

アデノシン N1-オキシドの簡易合成法, 及びレスベラトロール配糖体調製法の検討

片岡 鮎美*・竹内 愛幸*・中杉 爽志
金沢 功・福田 恵温

Synthesis of adenosine N1-oxide and glycosylation of resveratrol

Ayumi KATAOKA*, Ayu TAKEUCHI*, Soushi NAKASUGI,
Ko KANAZAWA, Shigeharu FUKUDA

Abstract

Adenosine N1-oxide (ANO) discovered in Royal jelly shows highly anti-inflammatory activity. For synthesis of ANO, we tried the oxidation of adenosine with hydrogen peroxide generated by glucose oxidase, however it was not suitable because of the side reactions. Furthermore, the direct oxidation method with hydrogen peroxide was examined. It was found that this synthesis method was possible with high yield of 80 % in the presence of 20 % acetic acid. Next, we tried the synthesis of glycosyl resveratrol by cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase). By reacting at 70°C in the presence of 20 % ethanol, the yield of glycosylated products was reached to over 35 %.

Key words : Anti-inflammation, Anti-oxidation, Royal jelly, Adenosine, Resveratrol, Glycosylation
キーワード : 抗炎症作用, 抗酸化作用, ローヤルゼリー, アデノシン, レスベラトロール, 配糖化

1. はじめに

ヒトの健康機能維持を目的とした食品が数多く市場化されている。現在、特定保健用食品（トクホ）は1000種類以上認可されており、届出のみで済む機能性表示食品は5000種以上が製品化されている¹⁾。食物繊維、腸内環境改善に関する製品が大半を占めてい

るが、その他にはカテキン、イソフラボン、クルクミンなど抗酸化、抗炎症機能に着目した製品も数多くある。

これら機能性成分を合成、あるいは改良するためには有機化学的合成法ではなく、食品成分あるいは食品添加物のみを用いた方法が望まれる。

本研究では、極めて強力な抗炎症作用を示すアデ

吉備国際大学農学部
〒656-0484 兵庫県南あわじ市志知佐礼尾370-1
School of Agriculture, Kibi International University
370-1, Shichi-sareo Minami-awaji, Hyogo, Japan (656-0484)

* These authors contributed equally to this work.

ノシン N1-オキシド (Adenosine N1-oxide, ANO) のアデノシンからの合成, またブドウ, 赤ワインなどに含まれる機能性成分であるレスベラトロール (Resveratrol) の水溶性向上を目的とした配糖体合成を試みることにした。

2. ANO合成法の検討

ローヤルゼリーは働き蜂が花粉を食べて体内で分解・合成し, 下咽頭線などから分泌する乳白色のクリーム状の物質であり, 女王蜂が生涯にわたって食べる唯一の食料である。女王蜂は働き蜂の約2~3倍の大きさであり, 寿命は働き蜂の約1ヶ月に対して3~4年とはるかに長寿であることから, 中国では「不老長寿の妙薬」として扱われていた。

筆者の一人である福田が以前所属していた研究所において, ローヤルゼリーの効果を確認する試験を実施した。すなわちC3H/HeJマウスにローヤルゼリーを連日経口投与し, 3年にわたってマウスの生死, さらには疾患発生状況を調べた。その結果, 50%生存率ではコントロール 89週に対し試験群では112週に, また75%生存率ではコントロール 63週に対し, 試験群では105週と約1.7倍の寿命延長が認められた²⁾。通常食では炎症性疾患, 発癌による死亡例が多数認められたのに対し, ローヤルゼリー投与群ではこれらの疾患発生が極めて低く, 健康寿命の延伸が認められた。

この結果を受けて河野らは, ローヤルゼリー中に強力な抗炎症活性が存在することを見出し, マクロファージのLPS処理により誘導される腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) の産生抑制作用を指標に精製, 同定した結果, アデノシン (Adenosine, ADO), アデノシン一リン酸 (Adenosine monophosphate, AMP) の酸化体であるアデノシン N1-オキシド (Adenosine N1-oxide, ANO), アデノシン一リン酸 N1-オキシド (Adenosine monophosphate N1-oxide) であることが分かった³⁾。癌の末期, 高齢者の細菌感染などにより

引き起こされる敗血症モデルにおいても, 30時間以内に全例が死亡したのに対しANO投与群では80%が生き残り, ANOは強烈的な炎症反応を抑制することが分かった。

しかし, ローヤルゼリー 1g中のANO含量は100~120 μg 程度と極めて微量であり, 継続摂取するには費用がかかる。ANOを安価に大量に合成することができれば健康寿命延伸への寄与が期待される。従来ANOは化学合成法により合成されてきたが⁴⁾, この方法では食品添加物として認可されていない原料を用いているため食品として使うことができない。そこで本研究では安価かつ大量に生産可能な合成法を検討することにした。調味料にも含まれているアデノシンを原料に, 大量に生産可能な酵素合成法, 及び過酸化水素水を用いた直接酸化法を検討することにした。

2-1. グルコースオキシダーゼによるANO合成法の検討

ローヤルゼリーには, 核酸の成分であるアデノシン類が存在すること⁵⁾, また強いグルコースオキシダーゼ (Glucose Oxidase, GOD) 活性が存在することが分かっている⁶⁾。このことから, ローヤルゼリー中のグルコースオキシダーゼがグルコースを酸化し, 生成した過酸化水素がアデノシンを酸化することによりANOが生成しているのではないかと考えられる。

先に中杉は図1の反応模式を想定し, アデノシン,

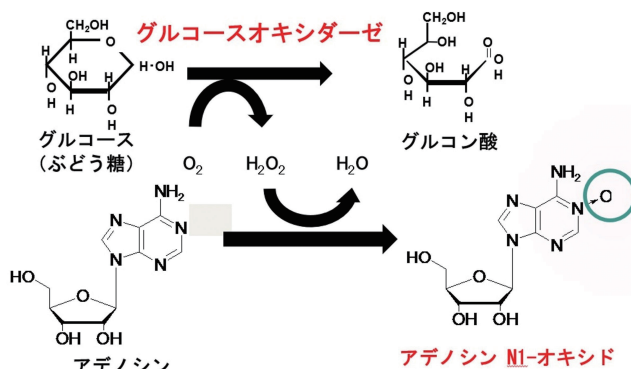


図1 グルコースオキシダーゼによるアデノシンの酸化機構 (推定)

グルコース、グルコースオキシダーゼの存在比を種々検討した結果、アデノシン 10 mg から約 150 μ g の ANO が合成されることを確認した⁷⁾。

(1) 実験材料

グルコースは試薬特級、アデノシンは富士フィルム社製特級試薬を、グルコースオキシダーゼは天野エンザイム社製「ハイデラーゼ15」を用いた。アデノシン N1オキsidはInter Bio Screen Dec社より購入した。

(2) 実験方法

アデノシン 100 mg/2 mL 水溶液に対し、グルコース 200~1000 mg, グルコースオキシダーゼ溶液 (15 mg/mL) 300 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C もしくは 50 $^{\circ}$ C で 7 日間反応させた。

(3) 薄層クロマトグラフィー分析法

Merck社のアルミニウムプレートに反応液をスポットし、1-ブタノール：エタノール：水 = 4 : 3 : 3 で展開した。風乾後、紫外線ランプ照射下でスポットを確認した。

(4) 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS)

以下の装置、条件で分析を行った。

装置：Waters ACQUITY UPLC with Xevo TQD

分析カラム：ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m

移動相A：Acetonitrile with 0.1 % Formic Acid

移動相B：0.1 % Formic Acid solution

流速：0.4 mL/min, カラム温度：45 $^{\circ}$ C

(5) 結果

反応液の分析例としてグルコース高濃度存在下、60 $^{\circ}$ C, 7日反応後のLC-MS/MSクロマトグラムを図2(a)に示した。ANOの分子量を指標にしたLC-MS分析では 4.42 min にピークが認められ、LCで相当するピークが 4.45 min に確認された。このピークが ANO に相当すると考えられるが、4.53 min 付近にも同等量のピークが確認された。これはANO以外の副反応物であると推定される。

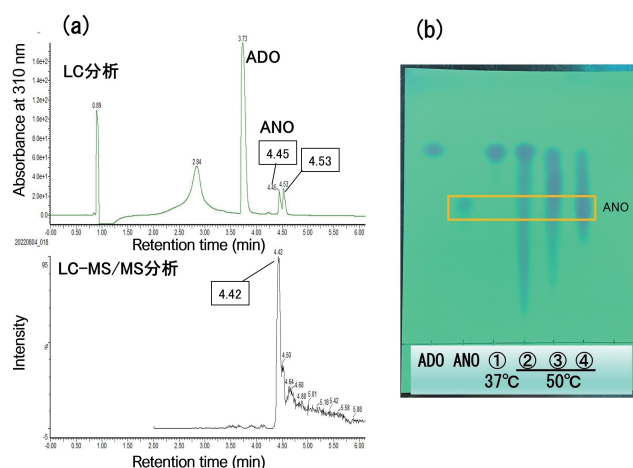


図2 グルコースオキシダーゼによるADOの酸化、ANO合成反応

(a) 50 $^{\circ}$ C反応液④のLC(上)、LC-MS/MS(下)分析

(b) 反応液のTLC分析

① 37 $^{\circ}$ C, 7日反応

②, ③, ④グルコース量を 200, 600, 1000 mg 加え, 50 $^{\circ}$ C, 7日反応

図2(b)に示したように薄層クロマトグラフィーの結果でもスポットがスミアになり、ANOの合成反応以外に副反応が起こっていることが分かった。酵素製剤は酵素生産菌の培養液から調製されているため、グルコースオキシダーゼ以外の夾雑酵素によりアデノシンが分解、変性作用を受けたものと考えられる。

純粋なグルコースオキシダーゼを用いることができれば高純度のANOを得ることが期待されるが、現状の酵素製剤では高純度合成は困難であると判断した。

2-2. 過酸化水素 (H₂O₂) によるアデノシン直接酸化法の検討

グルコースオキシダーゼにより生成した過酸化水素がADOを酸化している可能性が考えられたので、今度は過酸化水素によるアデノシンの直接酸化法を検討した。なお、過酸化水素は漂白目的で食品添加物としての使用が認められている。

アデノシンは水溶性が低く (0.04 mg/mL), 中性条件下では反応が進行しにくいと考えられたため、酸性条件下での反応も試みることにした。アデノシンは 20 % 酢酸溶液にほぼ完全に溶解することを確認している。

(1) 実験材料

反応に用いる過酸化水素, 酢酸は試薬特級を用いた.

(2) 実験方法

アデノシン 50 mg/mL, 過酸化水素として 15 % となるよう混合し, 37°C, 50°C, 60°C で 3 週間反応させ, LC-MS/MS 分析, TLC 分析を行った. 分析は前記と同じ条件で行った.

なお上記反応組成に酢酸を追加し(最終濃度 20 %), 同様に反応させた後, 分析を行った.

(3) 結果

酢酸非存在下での結果を図 3 に示す. 反応温度が高いほど ANO の生成率が上昇した. 一方 TLC では ANO のスポットの上下に副反応と思われるスポットが増加していた. 反応温度が高いほど, また反応時間が長いほど副反応が進行すると考えられる.

一方, 20 % 酢酸存在下での分析結果を図 4 に示した. 反応温度に関係なく反応は 1 週間でほぼ完結しており, ANO の生成率は 80 % 近くに達していることが分かった. 酸性下で ADO が完全に溶解しているこ

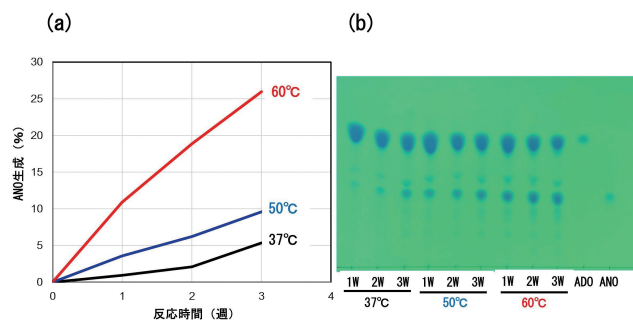


図 3 中性条件下での過酸化水素による ANO 合成

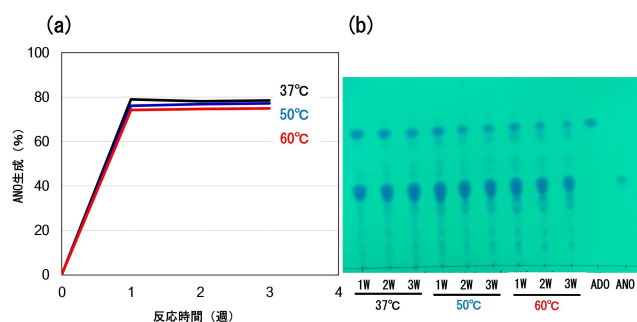


図 4 酢酸存在下での過酸化水素による ANO 合成

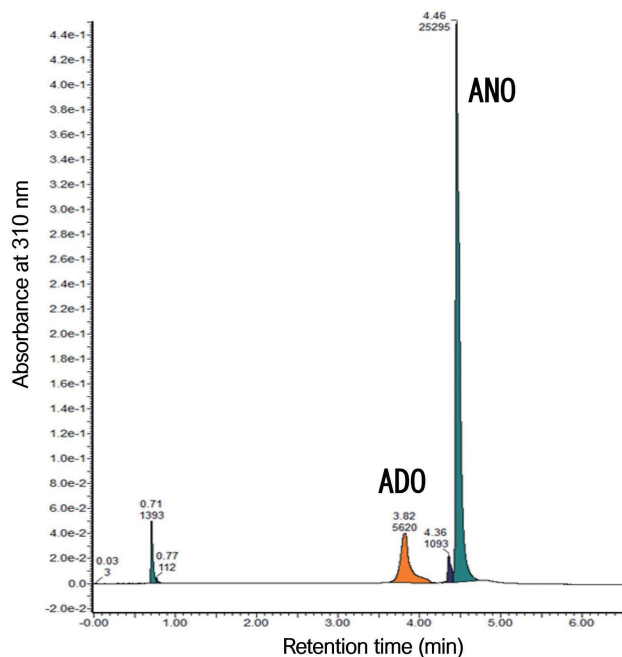


図 5 LC による ANO 分析例

酢酸存在下, 37°C, 7 日反応後の分析

とが必須条件であると考えられた. ただし, (b) の TLC 結果を見てもわかるように, 反応温度が高いほど, 反応時間が長いほど副反応が進行している.

37°C, 1 週間反応後の LC 分析結果を図 5 に示す. 極めてシャープな ANO のピークが観察されており, 純度の高い標品が得られることが分かった.

3. レスベラトロール配糖化の検討

ヨーロッパ諸国の中で, フランス人は飽和脂肪酸が豊富に含まれる食事を摂取しているにもかかわらず血管系の疾患による死亡率が低いことから, この現象は「フレンチパラドックス」と呼ばれている⁸⁾. フランス人は赤ワインを大量に飲むため, その要因がワインの成分にあるのではないかと考えられ, ポリフェノールの一種であるレスベラトロールが注目された. レスベラトロールはマウスの寿命を延長させるとの成果が発表され, 大きな注目を集めた⁹⁾. またヒトでの臨床試験において動脈硬化の改善¹⁰⁾, 認知症の予防¹¹⁾, 肥満抑制¹²⁾などの効果が報告されている.

またレスベラトロールを有効成分とした機能性食品、化粧品などが製品化されている。しかし水溶性が 0.03 mg/mL と極めて低いため高濃度の処方難しい。シクロデキストリンなどの環状糖質を用いた分散法の工夫がされているが十分ではない。一方で、ポリフェノールなどの水酸基（OH基）へ糖質を結合させることにより、飛躍的な水溶性向上が期待される。ミカン果皮に含まれるヘスペリジンにデンプンとシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（Cyclomaltodextrin glucanotransferase, CGTase）を作用させると、ヘスペリジンのOH基にオリゴ糖を結合させた配糖体が合成される。この配糖体の水溶性は 10 万倍上昇し、生体内において吸収効率が上昇することが分かっている¹³⁾。

そこで、レスベラトロールの配糖化による水溶性向上を目的として、図6に示したような反応系を設計した。すなわち、デンプンに作用してオリゴ糖を転移させるCGTase、もしくはマルトースのような2糖に作用してグルコース単位で転移させるグルコシルトランスフェラーゼ（Glucosyltransferase, GTase）を用いて配糖体合成を試みることにした。これらの酵素を用いた場合、糖の結合様式は α -結合になる。

なおレスベラトロールにグルコースが β -結合したピセイド（Piceid）が知られているが、ブドウ果皮中

の含量は低い。またイタドリの根にピセイドが比較的多く含まれているが、イタドリの根は「虎状根」という漢方薬に属し、食品に用いることはできない。

レスベラトロールには3カ所OH基が存在しており、そのいずれにも糖が結合する可能性がある。

3-1. レスベラトロールの配糖化可能性検討、及びエタノール共存下での最適反応条件の設計

(1) 実験材料

基質用のデンプンとして松谷化学製のパインデックス#100、もしくは#1を用いた。配糖体調製には主に#100を用いた。耐熱性菌由来CGTaseとしてNOVO社のToruzymeを、中温菌由来CGTaseとして天野エンザイム社のコンチザイム、またGTaseとして天野エンザイム社のトランスグルコシダーゼを用いた。

なおCGTaseの活性を糊精化法¹⁴⁾により測定した結果、Toruzyme原液は約 170 U/mL、コンチザイムは約 140 U/mL であった。トランスグルコシダーゼの活性は測定していない。

(2) 薄層クロマトグラフィー分析法

前記ANO分析と同様Merck社のアルミニウムプレートを用い、1-ブタノール：エタノール：水=4：3：3で展開した。風乾後、紫外線ランプ照射下でスポットの確認を行った。

(3) 液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）

以下の装置、条件で分析を行った。

装置：Waters ACQUITY UPLC with Xevo TQD

分析カラム：CAPCELL PAK C18 Type：MG II

移動相：Water：Acetonitrile=70：30

流速：0.4 mL/min、カラム温度：45℃

(4) 結果

まず3種類の酵素を用いて 37℃で 16 時間反応後、薄層クロマトグラフィーによる転移生成物の確認を行った。その結果、図7に示したようにToruzymeの反応液でわずかに転移生成物と思われるスポットが認められた。コンチザイム、GTaseでは新たなスポット

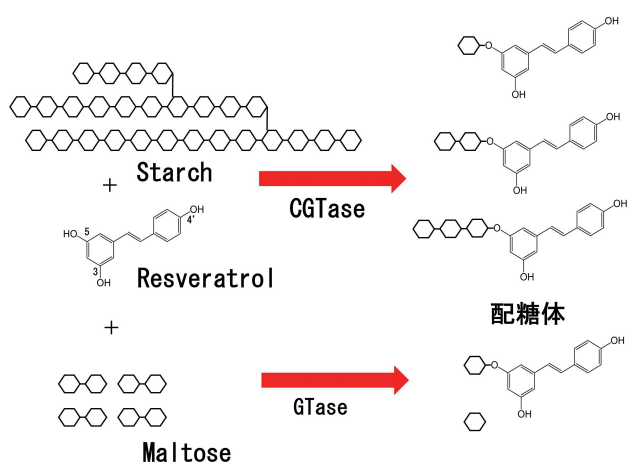


図6 糖転移酵素によるレスベラトロール配糖体合成スキーム

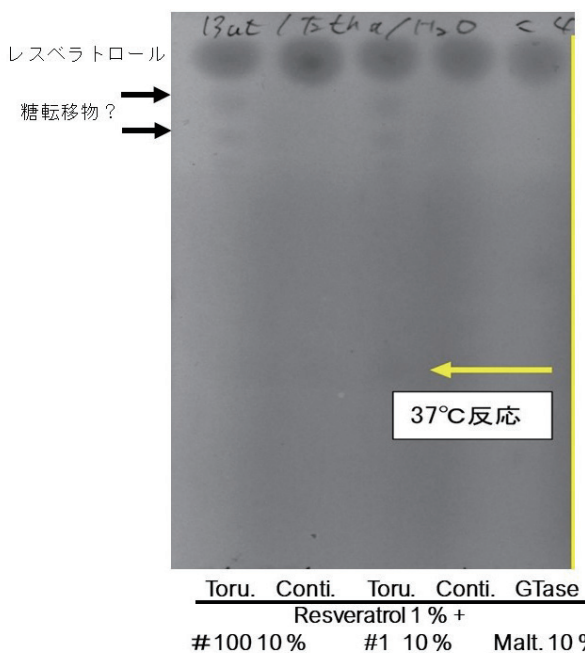


図7 糖転移酵素によるレスベラトロール配糖化可能性の検討

レスベラトロールとして1%, デンプンもしくはマルトースは10%濃度で37°C, 16時間反応させた。矢印の位置にわずかながら反応生成物が確認された。

をほとんど確認することができなかった。この結果より, 以降の試験にはToruzymeを用いることにした。

次に反応液中でのレスベラトロールの溶解性を向上させるため, 種々の濃度のエタノール存在下, 37°C~80°Cの条件で3~5日間反応させた。反応液はLC-MS/MS分析を行った。分析例を図8に示す。

図8 (d)では, グルコース1分子結合体が3ピーク認められた。これはレスベラトロールに3カ所OH基が存在しており, その結合異性体ではないかと考えられる。

上記LC分析により, 各反応液の糖転移率を求めた。図9に37°C, 70°Cにおける糖転移率の経時変化を示した。37°Cではエタノール濃度が高くなるに従い糖転移率が上昇しているが, 40%を超えると転移率が逆に低下した。これはエタノール高濃度下で酵素タンパク質の変性, 失活が起こっているものと考えられる。さらに70°Cでは20%エタノール存在下で最も高い転移効率を示した。

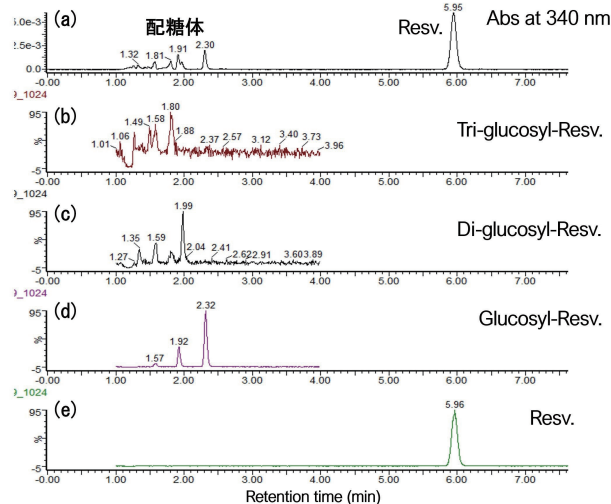


図8 糖転移反応物の分析例

(a) 340 nmにおけるクロマトグラム
5.96 minのピークはレスベラトロール, 1.32 min~2.30 minのピークが配糖体と考えられる。
以下 (b)~(e) は各分子種の質量数をもとにしたクロマトグラム
(b) グルコース3分子結合体, (c) 2分子結合体,
(d) 1分子結合体, (e) レスベラトロール

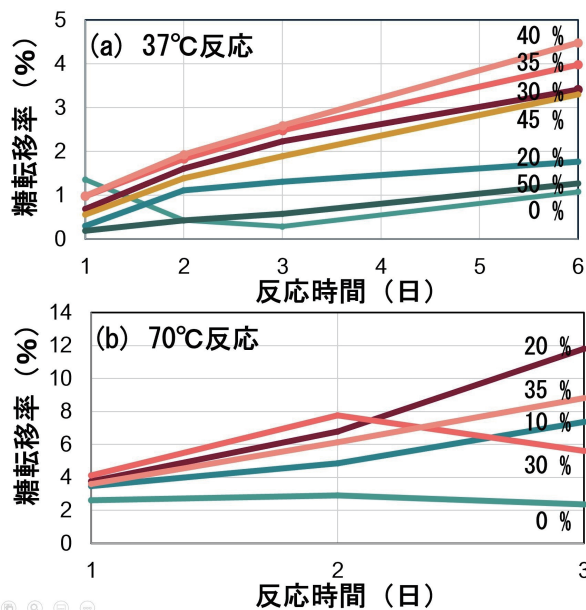


図9 37°C, 70°Cにおける糖転移率の経時変化
各エタノール濃度存在下, レスベラトロール 10 mg/mL, デンプン 10%, CGTase 1.7 U/mLの条件で反応を行った。右肩の数値はエタノール濃度を示す。

糖転移率に及ぼすエタノール濃度, 反応温度の影響を図10にまとめた。今回設定した試験条件では20%エタノール存在下, 70°Cでの反応条件が最も転移効率が高いことが分かった。

次に最適反応条件下でデンプン濃度, 酵素使用量の

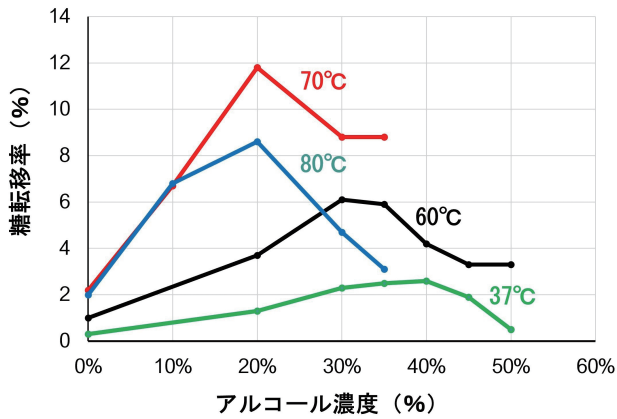


図10 糖転移率に及ぼすエタノール濃度，反応温度の影響

表1 糖転移率に及ぼすデンプン濃度，酵素量の影響

デンプン濃度	酵素濃度	糖転移率 (%)		
		U/ml	1日目	2日目
10%	1.7	15.3	16.3	17.7
10%	3.4	21.2	21.4	14.4
10%	5.7	20.5	12.4	13.2
20%	1.7	7.28	23.1	28.2
20%	3.4	31.5	34.8	33.6
20%	5.7	30.9	35.4	28.0

影響を調べた。表1に示すようにデンプン濃度が高いほど転移率も上昇し、35%に達することが分かった。

3-2. 既報との比較

レスベラトロールの配糖化はいくつかの研究グループで実施されており、我々の方法に近い2例と比較して表2にまとめた。

T. Mariaらは、シクロデキストリンにレスベラ

表2 Toruzymeによるレスベラトロール配糖化の比較

反応素材	T. Marieら	P. Torresら	本研究
受容体濃度	Resveratrol 0.585 mg/ml	Resveratrol 10 mg/ml	Resveratrol 10 mg/ml
供与体濃度	β-cyclodextrin 17.5 mg/ml	Starch 60 mg/ml	Starch 200 mg/ml
酵素量* (Toruzyme)	4.38 U/ml	20.8 U/ml	3.48 U/ml
反応溶媒	Buffer	20% DMSO	20% Ethanol
反応温度	80 °C	60 °C	70 °C
反応時間	2 hr	24 hr	48 hr
糖転移率	34.5 %	50 %	35 %

* 活性単位の定義が異なるため、単純な比較は困難。

表3 レスベラトロールへの糖転移に及ぼすエタノールとDMSOの比較

反応温度	溶媒	酵素量	糖転移率 (%)	糖転移率 (%)	糖転移率 (%)
			反応1日目	反応2日目	反応3日目
60°C	EtOH 20%	1.7 U/ml	11.8	22.9	26.8
	DMSO 20%	1.7 U/ml	15.5	30.0	33.8
	EtOH 20%	3.4 U/ml	12.1	26.4	35.4
	DMSO 20%	3.4 U/ml	26.9	30.8	31.3
70°C	EtOH 20%	1.7 U/ml	16.6	31.4	34.3
	DMSO 20%	1.7 U/ml	16.0	30.9	31.1
	EtOH 20%	3.4 U/ml	17.1	35.4	29.5
	DMSO 20%	3.4 U/ml	29.6	35.0	30.5

トロールを包接させ、水溶性が向上した条件下でToruzymeによる配糖化を試み、80°Cという高温下で34.5%の転移率に達している¹⁵⁾。しかし反応時のレスベラトロール濃度が低く、更なる条件検討が必要であると考えられる。

一方、P. Torresらはジメチルスルホキシド (DMSO) 存在下でレスベラトロールを可溶化させ、種々反応条件を検討した結果、20% DMSO存在下、60°C反応で50%の転移率に達したと報告している¹⁶⁾。しかしDMSOは有機溶媒の一種であり、食品製造には適さない。我々はエタノールを用いることにより糖転移効率が上昇することを確認したが、DMSOと本質的に異なるのかどうかを確認することにした。

エタノール、DMSOともに20%存在下で60°C、70°Cにおけるレスベラトロールへの糖転移率を調べた。その結果を表3にまとめた。レスベラトロールのDMSOへの溶解性が高いためか反応の立ち上がり(1日目)は早いですが、最終到達点、糖転移率に有意な差は認められなかった。今回の試験では糖転移率が35%程度であったが、さらに詳細な反応条件の検討を行うことにより、エタノール存在下で50%近い糖転移率を達成することが可能であると考えている。

4. 考察

(1) ANOの簡易合成法

グルコースオキシダーゼを用いた合成法は夾雑酵素

の影響により副反応が起こっていると考えられ, 酵素剤によるANO合成は不可と判断した. 血液中, 微生物培養液中にはアデノシンデアミナーゼ (Adenosine deaminase:ADA) が存在している場合が多く, これらの酵素によりアデノシンが分解されている可能性が高い. 純粋なグルコースオキシダーゼ, あるいは夾雑酵素を低減した酵素剤があれば応用可能であると考えられる.

一方, アデノシンを酢酸で可溶化した条件下で過酸化水素を用いた場合, 80 % 近いANO変換率を達成することができた. 食品添加物として過酸化水素は漂白目的に使用限定されているが, 食品添加物のみでANOを合成することができた意義は大きいと考えている. なお反応後の過酸化水素, 酢酸はpHを中性に戻した上での結晶化により容易に除去可能であると考えられる.

ANOの安全性等, 実用化へ向けての課題がまだまだ多いが, 今後の進展を期待している.

(2) レスベラトロールの配糖化

糖転移反応の最適条件であった 20 % エタノールに

おけるレスベラトロールの溶解度は数%程度であり, あまり高くはない. しかし高温で反応していること, また反応により生成した糖転移レスベラトロールは水溶性が高いため, 未反応のレスベラトロールが徐々に水層へ移動し, 酵素反応を受けているのではないかと考えられる. アデノシンの酸化反応では, アデノシンも生成したANOも溶解性が極めて低いため, 完全に溶解した状態で反応させる必要があるのではないかと考えられる.

今後の課題としては, 配糖化レスベラトロールの分離, および配糖体の水溶性を確認する必要がある. 配糖体の分離にはHP-20のような合成吸着剤 (三菱ケミカル) が適しているのではないかと考えている.

5. 謝辞

種々酵素製剤を提供いただいた天野エンザイム株式会社, ノボザイムス株式会社に感謝申し上げます.

(引用文献)

- 1) 消費者庁ホームページ
- 2) Shin-ichiro Inoue, Satomi Koya-Miyata, Shimpei Ushio, Kanso Iwaki, Masao Ikeda and Masashi Kurimoto, *Experimental Gerontology*, **38**, 965 (2003)
- 3) Keizo Kohno, Emiko Ohashi, Osamu Sano, Hajime Kusano, Toshio Kunikata, Norie Arai, Toshiharu Hanaya, Toshio Kawata, Tomoyuki Nishimoto and Shigeharu Fukuda, *J. Inflammation*, **12**: 2 (2015) DOI 10.1186/s12950-014-0045-0
- 4) Malcolm MacCoss, Eung K. Ryu, Robert S. White, and Robert L. Last, *J. Org. Chem.*, **45**, 788 (1980)
- 5) 金子希代子, 福内友子, 高柳ふくえ, 山岡法子, *Gout and Uric & Nucleic Acids*, **43**, 1 (2019)
- 6) Osamu Sano, Toshio Kunikata, Keizo Kohno, Kanso Iwaki, Masao Ikeda and Masashi Kurimoto, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 15 (2004)
- 7) 中杉爽志, 吉備国際大学農学部・修士論文 (2021)
- 8) Bruno Simini, *The Lancet*, **355**, 48 (2000), doi.org/10.1016/S0140-6736 (05) 71990-5
- 9) Joseph A. Baur, Kevin J. Pearson, Nathan L. Price, Hamish A. Jamieson, Carles Lerin, Avash Kalra, Vinayakumar V. Prabhu, Joanne S. Allard, Guillermo Lopez-Lluch, Kaitlyn Lewis, Paul J. Pistell, Suresh Poosala, Kevin G. Becker, Olivier Boss, Dana Gwinn, Mingyi Wang, Sharan Ramaswamy, Kenneth W. Fishbein, Richard G. Spencer, Edward

- G. Lakatta, David Le Couteur, Reuben J. Shaw, Placido Navas, Pere Puigserver, Donald K. Ingram, Rafael de Cabo and David A. Sinclair, *Nature.*, **444**, 337 (2006)
- 10) R H X Wong I, P R C Howe, J D Buckley, A M Coates, I Kunz and N M Berry, *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, **21**, 851 (2011), DOI: 10.1016/j.numecd.2010.03.003
- 11) David O Kennedy I, Emma L Wightman, Jonathon L Reay, Georg Lietz, Edward J Okello, Anthea Wilde and Crystal F Haskell, *Am J Clin Nutr.*, **91**, 1590 (2010), DOI: 10.3945/ajcn.2009.28641
- 12) Silvie Timmers, Ellen Konings, Lena Bilet, Ellen E. Blaak, Johan Auwerx and Patrick Schrauwen, *Cell Metabolism.*, **14**, 612 (2011), doi. org/10.1016/j.cmet.2011.10.002
- 13) 三鼓仁志, 日本食品新素材研究会誌., **15**, 93 (2012)
- 14) 江幡淳子, 調理科学., **10**, 80 (1977)
- 15) Thomas Marié, Gaëlle Willig, Andreia R. S. Teixeira, Eduardo Gazaneo Barboza, Alexis Kotland, Audrey Gratia, Eric Courrot, Jane Hubert, Jean-Hugues Renault and Florent Allais, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **6**, 5370 (2018), doi. org/10.1021/acssuschemeng.8b00176
- 16) Pamela Torres, Ana Poveda, Jesus Jimenez-Barbero, Jose Luis Parra, Francesc Comelles, Antonio O. Ballesteros and Francisco J. Ploua, *Adv. Synth. Catal.*, **352**, 1077 (2011), DOI: 10.1002/adsc.201000968