

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350100

研究課題名(和文) β -1,3-グルカンによるポリフェノール水溶液の安定化技術の開発

研究課題名(英文) Research for stability of solubilizing polyphenols with beta-1,3-glucan

研究代表者

鈴木 利雄 (SUZUKI, Toshio)

大阪市立大学・大学院工学研究科・客員教授

研究者番号：80511310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：黒酵母Aureobasidium pullulans由来の β -グルカンを用いて、p-クマル酸とその類縁体を難水溶性化合物モデルとして、その可溶化とその安定性を検討した。さらに動物試験でのその吸収評価法を検討した。また、 β -グルカンの生産性向上についても検討した。その結果、変異株の取得と β -グルカンの高生産かつ高純度回収法を確立した。アルカリ変性させた変性 β -グルカンを用いた場合にp-クマル酸の溶解度は約1.5倍に、特にカフェ酸を用いた場合は3倍となった。一方、変性 β -グルカンを用いたp-クマル酸分散液を用いた動物経口試験において、その吸収性への阻害影響は見られないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：The solubility improvement of hydroxycinnamic acids was investigated with beta-1,3-1,6-glucan from Aureobasidium pullulans. As a model compound, p-coumaric acid was evaluated for solubility with the beta glucan and their intestinal absorption. In addition, improvement of productivity also achieved through the optimization of cultivation conditions and mutation of the original strain K-1. The solubility of p-coumaric acid and caffeic acid were increased 1.5 and 3 times higher, respectively, by addition of beta glucan, which was renatured by the alkaline treatment. Moreover, its productivity was so enhanced and a unique albino mutant was obtained. On the other hand, the urinary excretion of p-coumaric acid did not change significantly using renatured beta glucan as a dispersant after single oral administration to rats. This suggests that beta glucan did not inhibit the absorption of p-coumaric acid. Detailed effect through the above p-coumaric acid solution will be continued.

研究分野：応用微生物学、生体触媒化学、食品プロセス工学

キーワード： β -グルカン p-クマル酸 ヒドロキシケイ皮酸 β -クリプトキサンチン 可溶化 包接 吸収性

1. 研究開始当初の背景

-1,3-グルカンはきのこに含まれる成分として古くから知られており、抗腫瘍活性があることが報告されている(化学工業, 2004, 55, 466)。申請者は、黒酵母 *Aureobasidium pullulans* の1菌株が、-1,3-グルカンの中でも免疫賦活活性の特に高い -1,3-1,6-グルカンを分泌生産することに注目し(抗腫瘍活性ならびに抗癌転移活性 (*Anticancer Res.*, 2006, 26, 4131))、高純度で低粘度な可溶性 -1,3-1,6-グルカン食品素材について開発した。

一方、-1,3-グルカンが形成する三重螺旋構造の内部は疎水的な空間を有しており、疎水性化合物のホスト分子として作用することが知られている(*Chem. Lett.*, 2007, 36, 668)。その三重螺旋構造はアルカリ条件 ($[NaOH] > 0.2 M$) などの環境変化で解離し、一本鎖ランダム構造となる。次いで、その溶液を中和すると、可逆的な挙動で三重螺旋構造へ巻き戻る超分子構造体である(化学工業, 2004, 55, 466)。

本黒酵母由来の -1,3-1,6-グルカンは、-1,3-結合を主鎖とし側鎖に -1,6-結合を高分岐しており、それ自体がより高い水溶性を持つことから、疎水性有用物質の水溶化剤として適材とであることを見出した(機能材料, 30, 54-62 (2010))。さらにアミンアルカリ条件を用いることで、酸化チタンなどのナノ粒子のより効果的な水分散技術を開発し、さらに本技術はシコニンなど水難溶性有機化合物にも応用できることを明らかにした。しかしながら、包接化合物の食品への応用、特に被包接化合物(ゲスト化合物)の吸収性やその後の血中動態等に関しては、研究がなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究は、疎水性化合物のホスト分子として働く -1,3-グルカンによる、疎水性難溶性化合物の包接および水溶化と水溶液中での安定的な保持、さらに、そのゲスト化合物の食品成分としての吸収性に及ぼす影響について研究するものである。申請者は、黒酵母由来の -1,3-1,6-グルカンの構造機能性を利用するナノ粒子や疎水性生理活性物質の包接複合化により、水中分散および可溶化技術を開発した。さらにアミンアルカリ水溶液中で包接複合化することにより、高濃度で酸化チタンなどのナノ粒子を安定分散することや、疎水性化合物であるシコニンを複合化し水溶化する技術を開発した。

本研究では、本技術を用いて難溶性の食品成分である *p*-クマル酸をモデル化合物として、食品としての吸収性に及ぼす影響について検討し、有用な水難溶性化合物へ応用できる“機能性食品構築のための -1,3-1,6-グルカンによる包接複合化キャリアーモデル”を構築する。一方、素材の汎用化を目的とするため、-1,3-1,6-グルカンの生産性向上

やより効果的なホスト分子構築のために分子量との関係を検討する。

3. 研究の方法

発酵法により黒酵母菌より得た -1,3-1,6-グルカン(以後、*-*グルカンと略す。)を用いて、水難溶性健康食品素材である *p*-クマル酸を用いて、その包接複合化条件を検討確立する。さらに動物試験により *p*-クマル酸の吸収率などを指標として、包接複合化合物からの解離条件を検討し、可溶化および安定化モデル系の構築を行う。一方、動物試験で得られた結果を基に、*-*グルカンの分子量や超分子構造における包接複合化条件に対する効果影響についても検討する。加えて安価で汎用性を高めるため、*-*グルカンの生産性向上についても菌株改良と培養条件の改良を含めて検討する。

3-1. グルカンの生産菌の改良とその精製 (1) *-*グルカン生産法(培養法)とその精製

オリジナル菌株である黒酵母菌 *Aureobasidium pullulans* K-1株(以後、K-1株と略す)を用いて、*-*グルカンの発酵生産性向上を指標に培養条件の検討を行った。

表1 培養培地組成

組成	濃度(%)
スクロース	4.0
硝酸ナトリウム	0.24
燐酸2カリウム	0.12
塩化カリウム	0.06
硫酸マグネシウム	0.05
硫酸鉄(1%溶液)	0.12
pHは塩酸でpH5.0に調整する。	

表1に示す組成を有するシード用の液体培地 100ml を 500ml 容量のバッフル付きフラスコに入れ、121℃で、15分間、加圧蒸気滅菌を行った後、供試菌株(K-1株および後述する変異株)を同培地組成のスラントより無菌的に1白金耳植菌し、130rpmの速度で好氣的に振とう攪拌しつつ、27℃で3~5日間培養することにより種培養液を調製した。

次に、表2のチャベック培地を基本とする本培養組成の培地 2L (pH3.7~4.0) を 3L 容量のジャーファーメンター培養装置(丸菱バイオエンジニア製)に入れ、121℃で、15分間、加圧蒸気滅菌し、上記のようにして得られた種培養液 100ml を無菌的に植菌し、500rpm、27℃、1L/minの通気攪拌培養を行った。主に、攪拌数や通気量を変えて溶存酸素の供給条件、および表2の培地成分に有機窒素源を添加する培地条件の検討により、*-*グルカンの生産性を確認した。

*-*グルカンの回収および精製は、菌体を適宜希釈後に菌体を遠心分離除去した後、その上清に最終濃度が 66%(v/v)となるように

エタノールを加えて多糖を沈殿させて回収した。適宜、66% (v/v) のエタノール水溶液で洗浄し、減圧乾燥させ粉末サンプルを精製 β -グルカンサンプルとした。多糖の定量は、イオン交換水に溶解し、フェノール硫酸法で定量した。また、簡易法として回転粘度計を用いて粘度測定を行った。

表2 培養培地組成

組成	濃度 (%)
スクロース	4.0-7.0
硝酸ナトリウム	0.24
燐酸2カリウム	0.12
塩化カリウム	0.06
硫酸マグネシウム	0.05
硫酸鉄 (1% 溶液)	0.12
アスコルビン酸	0.4
消泡剤	0.02
pH は pH4.0 に調整する。	

(2) β -グルカンの変性による高次構造の改変

得られた精製 β -グルカン (未変性 β -グルカン) を基本サンプルとして、高次構造を改変させた変性 β -グルカンの調製を行った。方法として、0.5-1.0M の水酸化ナトリウム溶液に β -グルカンを溶解し (2% (w/v)、pH 12 以上) 粘度が >10,000cP から 5-10cP 以下になるまで十分に攪拌し高次構造を破壊した (三重螺旋から一重螺旋への構造変化の指標)。その後クエン酸等の有機酸で中和して、再編成 β -グルカン (変性 β -グルカン) を調製し、その後の包接 (ホスト-ゲスト) 実験にホスト化合物として用いた。

(3) 黒酵母菌株の変異

黒酵母菌の変異は化学変異法あるいは物理的変異 (UV 変異および放射線変異) により行った。変異の目安は、種々の生存率を指標に行った。特に、産生 β -グルカンの生産性を高めるため、メラニン非産生株の取得を目標とした。すなわち、黒酵母菌は β -グルカンの培養産生時に、培養後半にメラニンを産生し、回収時の純度低下と関連がある。

3-2. p -クマル酸の溶解性の向上についての検討

黒酵母菌 K-1 株が生産する β -1,3-1,6-グルカンは、アゾ色素やシコニン等の難溶性化合物を可溶化させることが知られていた。そこで、機能性の解明とその利用技術の開発が期待されるが、水溶性の低い p -クマル酸および数種のヒドロキシ桂皮酸類を対象として、 β -グルカンの添加が、その溶解性に及ぼす影響について検討した。

(1) β -グルカンによる p -クマル酸の溶解性向上作用についての従来の分散剤との比較

β -グルカンによる p -クマル酸の溶解性向上作用についての検討に先立ち、難溶性化合物の分散剤としてしばしば用いられるサイクロデキストリン類と溶解性向上作用を比較検討した。K-1 株が生産する β -グルカンを前項で述べた方法で変性処理した変性 β -グルカンを使用した。0.2% の変性 β -グルカン水溶液あるいは 0.2% の β -サイクロデキストリン水溶液に、 p -クマル酸の結晶を終濃度が 0.2% となるように添加した。マグネティックスターラーで攪拌後、ソニケーション (40、10 分) を行い、さらに恒温震盪水槽にて 160rpm で震盪しながら、30 分間 60 に保った。その後、水浴 (30) 中で 30 分間放冷し、遠心分離により沈殿物を除き上清の p -クマル酸濃度を Folin-ciocalteu 法により測定した。

(2) β -グルカンによるヒドロキシ桂皮酸類の可溶化条件の検討

グルカンは、K-1 株および、メラニン非産生変異株 (以下、変異株) が生産するものを用い、必要に応じて前項で述べた変性処理を行った。

β -グルカンは、エタノール沈殿後に凍結乾燥したのを用い、水に懸濁させた後、加熱、攪拌し、コロイド溶液状になったものを β -グルカン溶液として使用した。ヒドロキシ桂皮酸類は、 p -クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸を用い、それぞれの MeOH 溶液と、あらかじめ 60 に保持した β -グルカン溶液を混和して懸濁状態とした。この懸濁液を 20 で 2 時間浸透攪拌した後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を希釈して、309nm の吸光度を測定し、それぞれの化合物の分子吸光係数からその濃度を求めた。

(3) 変性 β -グルカンと β -クリプトキサンチンの相互作用の検討

ヒドロキシケイ皮酸類以外の難溶性化合物の可溶化を検討する目的で、変性 β -グルカンと β -クリプトキサンチン (β -CRP) との相互作用を検討した。K-1 株由来の変性 β -グルカンを使用し、変性 β -グルカン飽和水溶液または β -サイクロデキストリン (β -CD) 水溶液 (18mg/mL) 2mL に β -CRP アセトン溶液 (1 μ g/ μ L) 100 μ L を添加し、2 時間半、超音波処理を行った後に、アセトン 2mL を添加して沈殿を形成させた。得られた沈殿は、遠心分離により上清を除き、窒素ガス気流下で乾燥させた後、75% アセトンで溶解し、遠心上清の 452nm の吸光度を測定し、分子吸光係数から沈殿に保持された β -CRP 量を求めた。

3-3. 動物モデル評価系の確立とその評価 マウスを用いた経口投与による p -クマル酸の吸収評価

ポリフェノール水溶液安定技術の評価方法のひとつとして、動物モデルによる吸収性を指標としたアッセイの構築を検討した。

実験動物として6~10週齢のWistar系雄性ラットを使用した。変性 β -グルカンを用いて、L-アルギニン添加による弱アルカリ処理または超音波処理により p -クマル酸を分散させてそれぞれの投与液を調製した。プロピレングリコールに p -クマル酸を溶解させたものをコントロールとして用いた。投与液中の p -クマル酸濃度は5mg/mL、投与量30mg/kg BW、各群4匹とした。代謝ケージを用い、投与後48時間までの尿を採取し、HPLCにより尿中に排泄された p -クマル酸を測定した。グルクロン酸または硫酸抱合された p -クマル酸は、 β -グルクロニダーゼ処理により、脱抱合した。

4. 研究成果

4-1. β -グルカンの生産性向上

(1) 培養条件による生産性の向上

チャベック培地に0.02%の極少量の酵母エキスを追加すること、KLaを低く調節することでその生産性は向上した(図1)。培養時間は5~7日を要し、 β -グルカン濃度1.5%(w/w)、粘度10,000cPに達した。

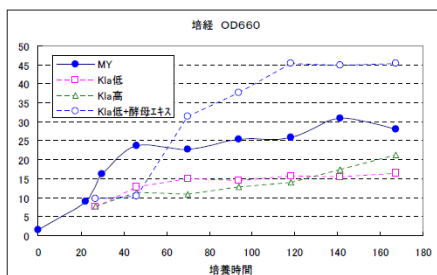


図1. β -グルカンの培養条件

シード培地は、初発2%とした。MYは、シード量を10%とした。

また、シュクロースの添加によりグルカンの生産量は増加し、変換量として10-15%と見積もられた。得られた β -グルカンは $^1\text{H-NMR}$ 解析で分析した結果、 β -1,3-1,6-構造を有することを確認した。

(2) 精製 β -グルカンの純度評価

媒沈殿、樹脂回収について検討した結果、除菌後の上清を60%(v/v)以上のエタノールで処理し β -グルカンを沈殿回収する方法が効果的であった。得られた β -グルカン純度は約13倍に精製された。なお純度は280nmの吸光度で評価した(図2)。さらに陰イオン交換樹脂で処理したところ、280nmの吸光度は半減した。N含量を元素分析したところ、エタノール沈殿精製処理で0.5%以下であることを確認した。この結果から、次の梅由来ポリフェノールの可溶性試験には、エタノール沈殿精製サンプルを用いた。

(3) 変異株の取得

K-1株の死滅率を指標に突然変異させることで、図3に示すようにメラニン非産生変異

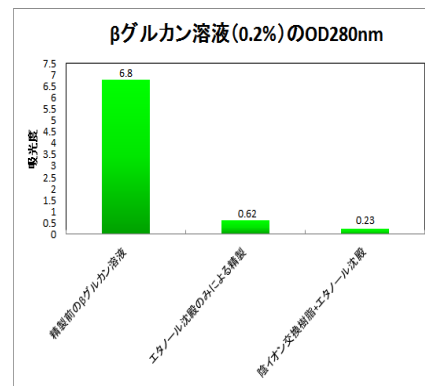


図2. β -グルカンの回収並びに純度評価

株1株を取得した。産生 β -グルカンをNMRで確認したところ、 β -1,3-1,6-グルカンであった。



図3. メラニン非産生株の取得

白色変異株を得た。コロニーを赤枠で示す。

培養生産条件も特に既述と同様の方法で高生産できることを確認した(図4)。この

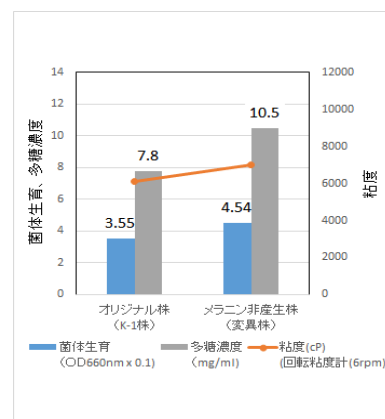


図4. 変異株(メラニン非産生株)の β -グルカン培養における生産性

結果、培養時にメラニン産生の懸念がないことから、高純度かつ工業的生産(マズプロダクション)の観点から差別化できる可能性が示唆された。

4-2. β -グルカンを用いた p -クマル酸の可溶性

(1) β -グルカンによる p -クマル酸の溶解性向上作用についての従来の分散剤との比較

図5に示すように、変性 β -グルカンあるいは、 α -サイクロデキストリンの0.2%水溶液は、*p*-クマル酸の溶解性を向上させた。変性 β -グルカンの作用には、サイクロデキストリンと有意な差は認められなかった。先行研究では、アルキルアミン存在下で変性 β -グルカンによる溶解性向上作用が高まる例が報告されているため、同条件で変性 β -グルカンについて、アルキルアミンの添加の影響を検討したところ、0.01%のアルギニンでは有意な溶解性の向上は認められなかったが、0.1%のグリシンにより、若干改善されることが示された（データは示さず）。

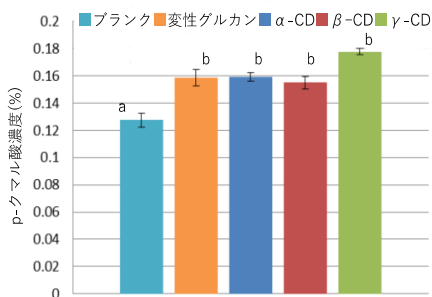


図5. 各種分散剤が *p*-クマル酸の溶解性に及ぼす影響

(2) β -グルカンによるヒドロキシ桂皮酸類の可溶化条件の検討

p-クマル酸の MeOH 溶液と β -グルカン水溶液を一定温度で混和することにより、溶解度を超える濃度の *p*-クマル酸溶液を調製可能な条件を設定した。

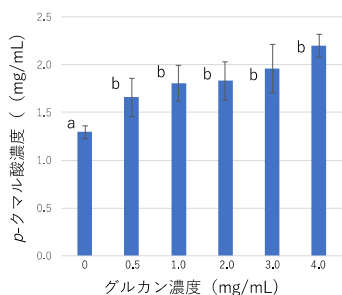


図6. グルカン濃度が調製液の *p*-クマル酸濃度に及ぼす影響 (β -グルカンとして K-1 株の変性 β -グルカンを使用)

図6に示すように調製液の *p*-クマル酸濃度はグルカン濃度に依存して上昇した。また、同条件でフェルラ酸およびカフェ酸の溶解性向上作用についても検討したところ、いずれも *p*-クマル酸を上回る溶解性の向上が認められた。特にカフェ酸では、その効果は顕著であり、溶解度の3倍程度の溶液を調製できた（図7）。本法により調製した *p*-クマル酸溶液を 30、10 日間保管したところ、*p*-

クマル酸濃度の大きな低下は見られなかった。

変性 β -グルカンでは最大 5mg/mL の水溶液を調製できたが、未変性 β -グルカンでは水溶液の粘度が高くなり、同濃度の水溶液を

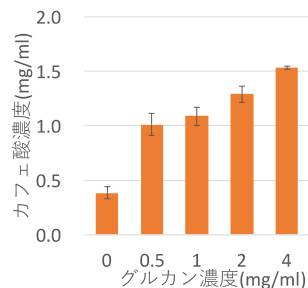


図7 グルカン濃度が調製液のカフェ酸濃度に及ぼす影響 (β -グルカンとして K-1 株の変性 β -グルカンを使用)

調製することが出来なかった。0.5~2mg/mL の範囲では、*p*-クマル酸の溶解性は変性 β -グルカンの方が高くなる傾向が認められた。

カフェ酸の溶解性向上について、生産株および変性操作の有無による影響を検討したところ、変性操作により影響を受けるものの、生産株の影響はほとんどなく、K-1 株、変異株のいずれの由来のものも共にほぼ同程度の作用を示した（図8）。

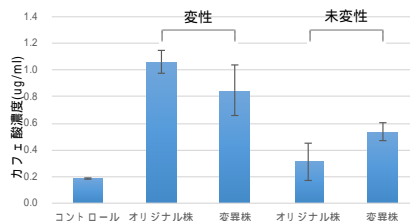


図8 β -グルカンの生産株および変性操作がカフェ酸濃度に及ぼす影響 (β -グルカン濃度は 2mg/mL とした)

次いで、可溶化した *p*-クマル酸の安定性に pH が及ぼす影響を確認するため、pH4.0 および 5.0、40 に 3 日間保持したところ、大きな減少は見られなかったが、pH5 の方が *p*-クマル酸の溶解度は高く、その溶解性は pH による影響を受けることが示された。

(3) 変性 β -グルカンと β -クリプトキサンチンの相互作用の検討

本研究で設定した条件により、 β -CRP は変性 β -グルカン及び β -CD に保持された。それぞれの単位重量当たりの保持量を比較すると、変性 β -グルカンへの保持は β -CD の約 4 倍であった（表3）。

表3 -クリプトキサンチン保持量の比較

	変性グルカン	-CD
沈殿への -CRP保持量 (nmol)	193	174
担体溶液中の糖濃度 (mg/mL)	3.8	14.8
担体単位重量当たりの -CRP保持量 (μmol/g)	5.1	1.2

4-3. 動物を用いた経口評価法の確立

変性 β -グルカンを用い、アルカリ処理または超音波処理により p -クマル酸分散液を調製し、ラットに投与して吸収性や薬物代謝への影響を評価した。尿中排泄 p -クマル酸は、投与後 24 時間以降は検出されなかったため、24 時間までに尿中に回収された p -クマル酸（代謝物含む）について解析した。超音波処理 β -グルカン群、アルカリ処理 β -グルカン群からの p -クマル酸尿中排泄率（投与量を 100% とする）は、それぞれ $31.9 \pm 4.3\%$ 、 $42.8 \pm 2.1\%$ （平均 \pm 標準誤差）であり、コントロールであるプロピレングリコール群の $37.3 \pm 2.1\%$ に対して、有意な差は認められなかった。（図 9）また、投与後 7 時間

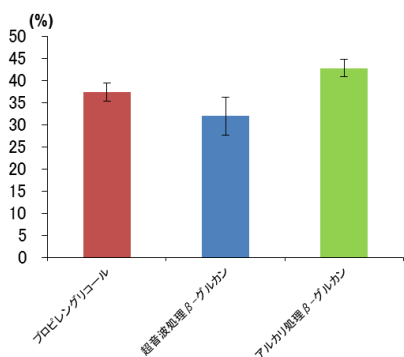


図 9 . p -クマル酸尿中回収率
（投与後 24 時間まで、代謝物含む）

までの尿中排泄量および投与後 7~24 時間までの排泄量についても解析したが、いずれの群も同様のパターンを示し、差は認められなかった（データ示さず）。したがって、 β -グルカンによる消化管内での吸収遅延などの影響は認められないものと考えられた。

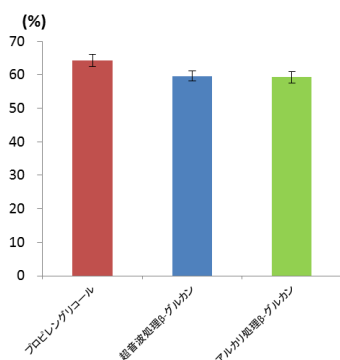


図 10 . 尿中排泄 p -クマル酸に占める代謝物の割合

尿中に排泄された p -クマル酸に占める代謝物の割合を解析したところ、超音波処理 β -グルカン群、アルカリ処理 β -グルカン群、プロピレングリコール群（コントロール）それぞれ $59.6 \pm 1.5\%$ 、 $59.2 \pm 1.6\%$ 、 $64.2 \pm 1.9\%$ （平均 \pm 標準誤差）であり、コントロール群がやや高い値を示したものの、有意な差は認められなかった。（図 10）

以上の結果より、変性 β -グルカンにより分散させた p -クマル酸は、プロピレングリコールに溶解させたものと同様の挙動を示すことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

堀西朝子¹、鈴木利雄²、尾崎嘉彦¹
（¹近畿大学 生物理工学部・²大阪市立大学大学院工学研究科）、「**変性 β -グルカンを用いたヒドロキシ桂皮酸類の溶解性向上の試み**」、日本食品保蔵科学会第 66 回大会、2017 年 6 月 25 日（発表予定）高知県立大学永国寺キャンパス（高知市永国寺町 2 番 22 号）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：**メラニン色素非産生の β -グルカン産生菌、その人工的製造方法、およびそれを利用して産生した β -グルカンの生産方法**

発明者：鈴木利雄、北村憲司

権利者：鈴木利雄

種類：特許

番号：特願 2016-122182

出願年月日：2016 年 6 月 20 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者：

鈴木 利雄 (SUZUKI TOSHIO)

大阪市立大学・大学院工学研究科・客員教授
研究者番号：80511310

(2)研究分担者

尾崎 嘉彦 (OZAKI YOSHIHIKO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：00455312

(3)研究分担者

岸田 邦博 (KISHIDA KUNIHIRO)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：30412703