかし、

Table 15. Screening of cinnamic acids and amino acids.

	MeOH	2-PA	PEBr	PPBr
 Caffeic acid	18.6	13.3	4.6	1.2
 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid	45.8	28.1	8.0	3.8
 <i>o</i> -Coumaric acid	N.D.	N.D.	N.T.	N.T.
 <i>m</i> -Coumaric acid	1.1	0.8	5.3	2.2
 <i>p</i> -Coumaric acid	21.9	10.2	19.7	2.8
 6-Hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid	2.7	0.3	N.T.	N.T.
 Ferulic acid	0.5	N.D.	N.T.	N.T.
 4-Amino cinnamic acid	0.5	N.T.	N.T.	N.T.
 4-Nitro cinnamic acid	N.D.	N.D.	N.T.	N.T.
 Tyrosine	N.D.	N.D.	N.D.	N.T.
 Phenylalanine	N.D.	N.D.	N.D.	N.T.

Numerical values in the table was conversion rate (%). +, detected one new peak other than substrate; N.D., detected no peaks other than substrate; N.T., Not tested.

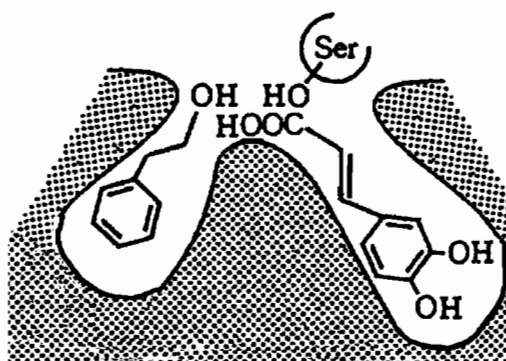
Ferulic acid (変換率 0.5) や *o*-Coumaric acid (変換率 0) ではほとんど反応が進行しなかったことから、Phenyl 基の *o* 位と *m* 位が結合する酵素の基質結合

部位の空間が狭く、*m*-位が結合する空間はヒドロキシル基は入れるがメトキシル基の大きさになると立体的に入りこめない程度の空間しかなく、*σ*-位当たりの空間はヒドロキシル基も入ることができない大きさであると推測した。

また、*p*-位に結合した置換基の種類を検討した結果、ヒドロキシル基以外にアミノ基が結合した 4-Amino cinnamic acid でも縮合反応が進行し、変換率は低いながらも新たな生成物を確認することができた (Table 15)。しかし、4-Nitrocinnamic acid では新たな生成物を検出することができなかったことから、アミノ基とニトロ基の求核反応力の差が反映した結果と考えられる。

一方、Cinnamic acid より 3-Phenyl propionic acid が (Table 14)、また Caffeic acid より 3-(3,4-dihydroxy phenyl)propionic acid が圧倒的に高い変換率を示した (Table 15)。この結果は、3-Phenyl propionic acid 骨格をもつ基質が酵素の活性中心に到達するためには、Phenyl 基に対して炭素鎖が自由に回転できる構造 (二重結合より一重結合) をもった化合物が活性中心に到達しやすいとと考えられる。また、6-Hydroxynaphthalene-2-carboxylic acid のように 3-Phenyl propionic acid 骨格をもたないベンゼン環が 2 つ結合した化合物でも反応が進行したのに対して、2 種類のアミノ酸では酵素反応が進行しなかったことから、酵素の活性中心はフェニル基の幅ほどの狭くて平面的な構造を持ち、フェニル基とプロパノイド基の炭素鎖と接する酵素側の部分には疎水性アミノ酸残基が配置され、疎水結合で酵素と基質を固定していると推測している。これらの結果から、*p*-位にヒドロキシル基が結合した 3-Phenyl propionic acid 骨格をもつ化合物が CQA esterase の基質結合部位に入り、酵素のアミノ酸残基と *p*-位のヒドロキシル基が水素結合を形成するとともに、フェニル基とプロパノイド基の炭素鎖が疎水結合で酵素タンパクに固定化されて、安定した酵素基質複合体を形成していると考えている。一方、受容体であるアルコールや臭化物も酵素のもう一つの基質結合部位に入る。酵素の活性中心で 3-Phenyl propionic acid のカ

ルボキシル基が活性化されるとともに、すぐ近くにある受容体の OH 基との間に新たにエステル結合を形成させていると考えている(Fig.48)。



**Fig. 48.** Model of active center in CQA esterase combined with CA and 2-PA.

### 3-3-1-16. PEBr を受容体とした臭素置換反応と縮合反応

CQA と PEBr、CA と PEBr からなる二基質の濃度を変えて酵素反応をおこない、Lineweaver-Burk plot を描いたところ、ラインが一点に収束した。本反

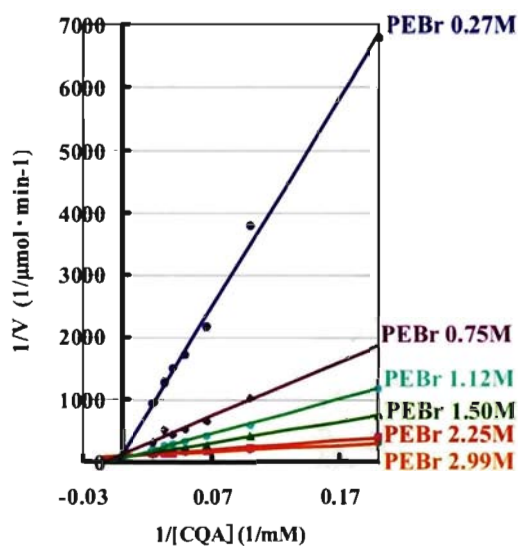


Fig. 49. Lineweaver-Burk plot against CQA and PEBr as substrates.

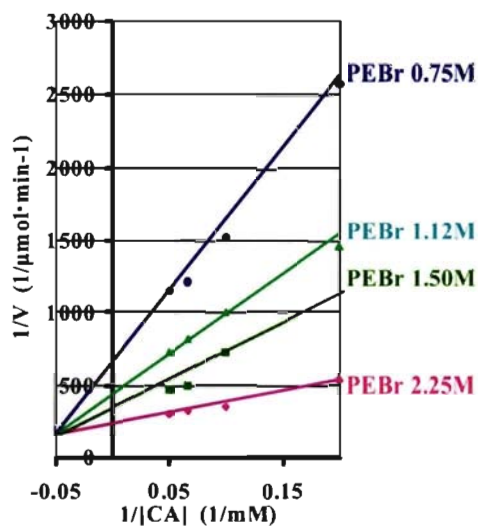


Fig. 50. Lineweaver-Burk plot against CA and PEBr as substrates.

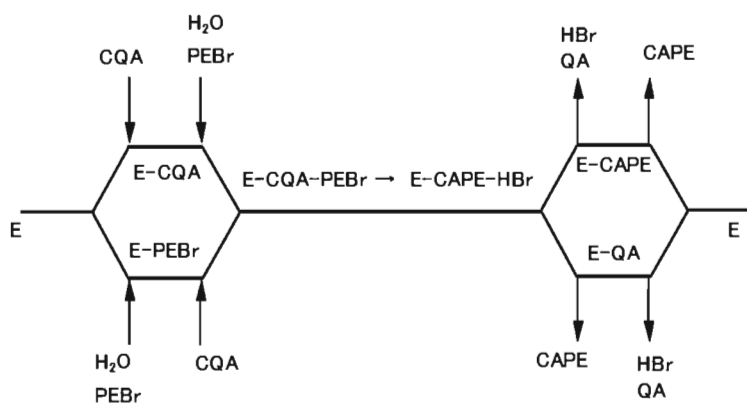


Fig. 51. Reaction mechanism of CQA esterase with CQA and PEBr as substrates.

応では二基質のいずれを先に添加しても反応が進行したことから、高速平衡ランダム BiBi メカニズム (Fig. 49, Fig. 50.) で反応が進行していると考えている。本酵素の2つの基質結合部位 (ポケット) に CQA (あるいは CA) と PEBr が結合して、酵素基質複合体を形成する (Fig. 48)。このとき先行基質と後続基質は互いに無関係に酵素と平衡にあると考えられる。次に活性部位で CQA あるいは CA のカルボニル基を活性化させるとともに、別のポケットに結合している PEBr の Br を解離させて活性化した PE と CA を結合させて反応が進行していると推測している (Fig. 51.)。

### 3-3-1-17. メタノールを用いたエステル置換反応

3種類の供与体 (CQA、Cinnamic acid ethyl ester、Cinnamic acid benzyl ester) とメタノールを受容体とした二基質の濃度を変えて Lineweaver-Burk plot を描いて、 $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $V_{max}/K_m$  を算出した。これらの反応は供与体がエステル化合物であるため、供与体を加水分解する反応と、供与体と受容体の間でエステル置換する2種類の反応が同時に進行することになる。エステル置換反応の  $V_{max}/K_m$  値が加水分解反応の値よりも大きかったことから、エステル置換反応が加水分解反応よりも優先的に進行していると考えられる (Table 16)。

Table 16. Ester substitution reaction with methanol.

		$V_{max}$ (M/min)	$K_m$ (M)	$V_{max}/K_m$ (min <sup>-1</sup> )
CQA	Ester substitution reaction	$1.0 \times 10^{-2}$	$7.0 \times 10^{-3}$	1.4
	Hydrolytic reaction	$1.7 \times 10^{-3}$	$5.2 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-1}$
Cinnamic acid ethyl ester	Ester substitution reaction	$3.1 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-2}$
	Hydrolytic reaction	$5.8 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-2}$	$4.8 \times 10^{-3}$
Cinnamic acid benzyl ester	Ester substitution reaction	$4.0 \times 10^{-4}$	$4.4 \times 10^{-2}$	$9.1 \times 10^{-3}$
	Hydrolytic reaction	$4.1 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-2}$	$4.1 \times 10^{-3}$

### 3-3-1-18. CQA を供与体とした置換反応

3種類の受容体（メタノール, 2-PA, PEBr）と CQA を供与体とした二基質間で置換反応を行わせ、Lineweaver-Burk plot を描いたところ、 $V_{max}/K_m$  値はメタノール>2-PA>PEBr の順であった（Table 17）。また、CQA とメタノー

Table 17. Ester substitution reaction with CQA.

		$V_{max}$ (M/min)	$K_m$ (M)	$V_{max}/K_m$ (min <sup>-1</sup> )
MeOH	Ester substitution reaction	$1.0 \times 10^{-2}$	$7.0 \times 10^{-3}$	1.4
	Hydrolytic reaction	$1.7 \times 10^{-3}$	$5.2 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-1}$
2-PA	Ester substitution reaction	$9.1 \times 10^{-4}$	$7.5 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-2}$
	Hydrolytic reaction	$2.8 \times 10^{-2}$	$8.2 \times 10^{-1}$	2.2
PEBr	Halogen substitution reaction	$9.0 \times 10^{-6}$	$4.4 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$

ルの組み合わせではエステル置換反応の  $V_{max}/K_m$  値が加水分解反応よりも圧倒的に高かったが、CQA と 2-PA の組み合わせでは逆にエステル置換反応よりも加水分解反応が高かった。これは受容体の水への溶解度の違いによると考えられる。メタノールは緩衝液と一相系を形成するが、2-PA と PEBr は緩衝液と混ざらず二相系をつくる。メタノールを受容体とする一相系では、エステル置換反応が優先的に進行し、二相系を形成した反応液では、酵素と受容体との接触回数が少なく、緩衝液に溶けている CQA との接触が多いため、CQA の加水分解反応が優先的に進行したと考えられる。CQA esterase は加水分解酵素として報告されたが、条件を整えば加水分解反応よりもエステル置換反応が優先的に進行することを明らかにすることができた。

### 3-3-1-19. カフェー酸フェネチルエステル の生理活性

#### a) 抗酸化活性の測定

1-CAPE は  $12.3 \mu\text{M}$ 、2-CAPE では  $11.0 \mu\text{M}$  で DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) ラジカルの吸光度を半減させた。この値は CQA や CA とほぼ同じ値、代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸 ( $20.3 \mu\text{M}$ ) や  $\alpha$ -トコフェロール ( $13.2 \mu\text{M}$ ) よりも小さな値であった。したがって、CAPE 類に強いラジカル消去活性が検出された (Fig. 52.)。

また、1-CAPE は  $5.1 \mu\text{M}$ 、2-CAPE では  $5.7 \mu\text{M}$  でスーパーオキシドアニオンを半減させた (Fig. 53.)。これらの値は CQA や CA とほぼ同じ値であった。

これらの結果から 1-および 2-CAPE は CQA や CA と同程度の抗酸化活性を持つことを明らかにした。

CAPE は DPPH ラジカルとスーパーオキシドアニオンを消去したところから、フリーラジカルを捕捉して抗酸化活性を示していると考えられる。

Nakayama ら<sup>108)</sup>は Chinese Hamster 繊維芽 V79 細胞を使って  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって引き起こされる細胞毒性や細胞内の DNA 損傷を CA-Et は有意に阻止した

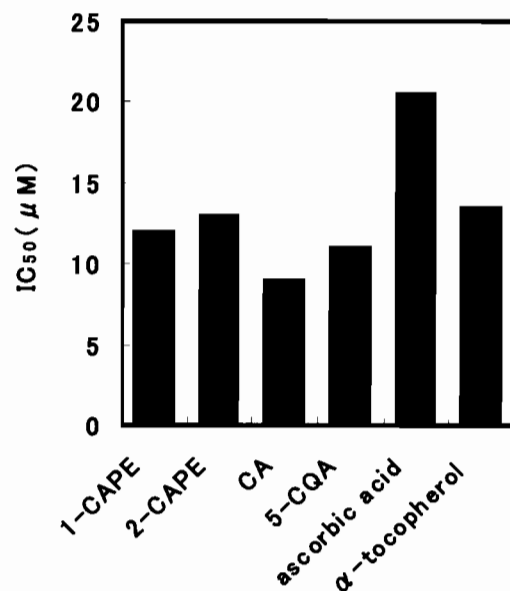


Fig. 52. DPPH radical scavenging

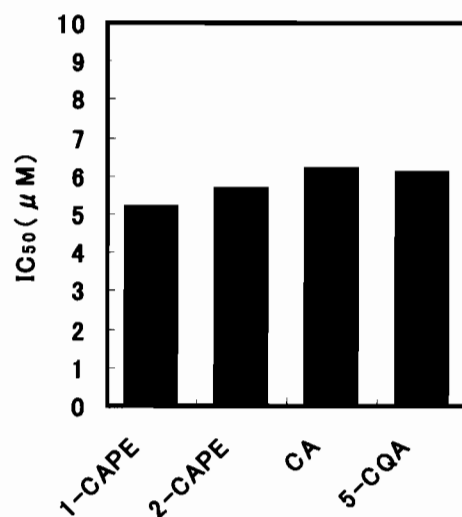
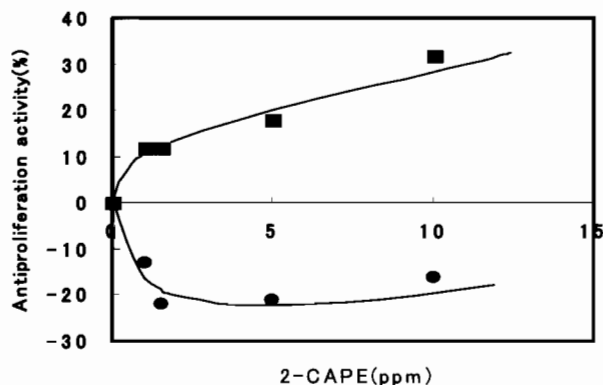


Fig. 53.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging activity of the samples.

が、CA やフェルラ酸エチルエステルにはその効果がなかったことを明らかにした。そして、CA-Et の  $\sigma$ -ジヒドロキシ構造とエステル構造が細胞の保護に必須の構造であると推測している。また、カフェー酸メチルエステル (CA-Me) にも  $H_2O_2$  による細胞毒性に対する保護効果が認められていたが、CA は細胞質膜を通過できないので、 $H_2O_2$  から細胞を保護する効果は認められなかったと述べている。さらに Nakayama ら<sup>109)</sup>は、CAPE は細胞質膜を通過して、細胞内で発生する  $H_2O_2$  が引き起こす障害を防御できると報告している。

本研究で検討した *In vitro* での CA と 2-CAPE のラジカル消去活性に顕著な差が認められなかったが、これら報告された結果を考慮すると、*in vivo* では細胞質膜を通過できる CAPE が、CA より高い抗酸化活性や細胞毒性に対する保護効果を示すと期待される。



**Fig. 54.** Inhibition activity of multiplication by 2-CAPE against cultured cells.

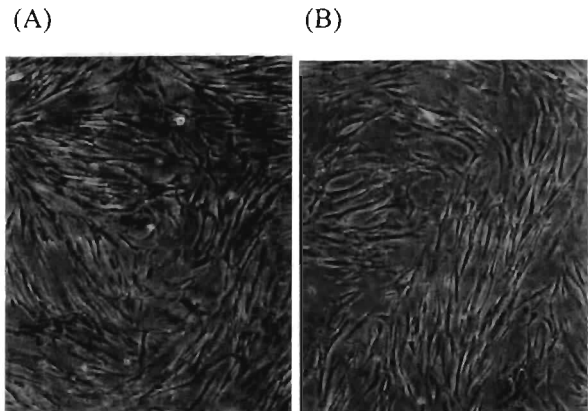
■, WI-38 VA13 sub 2 RA ; ●, WI-38



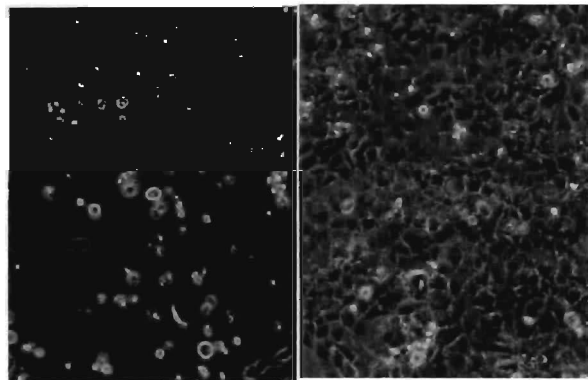
**b) 抗ガン活性**

ヒト由来肺繊維芽培養細胞の正常細胞 (WI-38 細胞) と、これにウイルスを感染させてガン化させた VA 細胞に対する 2-CAPE の増殖阻害活性を WST-1 法で測定した。その結果、2-CAPE は培養ガン細胞の増殖を阻害し、正常細胞の増殖を促進した (Fig. 54.)。WI-38 VA 細胞に対する 2-CAPE の IC<sub>50</sub> は 17 ppm であった。2-CAPE 10ppm 添加培地で培養した正常細胞は無添加培地で培養した細胞と形態に違いが認められなかったが (Fig. 55.)、2-CAPE 添加して培養した VA ガン細胞は、プレート底面から細胞が剥がれ落ち、形態も変化していた (Fig. 56.)。これらの結果から、2-CAPE は正常細胞に対する細胞毒性が低く、ガン細胞の増殖を選択的に阻止することを見出した。

1-CAPE と 2-CAPE は、WI-38VA 以外のガン細胞の増殖を 26~48% 阻止した (Table 19)。



**Fig. 55.** Effect of 2-CAPE on the multiplication of WI38 cell. (A), control; (B), (A)



**Fig. 56.** Effect of 2-CAPE on the multiplication of WI-38 VA13 sub 2RA cell. (A), control ; (B), 2-CAPE 10ppm

Table 19. Inhibition activities of the culture cells multiplication by CAPE.

1 × 10 <sup>6</sup> cells/ml	Antiproliferation activity (%)	
	1-CAPE*	2-CAPE*
U937	36	48
WI-38 VA	34	31
KB	31	26

\*concentration 10ppm

### c) 抗ウイルス活性

インフルエンザウイルスが MDCK に感染し増殖すると、MDCK 細胞は変性し壊死を引き起こした。これは細胞変性効果 (Cytopathic effect, CPE) と呼ばれている。MDCK 細胞を組織培養プレートで培養すると底面に単層を形成し、これを実体顕微鏡で観察すると視野一面に細胞が増殖し、所々に腎細胞特有の形態をした細胞を観察することができた (Fig. 57-a)。

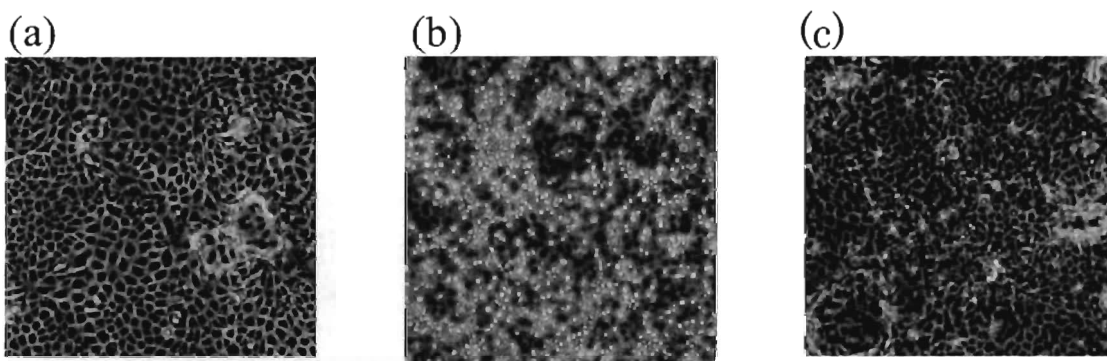


Fig. 57. Inhibition of influenza virus reproduction by 2-CAPE.

(a), Multiplied MDCK cells ; (b), Cytopathic effect on the MDCK cell lawn infected influenza virus ; (c), Effect of 2-CAPE on the appearance of cytopathic effect on the MDCK cell lawn infected influenza virus.

MDCK 細胞にウイルスを感染させて 60 分間保持してから洗浄後、新たに維持培養液を加え 37°C で 48 時間培養すると、ウイルスが増殖し、MDCK 細胞の一部が丸く白い細胞に変性 (CPE) していた (Fig. 57-b)。しかし、2-CAPE を 10 ppm 添加した維持培地中で感染細胞を培養すると、CPE の出現が大きく減少した (Fig. 57-c)。感染細胞内のウイルス数をプラーク法で定量したところ、CAPE 無添加で処理したウイルス感染細胞からは多数のプラークが形成された (Fig. 57-b, 58-b) のに対して、CAPE 処理したウイルス感染細胞からは少なかった (Fig. 57-a, 58-a)。

1-CAPE は 2-CAPE よりも低濃度でインフルエンザウイルスの増殖を 90 %以上阻止し、また A 型だけでなく B 型ウイルスの増殖も阻止した (Fig.59、Table 20)。

CAPE が A 型と B 型いずれの型の増殖も阻止したことから、2-CAPE のウイルス増殖阻止機構を検討した。

まず 2-CAPE がインターフェロンを誘発している可能性を既存のインターフェロン誘発剤である poly(I:C) をポジティブコントロールに用いて検討した。細胞にウ

イルスを感染させる前に poly(I:C) または 2-CAPE を作用させた。

その後、ウイルスを吸着させてプラーク法でインフルエンザウイルス増殖

阻止活性を調べたところ、poly(I:C)はインフルエンザウイルスの増殖を 100 % 阻止していたのに対して、2-CAPE では増殖阻止率が 51.4 %に減少した。この

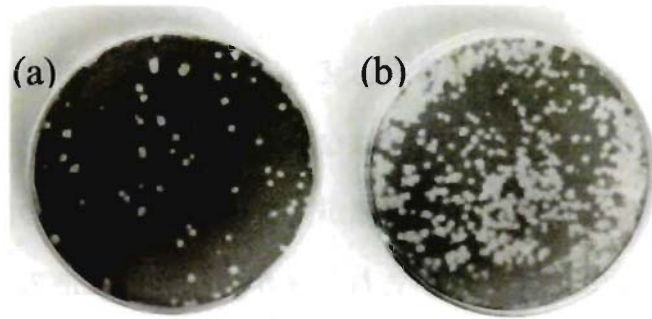


Fig. 58. Effect of 2-CAPE on the replication of influenza virus type A.

a), Plaques formed from virus infected cells treated by 2-CAPE.; b), Plaques formed from virus infected cells.

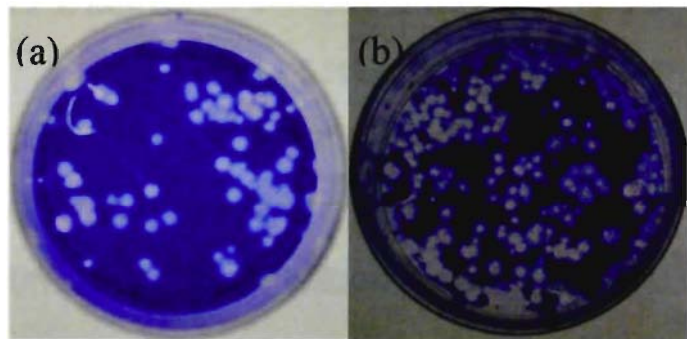


Fig. 59. Cytopathic effects of virus on the MDCK cells.

a), effect of 1-CAPE on the replication of virus B type; b), plaques from MDCK cells infected by virus type B.

Table 20. Inhibition rates of replication of influenza

Sample	(ppm)	Influenza virus type	
		A/USSR/92/77	B/Kanagawa/3/76
1-CAPE	2.5	94.9	92.0
2-CAPE	10	98.5	N.T.

N.T.: Not tested

結果は、2-CAPE による抗インフルエンザウイルス活性が、インターフェロンの誘発によるものではないことを示している。ウイルス感染前に 2-CAPE で処理してもウイルス増殖が 51.4% 阻止されたのは、2-CAPE の一部が細胞内に取り込まれていて、これが後から細胞内に進入してきたウイルスの増殖を阻止したためであると考えた。

次に 2-CAPE の感染阻害活性を調べた。試験管内で 2-CAPE とインフルエンザウイルスをインキュベートした後、超遠心分離してウイルスを洗浄、回収し、これを細胞に感染させたところ、ウイルスの増殖がまったく阻止されなかったことから、2-CAPE はウイルスの感染阻害で抗インフルエンザ活性を示しているのではないと考えられる。

Nakayama<sup>110)</sup>らは茶ポリフェノール類が顕著なインフルエンザウイルス感染予防効果を持つと報告している。つまり、茶ポリフェノールは感染前にインフルエンザウイルスの膜表面のスパイクに作用して凝集させることにより感染力を消失させていることを明らかにしている。

しかし、2-CAPE は感染阻害やインターフェロン誘発によってウイルスの増殖を阻害しているのではなく、感染後細胞内でウイルスが増殖する過程おそらくウイルス遺伝子 (RNA) を複製する酵素系の阻害、あるいは宿主の DNA にウイルス DNA を組み込む酵素 (インテグラーゼ) を阻害していると推察した。今後、*in vivo* での実験で効果ある結果が得られれば、インフルエンザウイルス感染症の予防や治療薬剤として期待することができる。

### 3-3-2. リパーゼを用いた CQA と vinyl cinnamate からジフェニルプロピルキナ酸類への酵素変換と生理活性

#### 3-3-2-1. 酵素のスクリーニング

市販リパーゼ 14 種類の中から 5 種類の酵素反応液から新たな生成物が検出された。なかでも DMF 溶液中で Lipase AL Meito を反応させると r.t. 15.7min に新たなピークが出現し、基質である CQA が顕著に減少していた。また、高压加熱処理した酵素を同条件で反応させても、新たなピークが検出されなかったことから、r.t. 15.7 min のピークは酵素反応生成物であることを確認した (Fig. 60.)。

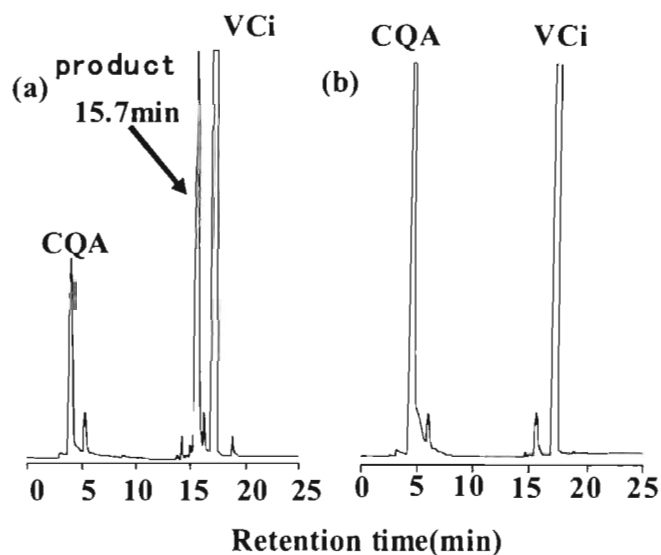
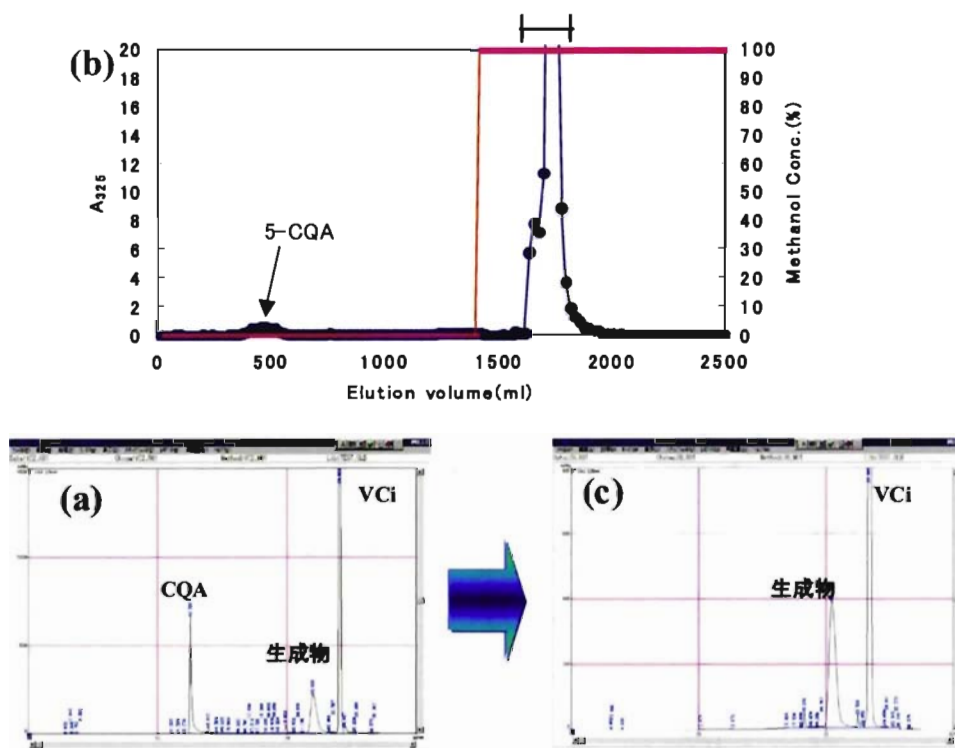


Fig. 60. HPLC analysis of reaction liquid from CQA and VCI. (a), with Lipase AL ; (b), with heat denaturated Lipase AL (control).

### 3-3-2-2. 反応生成物の精製と FAB-MS 分析

DMF 溶液 21ml に Lipase AL 35,000U と 10mM CQA を加え予備加温後、2.46M VCI 14 ml 加えて 45°C で 24 時間反応させた。得られた反応液を HPLC 分析して目的の生成物ピークを確認した (Fig. 61-a)。

Sephadex LH-20 カラムクロマトで CQA ピークと分離した後 (Fig. 61-b,c)、分取用 HPLC で目的ピークを分取した。減圧濃縮後、水から再結晶して白色の精製標品 3.5 mg を得た (収率 2.8 %, Fig. 62.)。



**Fig. 61.** Separation of the products from CQA by Sephadex LH-20 column chromatography. (a) and (c), HPLC analyses of reaction liquid and the purified fraction with sephadex LH-20 column chromatography, respectively; (b), Sephadex LH-20 column chromatography of the reaction liquid.

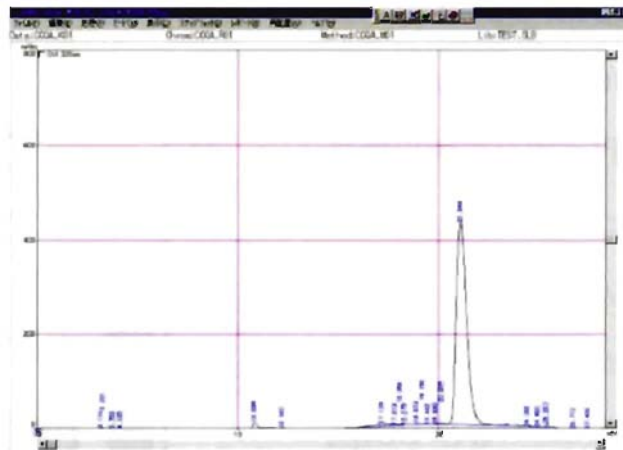


Fig.62. HPLC analysis of the recrystallized sample.

精製標品を FAB-MS 分析すると、ネガティブ イオンモードで  $m/z$  483 に脱プロトン化分子が認められたことから、生成物の分子量を 484 と決定した。また、MS/MS 分析で得られたフラグメントイオンも CCQA に帰属できたことから、Lipase AL Meito が CQA と VCI から変換した物質は CCQA と同定した。

**3-3-2-3. Lipase AL を用いた CQA と VCI から CCQA への最適変換条件の検討**  
 溶媒の種類、CQA と VCI 濃度、酵素量、反応温度と時間を検討して、変換最適条件を次のように決定した。2.46M VCI と 10mM CQA-DMF 溶液 1.0ml に Lipase AL 1000U を添加し、40℃で 24 時間反応させると、1.92mM CCQA が生成しモル変換率は 19.2%に達した。

### 3-3-2-4. CCQA の抗酸化活性

CCQA は  $15.5 \mu\text{M}$ 、3,5-diCQA は  $10.3 \mu\text{M}$  で DPPH ラジカルの吸光度を半減させた。3,5-diCQA は CQA や CA とほぼ同じ値、代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸の  $20.3 \mu\text{M}$ 、 $\alpha$ -トコフェロールの  $13.2 \mu\text{M}$  に比べると、強いラジカル消去活性を示した。これらの値に比べると CCQA の  $15.5 \mu\text{M}$  はやや低い値であった (Fig. 63.)。これは CQA に結合したカフェー酸と桂皮酸の違いによると推察される。カフェー酸は高いラジカル消去活性を示したが、桂皮酸とキナ酸は  $1000 \mu\text{M}$  でも活性が認められなかった。

また CCQA のスーパーオキシドアニオン消去活性 ( $\text{IC}_{50}$ ) は  $6.7 \mu\text{M}$  で 3,5-diCQA ( $5.8 \mu\text{M}$ ) や CQA よりも低かった (Fig. 64.)。また、 $1000 \mu\text{M}$  桂皮酸とキナ酸でもスーパーオキシドアニオン消去活性は検出できなかった。

抗酸化には2つの機構が存在する。1つは発生したフリーラジカルに水素を供与してラジカルを捕捉する機構で、2つ目はラジカル発生の触媒となる金属イオンを

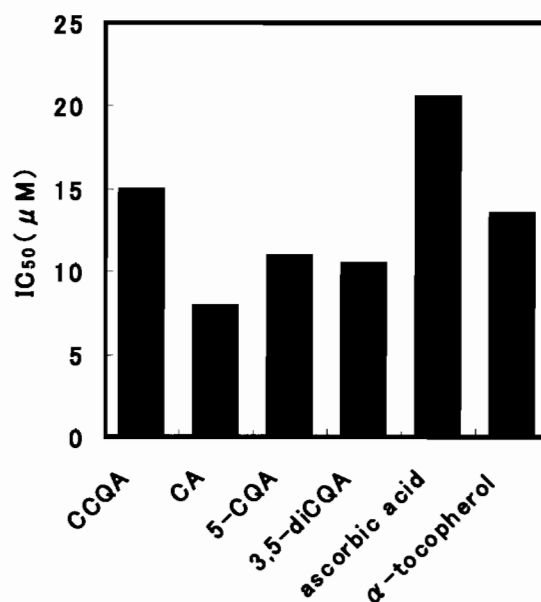


Fig. 63. DPPH radical scavenging activities of the samples.

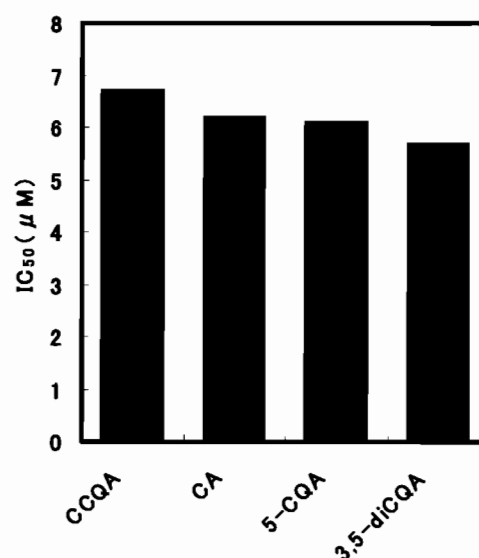


Fig. 64.  $\text{O}_2$  scavenging activities of the samples.



キレート化する機構である。

CCQAはその構造内にカフェー酸ではなく桂皮酸をもつことから、diCQAと比べて水素供与活性が低いと考えられる。また、カフェー酸のようなジヒドロキシ構造は金属のキレート化に有効であるが、桂皮酸をもつCCQAは金属キレート化活性が低いと考えられる。これらの結果から、フェニルプロパノイド類が抗酸化活性を発現するためには、フェニル基に結合した未置換のヒドロキシル基が重要な役割を果たしていると考えられる。今回選抜したLipase ALはVCiとCQAからCCQAに酵素変換することができたが、化学合成したVinyl caffeateとCQAからdiCQAへは変換できなかった。これはリパーゼの基質結合部位の構造に原因があると考えられる。Lipase ALのシナモイル基結合サイトに結合するには、極性の高い2個のヒドロキシル基をもつカフェオイル基は大きすぎるし、極性も高いので結合することができないと推察される。しかし、カフェー酸を結合できる基質結合サイトをもつリパーゼを探索できれば、CAとCQAからdiCQAへの変換も可能であると考えている。

また、ジオキシゲナーゼを用いてフラボノイドに水酸基を導入する方法が報告されている<sup>11)</sup>ので、本反応で得られたCCQAのシナモイル基に酵素反応で水酸基を付加することができれば、diCQAへ変換することができる。

### 3-4. まとめ

*A. japonicus* 由来のCQA esteraseはCQAなどの桂皮酸エステル類を加水分解することが明らかにされていた。本研究では本酵素が加水分解反応以外に、CQAとPAからCAPEへのエステル置換反応、CQAとPEBrから2-CAPEへの臭素置換反応、CAと2-PAあるいはPEBrから2-CAPEへの縮合反応も触媒できる多機能酵素であることを明らかにした。

CAPEへ変換する最適条件を確立したところ、エステル置換反応で最も高い変

換率 (50%) が得られた。また1-PAのR体とS体の違いを認識して、(S)-1-CAPEを3倍多く生成したことから、本酵素は光学特異的にエステル置換反応を触媒できることを見いだした。

本酵素の基質特異性、酵素反応機構を解析した結果、本酵素には2つの基質結合サイト (カルボン酸結合部位とアルコールあるいは臭素化合物結合部位) が存在し、まずそれぞれの基質が結合部位へ結合して酵素基質複合体を形成する。次いで触媒部位でカルボニル基を活性化させて、隣接するアルコール (あるいは臭素化合物) と新たなエステル結合を形成する (エステル置換反応, 臭素置換反応, 縮合反応) オーダードバイバイメカニズムで反応が進行することを明らかにした。アルコール (あるいは臭素化合物が存在しない場合は、水と結合して加水分解物が生成する (加水分解反応) )。

得られたCAPEにはインフルエンザウイルス増殖阻止活性が確かめられた (8.8  $\mu$  Mで92~95%阻止)。CAPEはA型, B型の種類を問わずウイルスの増殖を阻止し、MDCK細胞にインターフェロンを誘発させる効果も認められず、感染阻害活性も認められなかったことから、CAPEは細胞内に侵入したウイルスRNAの増殖を阻害していると推察している。

CQAとCAからdiCQAへ酵素変換することを最終目的に、まずVinyl cinnamate (VCi) とCQAからCinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) へ変換できる酵素をスクリーニングした。その結果、リパーゼALがモル変換率19.2%で変換することを見いだした。そこで、リパーゼALを用いて化学合成したVinyl caffeateとCQAからdiCQAへの変換を検討したが、変換しなかった。

## 総合考察

近年、製造現場から排出される様々な廃棄物の有効利用や再利用など循環型社会を確立するために、未利用資源を有効活用する手段を確立することが求められてきている。

筆者は、コーヒー飲料製造工場から排出されるコーヒー抽出残渣や市場にでない未成熟生豆に、マンナンやアラビノガラクトサンなどのヘミセルロースが 40～50% (乾燥重量)、クロロゲン酸類が 4～10%含まれており、有望な資源であることに着目した。コーヒーに含まれるアラビノガラクトサンは、 $\beta$ -(1→3)-結合からなる主鎖と  $\beta$ -(1→6)-結合からなる側鎖で構成された Type II アラビノガラクトサンであったことから、酵素分解で得られるオリゴ糖はプロバイオティクスや糖鎖工学における有用素材として利用できることを期待した。また、クロロゲン酸類は多様な生理活性を示すことを明らかにした。そして、これらの物質を強化したコーヒー抽出液を製造する道筋をつけることに成功した。

まず第一章では、生豆由来のアラビノガラクトサンを分解できる微生物を探索し、*Aspergillus fumigatus* No.232 培養液から  $\beta$ -(1→3)-D-ガラクトナーゼ (EC 3.2.1.90) を精製した。精製酵素の分子量は 86kDa、最適 pH 4.0、温度は 45℃であった。また pH 4.0 付近および 45℃以下で安定であったが、 $Hg^{2+}$ で完全に失活した。生豆由来のアラビノガラクトサンに対する Michaelis 定数 ( $K_m$ ) は 0.89mg/ml で、最大反応速度 ( $V_{max}$ ) は 3.16units/mg で、カラマツ由来のアラビノガラクトサンより高い基質親和性を示した。本酵素は Type II アラビノガラクトサンや  $\beta$ -(1→3)-D-グルカンのような  $\beta$ -(1→3)結合を有する多糖類を分解し、アラビノース、ガラクトース、 $\beta$ -(1→6)-D-ガラクトビオースを遊離した。生成したガラクトビオースはヒト腸内フローラ構成菌種によって資化され、酸

が生成されたことから、ヒト腸内フローラの改善に貢献できると期待している。

糖質加水分解酵素の転移反応を利用してオリゴ糖の生産が試みられている。この方法を用いて、低カロリー甘味剤や抗う蝕性、ビフィズス菌の選択的増殖などの機能性オリゴ糖が開発され、食品素材として供給され始めている。本酵素も加水分解反応以外に糖転移反応も触媒することができるか、さらに検討する必要がある。

また、スタキオースなどの $\alpha$ -(1→6)-D-ガラクトオリゴ糖を、経口投与あるいは塗布してアトピー性皮膚炎を治療しようとする研究も始められている<sup>112)</sup>。本研究で得られた $\beta$ -(1→6)-D-ガラクトビオースのさらなる生理機能の解明が期待される。

第二章では、生豆に含まれるクロロゲン酸異性体含量と、単離した各異性体の生理機能を *in vitro* で明らかにした。クロロゲン酸は他の多くのポリフェノールと同じように小腸で吸収されるが、その吸収機構については未だ不明な部分も多い。

まずクロロゲン酸の吸収について、すでに発表されている情報をまとめた。Nardini ら<sup>113)</sup>の実験によると、コーヒー200ml を与えた健康な男性 10 人の血漿総カフェー酸濃度は 1 時間後にピークに達し、血漿からクロロゲン酸は検出されず、カフェー酸がグルクロン酸抱合体か硫酸塩の形で検出されたことが明らかにされている。Konishi ら<sup>114)</sup> は、Caco-2 培養細胞ではカフェー酸の吸収率がクロロゲン酸よりも大きかったと報告している。また、ラットに経口投与したクロロゲン酸は消化管で加水分解され、生成したカフェー酸が消化管から吸収されたこと<sup>115)</sup>、ヒトでは十二指腸、空腸、回腸の無細胞抽出物からシンナモイルエステラーゼ活性が検出され、ラットでは小腸粘膜から検出されたことが明らかにされている<sup>116)</sup>。さらに、ヒト糞便からシンナモイルエステラーゼを

生産する腸内細菌として、*E. coli*、*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属が分離された<sup>117)118)</sup>ことから、大腸のエステラーゼ活性は腸内細菌叢に由来すると考えられている。しかし、摂取したカフェー酸の 95%が、クロロゲン酸の 33%が生体内に吸収されたという報告もある<sup>119)</sup>。

フラボノイド化合物も吸収された後、その多くがグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、メチル化体あるいはこれらの複合体として存在することが明らかにされている。Baba ら<sup>120)</sup>は、フラボノイドのラジカル捕捉能を示す 3 つの構造 (① B 環のカテコール構造、② C 環 2、3 位の二重結合ならびに 4 位のオキシ基、③ C 環 3 位、A 環 5 位の水酸基) を明らかにして、生体内で変換された抱合体にこれらの構造が保持されていれば、生体内でも抗酸化活性を示すだろうと述べている。

クロロゲン酸異性体やカフェー酸類も、生体内では抱合体を形成して存在している可能性が高い。しかし、本研究で明らかにした種々の生理活性の発現に必要なカフェオイル基の C3、C4 位ジヒドロキシ構造と C7 位の 2 重結合が抱合体でも保持されていたら、生体内でも様々な生理機能を発揮することが期待できる。

これらの研究結果から、*in vivo* では摂取されたクロロゲン酸の大部分が消化管内でカフェー酸とキナ酸に加水分解されてから、体内に吸収されていると推察される。したがって、摂取されたクロロゲン酸異性体は消化管内では生理活性を示すと期待されるが、生体内で有効な活性を示すかどうかは *in vivo* でのさらなる研究が必要である。

第三章では、クロロゲン酸類を基質に用いてより生理活性の高い物質へ変換できる酵素を探索した。CQA esterase (EC 3.1.1.42) はクロロゲン酸 (CQA) をカフェー酸 (CA) とキナ酸 (QA) に加水分解する酵素で、すでに *A. niger* と

*A. japonicus* から単離、精製されている。一方、2-Caffeic acid phenethyl ester (2-CAPE) はプロポリスの活性成分として単離され、抗酸化、抗菌、抗炎症作用、腫瘍細胞増殖抑制効果があることが報告されている。

本研究ではまず、CQA esterase が CQA と 2-Phenethyl alcohol (2-PA) から 2-CAPE に変換できること、つまりエステル置換反応を新たに触媒できることを明らかにした。2-CAPE への最適変換条件では、CQA に対するモル変換率が 50%に達した。生成物を経時的に調べると、2-CAPE と CA が同時にしかもほぼ等量生成していた。この結果から本反応を次のように考えている。本反応は水相と 2-PA 相からなる二相系で行っており、酵素と CQA が溶解している水相では加水分解反応が、水相と 2-PA 相の界面ではエステル置換反応が同時に進行している。生成した 2-CAPE は水への溶解度が低いため 2-PA 相に蓄積して水相に存在する酵素と接する機会が減少して、生成物が酵素で再び加水分解されるのを防いでいる。このように水が存在する反応系で 50%という高変換率でエステル置換反応が進行する例は、知る限りまだない。そういった意味でも本酵素反応は極めて興味ある結果である。

また、CQA esterase が触媒するエステル置換反応は光学特異性を有しており、受容体であるアルコールの光学異性体を認識して、(S)体に高い特異性を示した。これは CQA esterase のアルコール結合部位が、(R)-1-PA よりも(S)-1-PA が結合するのに適した形をした空間を形成しているためと考えている。

本酵素は CQA と PEBr から 2-CAPE へ変換できたことから、臭素置換反応も触媒できることを明らかにした。さらに CA と 2-PA、あるいは CA と PEBr からも 2-CAPE へ変換できたことから、縮合反応も触媒することを明らかにした。つまり CQA esterase は、すでに報告されている加水分解反応以外に、エステル置換反応、臭素置換反応、縮合反応を触媒できる多機能酵素であることを明らかにした。

次に、さまざまな桂皮酸類を基質に用いて反応速度を求め、CQA esterase の活性中心の立体構造と反応機構を考察した。本酵素には2つの基質結合部位（カルボン酸結合部位とアルコールあるいは臭素化合物結合部位）が存在し、まず2つの結合部位にそれぞれの基質が結合して酵素基質複合体を形成してから、触媒反応がおこるオーダードバイバイメカニズムで酵素反応が進行していることを明らかにした。触媒部位ではカルボニル基を活性化させてから、隣接して存在するアルコール（あるいは臭素化合物）と新たにエステル結合を形成した（エステル置換反応，臭素置換反応，縮合反応）。アルコール（あるいは臭素化合物）が存在しない場合は、水と結合して加水分解物が生成した（加水分解反応）。

得られた 1-CAPE と 2-CAPE には、紫外線吸収や抗酸化、抗菌、抗ガン活性の他にインフルエンザウイルス増殖阻止活性が確認された。とくに 1-CAPE は 2.5ppm (8.8  $\mu$ M) で A 型と B 型ウイルスの増殖を 92%と 95%阻害し、有望な抗インフルエンザ剤として期待できる。また、これらの物質はウイルス感染細胞内でのウイルス複製を阻害していることを明らかにした。

リパーゼ AL は Vinyl cinnamate (VCi) とクロロゲン酸から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) に変換できることを見いだした。そこで、本酵素を用いて Vinyl caffeate と CQA から diCQA へ変換させることを試みたが、変換できなかった。これは Vinyl caffeate の C3、C4 位ジヒドロキシ構造がリパーゼのカルボン酸結合サイトへ VCi が結合するのを妨げているためと考えている。カフェオイル基を基質として認識できるリパーゼを探索できれば、Vinyl caffeate と CQA から diCQA へ変換することが可能になると期待している。

以上に述べたように、本研究ではコーヒー豆に含まれる未利用資源アラビノガラクトタンとクロロゲン酸類に注目し、その機能性を解明して、コーヒー抽出残渣や等級外コーヒー豆を資源として有効活用する道筋を切り開いた。また、

アラビノガラクトランを酵素分解したオリゴ糖や等級外生豆から抽出したクロロゲン酸類を強化した缶コーヒーの製造に応用できることも明らかにした。これらの結果は、通常飲用されているコーヒー抽出液が多様な健康増進機能を有することを証明する手掛かりを提供したといえる。さらに、クロロゲン酸類を原材料として、多様な機能性をもつ物質へ酵素変換できることも明らかにした。

本研究は、未利用なコーヒー生豆や抽出残渣を機能性食品素材として利用していく道を開くものである。



## **Studies on the Utilization of Coffee Bean as Food Materials with Physiological Properties**

### **Summary**

### **Introduction**

Coffee has been drunk all over the world for centuries as a luxury item. In Japan, today, about 400 thousand tons of raw coffee beans are imported, and 2.6 million kL of coffee-flavored beverages are produced annually. In these circumstances, the development of methods for effective use of unexploited resources derived from raw coffee beans is demanded to establish a recycling-based society that effectively uses or reuses various wastes discharged from manufacturing sites.

The extraction residue of coffee discharged from factories manufacturing coffee-flavored beverages contains hemicellulose such as mannans and arabinogalactans at 40-50% (dry weight) and is a promising resource. We noted that arabinogalactans contained in coffee beans are type II arabinogalactans consisting of a main chain with a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-bond and side chains with  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-bonds and speculated that oligosaccharides obtained by enzyme-mediated degradation of this residue can be a useful resource for probiotics and glycoscience. In this study, we first searched for microorganisms that degrade arabinogalactans extracted from coffee beans, purified galactanase produced by *Aspergillus fumigatus* No. 232, and clarified its enzymochemical properties. Next, we treated arabinogalactans with this enzyme, and evaluated the functions of the products.

Substandard beans such as those that have been broken before roasting, and immature beans that are not processed into final products, are not effectively used. We, therefore,

evaluated methods to utilize such substandard beans as materials for functional foods and directed attention to chlorogenic acids that they contained. We first established a method to isolate chlorogenic acid isomers from raw coffee beans and clarified that chlorogenic acids are accumulated in coffee beans from an early stage of maturation and that the chlorogenic acid content varies among breeds. In addition, we compared physiologic activities of chlorogenic acid isomers *in vitro*.

We further established methods to convert chlorogenic acids into new materials and examined their physiologic functions.

#### **I. Identification of arabinogalactan from coffee waste and probiotal evaluation of its hydrolysate**

The enzyme produced by *Aspergillus fumigatus* No. 232 in the supernatant of its culture was purified by ion exchange chromatography (SP-Sephadex G-50) and gel-filtration chromatography (Sephadex G-100) until it became electrophoretically homogeneous. The specific activity of this enzyme was 3.57 units/mg protein, its molecular weight was 86 kDa, and the optimum pH was 4.6. The enzyme showed maximum activity at 45°C and was stable at pH4.0 and 50°C or below. Its activity was completely inhibited by Hg<sup>2+</sup> ion. The Michaelis constant (*K<sub>m</sub>*) using arabinogalactans derived from coffee beans as the substrate was 0.89 mg/ml, and the maximum reaction speed (*V<sub>max</sub>*) was 3.16 μmol/min/mg protein. Since *K<sub>m</sub>* was 4.74 mg/ml, and *V<sub>max</sub>* was 6.54 μ mol/min/mg protein when arabinogalactans derived from larch was used as the substrate, the enzyme was found to have high specificity to coffee arabinogalactans. Since this enzyme generated arabinose, galactose, and β-(1→6)-D-galactobiose when it was incubated with arabinogalactans, it was identified as an enzyme that belongs to arabinogalactan 3-β-D-galactanohydrolase (EC 3.2.1.90),

which hydrolyzes  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) bonds by an exo type reaction.

$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactobiose was obtained by degrading arabinogalactans with this enzyme, and its utilization by intestinal bacteria was examined. Since the material promoted the growth of the *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* and reduced the pH of the culture medium, this suggested that  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactobiose promotes the growth of probiotic intestinal bacteria and improves the human intestinal flora.

## II. Purification and functions of chlorogenic acids contained in coffee beans

One hundred grams of raw coffee beans of the Robusta breed (Indonesia WIB) were extracted with ethanol, and 7 chlorogenic acids (3-caffeoylquinic acid, 690 mg; 4-caffeoylquinic acid, 1,530 mg; 5-caffeoylquinic acid, 4,380 mg; 5-feruloylquinic acid, 1,400 mg; 3,4-dicaffeoylquinic acid, 310 mg; 3,5-dicaffeoylquinic acid, 520 mg; and 4,5-dicaffeoylquinic acid, 340 mg) were isolated by the formation of chlorogenic acid-K-caffeine complexes, gel-filtration using Sephadex LH-20, and preparative HPLC. Of these chlorogenic acids, the contents of caffeoylquinic acids (CQAs) tended to increase with maturation from immature beans (bluish green) to overmature beans (black), but those of dicaffeoylquinic acids (diCQAs) showed no change with maturation. When the contents of chlorogenic acids were evaluated according to the breed and the area of production, they were highest at 10.5% (w/v) in the Robusta breed produced in Indonesia. Physiologic activities of the chlorogenic acids obtained were measured *in vitro*. DiCQAs showed higher DPPH radical scavenger activities than  $\alpha$ -tocopherol or ascorbic acid. The superoxide anion radical scavenger activities were higher in diCQAs than in caffeic acid and in CQAs than in 5-FQA, and the activities of diCQAs were 2 times higher than those of CQAs and 4 times higher than that of 5-FQA. DiCQAs also showed the tyrosinase inhibitor activities 2.0-2.2 times higher compared

with arbutin, ascorbic acid, and chlorogenic acids, and they showed the antimutagenic activities 2 times higher compared with CQAs against aromatic amines and heterocyclic amines such as Trp-P-1 and Trp-P-2. These results suggest that the caffeoyl groups contained in chlorogenic acids, their number, and the double bond at C7 are closely related to their physiologic activities. However, further evaluation is needed to clarify their detailed action mechanisms.

Chlorogenic acids inhibited the proliferation of U937 cells (derived from human histiocytic lymphoma), KB cells (derived from human nasopharyngeal cancer), WI-3813 sub 2 RA cells (derived from pulmonary fibroblasts), and MCF-7 cells (derived from human breast cancer), and apoptosis was observed in U937 cells. Particularly, as it markedly inhibited the proliferation of KB cells ( $IC_{50}$ : 0.1-0.18 mM), coffee-flavored beverages supplemented with chlorogenic acids are expected to have a preventive effect against pharyngeal cancer.

### **III. Enzyme-mediated synthesis of cinnamic acid derivatives using chlorogenic acids and their physiologic activities**

Chlorogenic acid hydrolase (EC3.1.1.42, CQA esterase) is an enzyme that hydrolyzes chlorogenic acids into caffeic acids and quinic acids and has already been isolated from culture media of *Aspergillus niger* and *A. japonicus*. 2-Caffeic acid phenylethyl ester (2-CAPE) was isolated as an active component of propolis and has been shown to have diverse physiologic activities including antioxidant, antibiotic, anti-inflammatory, and tumor-cell-growth-inhibiting activities. Although CQA esterase has only been reported to have hydrolase activities, it has been shown to convert chlorogenic acids and 2-phenethyl alcohol (2-PA) into 2-CAPE. In addition, since it generated 2-CAPE from caffeic acid and 2-PA and also when 2-PA was replaced by 2-phenethyl bromide, the

enzyme was found to be a multi-functional enzyme that catalyzes ester substitution, condensation, and bromine substitution as well as hydrolysis. Also, since (S)-1-CAPE (e.e. 50%) was generated when 1-PA instead of 2-PA was treated with CQA esterase, this enzyme was shown to have optical specificity. The optimum condition for the production of 2-CAPE using this enzyme was an ester substitution reaction using a chlorogenic acid and 2-PA as the substrates, and the molar conversion rate in this reaction was 50%. The 3-dimensional structure of esterase was evaluated with particular attention to the enzyme activities by determining the reaction rate using various cinnamic acids as substrates. As a compound with a 3-phenyl propionic acid skeleton, in which a hydroxyl group or amino group is bound at the *p* position, enters the activity center of CQA esterase, as the amino residues of the enzyme form hydrogen bonds with the hydroxyl group or amino group at the *p* position, and as phenyl groups and the carbon chains between phenyl groups and carboxyl groups are fixed to the enzyme protein by hydrophobic bonds, enzyme-substrate complexes are formed. The enzyme was considered not only to activate the carboxyl group in the 3-phenyl propionic acid skeleton but also to generate new ester compounds by forming ester bonds with another substrate, which was an alcohol or bromide. The 1-CAPE and 2-CAPE obtained inhibited the proliferation of influenza virus as well as absorbed ultraviolet rays and showed antioxidant, antibiotic, and anticancer activities. 1-CAPE, in particular, is considered to be promising as an anti-influenza agent, because it inhibited the proliferation of type A and type B viruses by 92% and 95%, respectively, at 2.5 ppm (8.8  $\mu$  M). These materials were also shown to inhibit the virus replication in virus-infected cells.

DiCQAs showed higher physiologic activities than chlorogenic acids, but their contents in raw coffee beans were small. Therefore, we attempted to convert

chlorogenic acids and vinyl caffeate into diCQAs using an enzyme. First, an enzyme that can convert commercial vinyl cinnamate (VCi) and chlorogenic acid into cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) was investigated, and optimal conditions of the conversion were evaluated. Although lipase catalyzes hydrolysis in aqueous solutions, it has been reported also to catalyze ester synthesis in organic solvents. Therefore, we screened 21 commercial lipases and found that only Lipase AL (Meito) can convert VCi and chlorogenic acid into CCQA. When 1,000 units of lipase was added to a solution of 2.5 M VCi and 10 mM CQA-DMF and the solution was incubated at 32.5°C for 24 hours, VCi and CQA-DMF could be converted to CCQA at a molar conversion rate of 19.2% relative to CQA. Since the antioxidant activity of the CCQA obtained was weaker than that of diCQA isolated from raw coffee beans, the dihydroxy structure was confirmed to be important for this activity. The lipase obtained by screening in this study did not catalyze the diCQA synthesis reaction, but it may be possible to synthesize diCQAs if lipases are screened using the method by which CCQA was synthesized. Therefore, the establishment of a new method for mass synthesis of diCQAs, which have high physiologic activities but are difficult to synthesize, is considered to be possible.

As described above, this study not only clarified the functions of arabinogalactans and chlorogenic acids, which are unexploited resources contained in coffee beans, and showed that the residue of coffee extraction and substandard coffee beans can be used effectively as resources, but also provided clues to the diverse health-promoting functions of coffee extracts, which are drunk widely. Furthermore, chlorogenic acids were shown to be converted enzymatically into materials with diverse functions. This study is considered to open the way to utilization of coffee beans as a material for functional foods.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました近畿大学農学部 教授、藤田藤樹夫先生、同助教授、岸本憲明先生、同助手、吉岡佐知子先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文を取りまとめるにあたり、有益なご助言を頂き校閲の労をお取りいただきました近畿大学農学部教授、駒井功一郎先生、同教授、田中裕美先生に厚く御礼申し上げます。

また、実験サンプルを調達してくださいました鹿児島県大島郡 林茂氏、機器分析に関してご協力いただきました近畿大学共同利用センター 森田全律博士、峯松敏江博士、培養細胞を使用した実験につきまして終始懇切にご指導頂きました島根県保健環境科学研究所 持田恭博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり御協力いただきました垣野由佳里氏、上原涼子氏、大森恵子氏、楯裕美子氏ほか、近畿大学農学部農芸化学科 応用微生物研究室の卒業生諸氏に心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Iwai, K.; Kishimoto, N.; Yoshioka, S.; Fujita, T. Isolation and characterization of a  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  3)-D-galactanase from the strain of *Aspergillus fumigatus* No.232. *Jpn. J. Food Microbiol.*,**21**,52-61 (2004)
- 2) 吉田隆、波多野力：ポリフェノールとは？ *Food Style* 21, 4(1) 35-38 (2000).
- 3) Kweon, M-H.; Hwang, H-J.; Sung, H-C. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*).*J Agric Food Chem*,**49**, 4646-4655 (2001)
- 4) Ono, M.; Masuoka, C.; Tanaka, T.; Ito, Y.; Nohara, T. Antioxidative and antihyaluronidase activities of some constituents from the aerial part of *Daucus carota*. *Food Sci Technol Res.* **7**, 307-310 (2001)
- 5) Chuda, Y.; Suzuki, M.; Nagata, T.; Tsushida, T. Contents and cooking loss of three quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.).*J Agric Food Chem.* **46**,1437-1439 (1998)
- 6) Merfort, I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry.* **31**,2111-2113 (1992)
- 7) Lin, L-C.; Kuo, Y-C.; Chou, C-J. Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*. *Nat Prod.***62**, 405-408 (1999)
- 8) Chuda, Y.; Ono, H.; Ohnishi-Kameyama, M.; Nagata, T.; Tsushida, T. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *J Agric Food Chem.***44**, 2037-2039 (1996)



- 9) Clifford, M N.; Ramirez-Martinez, J R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chem.* **35**,13-21 (1990)
- 10) Sato, M.; Hiraoka, A.; Watanabe, M. Inhibition of  $\gamma$ -irradiation-induced oxidation of chlorogenate by 1,3-dicaffeoylquinic acid in *Xanthium occidentale*. *Phytochemistry.* **33**, 1357-1360 (1993)
- 11) Ma, Y-T.; Huang, M-C.; Hsu, F-L.; Chang, H-F. Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Phytochemistry.* **48**, 1083-1085 (1998)
- 12) Kodama, M.; Wada, H.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Kimura, Y. 3,5-di-o-caffeoylquinic acid, an infection-inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alternaria alternata*. *Phytochemistry.***47**, 371-373 (1998)
- 13) Maruya ,Y.; Kawabata, J.; Niki, R Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock(*Arctium lappa* L.). *J Agric Food Chem.***43**, 2592-2595 (1995)
- 14) Ono, M.; Masuoka, C.; Odake, Y.; Ikegashira, S.; Ito, Y. Antioxidative constituents from *Tessaria integrifolia*. *Food Sci Technol Res.***6**, 106-114(2000)
- 15) Nakatani, N.; Kikuzaki, H.; Suino, K.; Kayano, S.; Katagiri, K.; Mitani, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem.***48**, 5512-5516 (2000)
- 16) Takenaka, M.; Ono, H.; Yoshida, M.; Nagata, T.; Yan, X.; Nakanishi, T. Caffeic acid derivatives in the roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J Agric Food Chem.***51**, 793-796 (2003)

- 17) Corthout, J.; Pieters, L.; Claeys, M.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A.  
Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*. **31**,  
1979-1981 (1992)
- 18) Pontes, P V.; De Maria, C A B.; Moreira, R F A.; Trugo, L C. The content of  
chlorogenic acids in tropical fruits. *J Sci Food Agric*. **10**, 1177-1181 (2002)
- 19) Iwai, K; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T. In vitro  
antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven  
hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J Agric Food Chem.*,  
**52**, 4893-4898 (2004)
- 20) Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M, Efros, L, Caldwell,  
M., Estevez, V., Nakanishi, K.: Preferential cytotoxicity on tumor cells by  
caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* **44**, 230-232  
(1988)
- 21) Na, H.K.; Wilson, M.R.; Kang, K.S.; Chang, C.C.; Grunberger, D.; Trosko,  
J.E. Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic  
acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell  
line. *Cancer Lett.* **157**, 31-38 (2000).
- 22) Chinthalpally, V.; Rao, D D.; Bipin, K.; Shantu, A.; Bandaru, S. R. Effect  
of caffeic acid ester on carcinogen-induced mutagenicity and human colon  
adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Interactions*. **84**. 277-290(1992)
- 23) 酒井哲夫編：ミツバチのはなし.p167-173 技報堂出版(1992)
- 24) Chen, Y-J.; Shiao, M-S.; Hsu, M-L.; Tasi, T-H.; Wang, S-Y. Effect of Caffeic  
Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from Propolis, on Inducing Apoptosis  
in Human Leukemic HL-60 Cells. *J. Agric. Food Chem.***49**,  
5615-5619(2001)

- 25) Li, Y. Single bath producing method for caffeic acid ester derivatives.  
*Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2002), 10 pp.
- 26) Lee, Y-J. A one-pot esterification process for the preparation of caffeic acid ester derivatives from caffeic acid and alcohols in the presence of a halogenating agent. *Eur. Pat. Appl.* (2002), 8 pp.
- 27) Li, Y-C. One-pot preparation of caffeic acid esters. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2001), 7 pp
- 28) 中野博文：博士論文 *Penicillium citrinum* のガラクタナーゼに関する研究 (1989)
- 29) Wei, B.; Yamauchi, R.; Kato, K. Chemical structure of arabinogalactan isolated from cotyledon of azuki bean. *Oyo Toshitsu Kagaku.* 41,157-163(1994)
- 30) Saulnier, L.; Brillouet, J. M. An arabinogalactan-protein from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Res.* 188, 137-144(1989)
- 31) Sen, A.K.; Das, A. K., Banerji, N. A water soluble arabinogalactan from the fruit pulp of *Azadirachta indica*. *Indian Journal of Chemistry.* 32B, 862-866(1993)
- 32) Yamada, H.; Kiyohara, H.; Cyong, J. C.; Otsuka, Y. Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGAWA. *Carbohydrate Res.* 159,275-291(1987)
- 33) Capek, P.; Kardosova, A. Polysaccharides from the flowers of *Malva mauritiana* L. structure of arabinogalactan. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 60,2112-2118(1995)
- 34) Bradbury, A G W.; Halliday, D J. Chemical structures of coffee bean polysaccharide. *J Agric Food Chem.* 38,389-392(1990)

- 35) Yamada, M.; Kahara, J. A Method for producing clearly coffee extract. Japan Kokai Tokkyo Koho, 391058381(1995).
- 36) Nakano, H.; Takenishi, S.; Kitahata, S.; Kinugasa, H.; Watanabe, Y. Purification and characterization of an exo-1,4- $\beta$ -galactanase from a strain of *Bacillus subtilis*. *Eur.J.Biochem.* **193**, 61-67(1990)
- 37) Vis, J W.; Leeuwen, M J F.; Siliha, H. A.; Kormelink, F. J. M.; Voragen, A. G. Purification and characterization of endo-1,4- $\beta$ -D-galactanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*: Use in combination with arabinanases from *Aspergillus niger* in enzymic conversion of potato arabinogalactan. *Carbohydrate Polym.* **16**,167-187(1991)
- 38) Kimura, I.; Yoshioka, N.; Tajima, S. Purification and characterization of an endo-1,4- $\beta$ -D-galactanase from *Aspergillus sojae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **85**,48-52(1998)
- 39) Lahaye, M.; Vigouroux, J.; Thibault, J. F. Endo- $\beta$ -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*: Purification and some properties. *Carbohydrate Polym.* **15**,431-444(1991)
- 40) Yamaguchi, F.; Inoue, S.; Hatanaka, C. Purification and properties of Endo- $\beta$ -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Biosi. Biotechnol. Biochem.* **59**,1742-1744(1995)
- 41) Chistgau, S.; Sandal, T.; Kofod, L.V.; Dalboge, H. Expression cloning, purification and characterization of a  $\beta$ -1,4- galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Curr. Genet.* **27**, 135-141(1995)
- 42) Vigouroux, M. J.; Thibault, J. F. Endo- $\beta$ -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*. Purification and some properties. *Carbohydr. Polym.* **15**, 431-444(1991)

- 43) Yamaguchi, F.; Inoue, S.; Hatanaka, C. Purification and properties of endo- $\beta$ -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1742-1744(1995)
- 44) Nakano, H.; Takenishi, S.; Watanabe, Y. Purification and properties of two galactanases from *Penicillium citrinum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3445-3454(1985)
- 45) Brillouet, J M.; Williams, P.; Moutoument, M. Purification and Some Properties of a Novel Endo-B- (1 $\rightarrow$ 6) -D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **55**,1565-1571(1991)
- 46) Pellerin, P.; Brillouet, J. Purification and properties of an exo-(1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$  -galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Res.* **264**, 281-291(1994)
- 47) Hashimoto, Y. Studies on the enzyme treatment of coffee beans. Part V. Structure of coffee arabinogalactan. *Nippon Nougai Kagaku kaisi.* **45**, 147-150(1971)
- 48) Fujita, T.; Iwai, K.; Kumori, H.; Nakabayashi, Y.; Mori, S.; Komemushi, S. Degrading Condition of Arabinogalactan by *Aspergillus fumigatus* Strain No.232. *Jpn. J. Food Microbiol.* **13**, 103-109(1996).
- 49) Fujita, T.; Iwai, K.; Kumori, H.; Nakabayashi, Y.; Mori, S.; Komemushi, S. Degradation of Arabinogalactan in Coffee Polysaccharides by *Aspergillus fumigatus* No.232 Isolated from Coffee Beans. *J. Antibact. Antirung. Agents.* **24**, 773-781(1996)
- 50) 中村道徳・貝沼圭二編 澱粉・関連糖質酵素実験法 学会出版センター  
1989 p14

- 51) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275(1951)
- 52) Tsumuraya, Y.; Mochizuki, N.; Hashimoto, Y.; Kovac, P. Purification of an Exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 7207-7215(1990)
- 53) 高島幸司：富山県林業技術センター研究報告 食用担子菌の生育に及ぼすカラマツ水抽出物の影響に関する研究 1997 No.10 p3~p4 p7~p12
- 54) Hartland, R. P.; Fontaine, T.; Debeauquis, J. P.; Simenel, C.; Delepierre, M. and Latge, J. P. A novel  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **271**, 26843-26849(1996)
- 55) Fontaine, T.; Hartland, R. P.; Beauvais, A.; Diaquin, M.; Latge, J. Purification and characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Biochem.* **193**, 61-67(1990)
- 56) Planchot, V.; Colonna, P. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Res.* **272**, 97-109(1995)
- 57) Planchot, V.; Colonna, P.; Gallant, D. J.; Bouchet, B. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Cereal Science.* **21**, 163-171(1995)
- 58) Hartland, R. P.; Fontaine, T.; Debeauquis, J. P.; Simenel, C.; Delepierre, M. and Latge, J. P. A novel  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **271**, 26843-26849(1996)

- 59) Rezende, S. T. and Felix, C. R. Raffinose-hydrolyzing activity of *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnol. Lett.* **19**,217-220(1997)
- 60) Ximenes, E. A.; Felix, C. R.; Ulhoa, C. J. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one $\beta$ -glucosidase. *Current Microbiol.* **32**,119-123(1996)
- 61) Nishimura,s.;Akasaka,T.;Maekawa,Y. Structural analysis of arabinogalactan from Japanese larch in Hokkaido and chemical functionization of arabinogalactans. *Cellulose Commun.***9**,13-17(2002)
- 62) Clifford, M. N. (1985). Chapter 5, Chlorogenic acids. In"Coffee. Vol.1:Chemistry,"ed. by Clarke R. J., Macrae, R., Elsevier Applied Science,London, pp186-187.
- 63) De Menezes, H.C. The relationship between the state of maturity of raw 20 coffee beans and isomers of caffeoylquinic acid. *Food Chem.* **50**,293-294(1994)
- 64) Ohnishi, M.; Morishita, H.; Iwahashi, H.; Toda, S.; Shirataki, Y.;Kimura, M.; Kido, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry.* **36**, 579-583(1994)
- 65) Sato, M.; Hiraoka, A.; Watanabe, M. Inhiition of  $\gamma$ -irradiation-induced oxidation of chlorogenate by 1,3-dicaffeoylquinic acid in *Xanthium occidentale*. *Phytochemistry.* **33**, 1357-1360(1993)
- 66) Basnet, P.; Matsushige, K.; Hase, K.; Kadota, S.; Namba, T. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 655-657(1996)
- 67) Nagaoka, T.; Baskota, A. H.; Xiong, Q.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Synthesis and antihepatotoxic and antiproliferative activities of di- and

- tri-O-caffeoylquinic acid derivatives. *Wakan iyakugaku zasshi*.  
18,183-190(2001)
- 68) Chen, Y-J.; Shiao, M-S.; Hsu, M-L.; Tsai, T-H.; Wang, S-Y. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5615-5619(2001)
- 69) Zhu, K., Cordeiro, M. L., Atienza, J., Robinson, E. W. Jr., Chow, A. A.21 Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *J. Virol.* **73**, 3309-3316(1999)
- 70) McDougall, B.; King, P.-J.; Wu, B.-W.; Hostomsky, Z.; Reinecke, M. G.; Robinson, W. E. Jr. Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 140-146(1998)
- 71) King, J. -P.; Ma, G.; Miao, W.; Jia, Q.; McDougall, B. R.; Reinecke, M. G.; Cornell, C.; Kuan, J.; Kim, T. -R.; Robinson, W. E. Jr. Structure activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication, *J. Med. Chem.* **42**, 497-509(1999)
- 72) Kwon, H. -C.; Jung, C. -M.; Shin, C. -G.; Lee, J. -K.; Choi, S. -U.; Kim, S. -Y.; Lee, K. -R. A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 1796-1798(2000)
- 73) Tatefuji, T.; Izumi, N.; Ohta, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. Isolation and identification of compounds from brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 655-657(1996)



- 74) Van der stegen, G.H.D.; van Duizn, J. Analysis of chlorogenic acids in coffee. ASIC 9th Colloque, London, 1982, pp.107-112.
- 75) Ohiokpehai, O.; Brumen, G.; Clifford, M. N. The Chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. ASIC 10th Colloque, Salvador, 1982, pp.177-185.
- 76) Uritani, I.; Muramatsu, K. Phytopathological chemistry of black-rotted sweet potato. part 4. Isolation and identification of polyphenols from injured sweet potato. *Nippon Nougai Kagaku kaisi.* **27**, 29-33(1952)
- 77) Martin, R.; Lilley, T. H.; Falshaw, C. P.; Haslam, E.; Begley, M. J.; Magnolato, D. The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex. *Phytochemistry.* **26**, 273-279(1994)
- 78) Yoshikawa, M.; Harada, E.; Miki, A.; Tsukamoto, K.; Liang, S,-Q.; Yamahara, J.; Murakami, N. Antioxidant constituents from the fruits hulls of magosteen (*Garcinia mangosana* L.) originating in vietnam. *Yakugaku Zasshi*, **114**, 129-133. (1994)
- 79) Matsushige, K.; Basnet, P.; Kadota, S.; Namba, T. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoylquinic acid derivatives from Propolis. *J. Trad. Med.* **13**, 217-228(1996)
- 80) Tada, T.; Ohnishi, K.; Komiya, T.; Imai, K. Synthetic Search for Cosmetic Ingredients: preparations, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of caffeic amides. *J. Oleo Sci.* **51**, 19-27(2002)
- 81) Maeda, Y.; Masui, T.; Sugiyama, K.; Yokota, M.; Nakagomi, K.; Tanaka, H.; Takahashi, K.; Kobayashi, T.; Kobayashi, E. Studies on anti-allergic activity in tea. II. Inhibitory effect of tea extracts on hyaluronidase. *J Food Hygiene Soc Japan.* **31**, 233 – 237(1990)

- 82) Shinmoto, H.; Miyama, Y.; Kobori, M.; Sinmoto, T. Effects of some vegetable extracts on the growth of human cell lines measured by WST-1 assay. *Nippon Syokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. **43**, 64-68(1996)
- 83) Yamada, J. Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*.**60**, 328-329 (1996)
- 84) Yoshimoto, M.; Okuno, S.; Yoshinaga, M.; Yamakawa, O. Antimutagenicity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci Biotechnol Biochem*. **63**, 537-541 (1999)
- 85) Yoshimoto, M.; Yahara, S.; Okuno, S.; Islam, Md. S.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. Antimutagenicity of Mono-, di, and tricaffoylquinic acid derivatives isolated from Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem*. **66**, 2336-2341 (2002)
- 86) 斉藤俊光、湯本聡一、中嶋克行、小田美光：変異原性試験試薬キット ウムラック AT (umu 試験法) の基礎的検討 p105-113 医療と検査機器・試薬 別冊 機器・試薬(2004).
- 85) Ky, C. L.; Noirot, M.; Hamon, S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). *J.Agric. Food Chem* **45**, 786-790 (1997)
- 88) Fang, N.; Yu, S.; Prior R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem*. **50**, 3579-3585(2002)
- 89) Corse, J.; Sondheimer E.; Lundin, R. 3-feruloylquinic acid A 3'-methyl ether of chlorogenic acid. *Tetrahedron*. **78**, 1207-1210(1962)
- 90) Morishita, H.; Iwashita, H.; Osaka, N.; Kido, R. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by <sup>1</sup>H

- nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **315**, 253-260(1984)
- 91) Islam M. S.; Yoshimoto, M.; Yahara, S.; Okuno, S.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in Seetpotato (*Ipomoea batatas* L.)genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3718-3722 (2002)
- 92) Nakatani, N.; Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K.; Mitani, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.).*J. Agric. Food Chem.***48**, 5512-5516(2000)
- 93) Lee, H. -S. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1400-1403(2002)
- 94) Kubo I., Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4574-4578(1999)
- 95)井端康夫、オリザノールの作用機構と化粧品への配合効果についての考察、*Fragrance J.* **45**, 92(1980)
- 96) Shimosono, H.; Kobori, M.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. Suppression of the melanogenesis of mouse melanoma B16 cells by sweet potato extract. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* **43**, 313-317(1996)
- 97) Kuppusamy U R, Khoo H E, Das N P, B Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol*, **40**, 397-401 (1990)
- 98) Kakegawa, H.; Matsumoto, H.; Satoh, T. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pharm Bull.* **33**, 642-646(1985)

- 99) Kakegawa, H.; Matsumoto, H.; Endo, K.; Satoh, T.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem Pharm Bull.* **33**, 5079-5082 (1985)
- 100) Nishizawa, C.; Nguyen, V. C. The comparison between coffee and tea on desmutagenicity, radical scavenging activity and antioxidative activity. *Nippon Syokuhin Kagaku Kougaku Kaishi.***48**,533-538(2001)
- 101) Obana, H.; Nakamura, S. Survey of anti-mutagens in foods based on the inhibition of SOS responses. *J Food Hygiene Soc Japan.* **28**,159-163(1987)
- 102) Obana, H.; Nakamura, S. Suppressive substance(s) for umu gene expression an instant coffee. *J Food Hygiene Soc Japan.* **30**,49-56(1989)
- 103) Schobel, S.;Pollmann,W. Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch.* **35c**, 209-212 (1980).
- 104) Okamura, S.; Watanabe,M. Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1839-1848 (1982).
- 105) Nakajima,N.; Ishihara,K.; Matsumura,S.; Hamada, H.; Nakamura, K.;Furuya,T. Note Lipase-catalyzed Synthesis of Arbutin Cinnamate in an Organic Solvent and Application of Transesterification to Stabilize Plant Pigments. *Biosei. Biotech. Biochem.*,**61**, 1926-1928 (1997)
- 106)北村敬：ウイルス研鑽のための組織培養技術、pp198-199、近代出版（1976）
- 107) Tsumura, H.; Kodama, H.; Ito,Y.; Shimura,K.. In Vitro and In Vivo Interferon Production in NOD Mice. *Laboratory Animal Science*, **39**, 575-578(1989)

- 108) Nakayama, T., M. Yamada, T. Osawa, and S. Kawakishi: Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and DNA single-strand breaks in Chinese Hamster V79 Cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 316-318(1996).
- 109) Nakayama, T., M. Yamada, T. Osawa, and S. Kawakishi: Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 265-267 (1993).
- 110) Nakayama, M., Toda, M., Okubo, S., Shimamura, T. Inhibition of influenza virus infection by tea. *Lett Appl Microbiol*, **11**,38-40 (1990)
- 111) 三沢典彦、新藤一俊、岡崎寛、古川謙介、堀之内末治、水酸化された複素環化合物および芳香族カルボン酸の製造法および改変された芳香環ジオキシゲナーゼ、特許公開 2003-269 号(2003.1.7).
- 112)株式会社ホーネンコーポレーション:抗アトピー作用を持つ機能性糖質の製造技術の開発、p.190~203、ニューフードクリエーション技術研究組合 編:糖質工学によるアプローチ 炭水化物の多面的利用技術の展開、恒星社厚生閣(2003).
- 113) Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Agric Food Chem.***50**, 5735-5741 (2002)
- 114) Konishi, Y.; Kobayashi, S. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem.* **52**, 2518-2526 (2004)
- 115) Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; TERA0, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem.***48**, 5496-5500 (2000)

- 116) Andreasen, M F.; Kroon, P A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M-T.  
Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem.* **49**, 5679-5684 (2001)
- 117) Couteau, D.; Williamson, G.; Faulds, C B.; McCartney, A L.; Gibson, G R.  
Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol.* **90**, 873-881 (2001)
- 118) Plumb, G W.; Garcia-Conesa M T.; Kroon, P A.; Rhodes, M.; Ridley, S.;  
Williamson, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric.* **79**, 390-392 (1999)
- 119) Olthof, M R.; Hollman, P C H.; Katan, M B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* **131**,66-71(2001)
- 120) Baba, S.; Terao, J. Role of metabolism in physiological function of polyphenol catechins. *Oreo Sci.* **4**,271-277(2004)