

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580184

研究課題名（和文） マキネッタ抽出法による水可溶性 β -1, 3 グルカンの抽出

研究課題名（英文） Extraction of water soluble beta-1,3 glucan with a Macchinetta extractor

研究代表者

重松 幹二 (SHIGEMATSU MIKIJI)

福岡大学・工学部・教授

研究者番号：00242743

研究成果の概要（和文）：

菌糸体から水可溶性の β -グルカンを抽出するために、マキネッタ抽出器の適用を検討した。その結果、漢方薬として用いられるブクリョウや各種食用キノコから効率良く β -グルカンを抽出することができた。また、カンゾウからグリチルリチン酸、オウレンやオウバクからベルベリン、樹木樹皮からタンニンを抽出することもできた。これら抽出液の活性は高く、特にブナシメジからの β -グルカンは高い抗腫瘍活性を有していた。

研究成果の概要（英文）：

To obtain a water soluble β -glucan, the application of a Macchinetta extractor was investigated. As a result, the water soluble β -glucan was extracted efficiently from a tuckahoe and various edible funguses. As the other applications, tannin from tree barks, glycyrrhizinic acid from a licorice, and berberine from a coptis rhizome and a phellodendron bark, were also efficiently extracted. The bio-activities of these extracts were high. Especially, β -glucan extracted from bunashimeji (*Hypsizygus marmoreus*) had a high antitumor activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：バイオマス利用

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード： β グルカン、マキネッタ抽出法、抗腫瘍活性、ブクリョウ、食用キノコ、グリチルリチン酸、ベルベリン、タンニン

1. 研究開始当初の背景

キノコなどの菌体には抗腫瘍活性に富む多糖類である β -1,3 グルカンが多く含まれている。しかしそれはアルカリ水溶液やジメチルスルホキシドには可溶であるが、高い重合度と強固な三重らせん結晶のため水に難溶である。そこで、低分子化や化学修飾など

で水に可溶化させる方法が広く検討されている。

多糖類を低分子化するには酸加水分解が簡便で有効であるが、ランダムな分解のため不活性な単糖にまで分解することが多く、オリゴ糖で選択的に止めることが困難である。多糖類を低分子化させるもう一つの方法と

して、高温高压の水である亜臨界水や超臨界水を用いた分解法がある。薬品を用いないため安全な方法であるが、酸加水分解法と同様にオリゴ糖で分解を止めることが困難である。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、高温高压水蒸気に対する多糖類の分解反応を検討してきた。その過程で、 β -1,3 グルカンオリゴ糖程度に低分子化するには短時間の水蒸気（あるいは亜臨界水）処理が適切であると考えた。

そこで本研究では、エスプレッソコーヒーを抽出するために用いられるマキネッタ抽出法の適用を検討した。ドリップ式のコーヒーメーカーは大気圧下での開放系のため抽出温度は 100℃以下であるが、マキネッタ法ではボイラータンクが密閉状態であるため高压状態となり、水温を 100℃以上にすることができる。また、抽出後は速やかに大気圧下に放出されるため 100℃以下に冷却され、過度の分解を抑えることができる。

3. 研究の方法

マキネッタ抽出法の原理を図1に示す。ボイラーで発生した水蒸気はその圧力によって連結管中の水を押し上げる。伝統的マキネッタ抽出では粉末試料は試料容器内の金網上に圧搾充填されており、それ自体が圧力保持体として作用することで系内は高压状態に保たれる。

本研究では表1に示す市販のエスプレッソコーヒー用マキネッタ抽出器を用いて、生薬などからの有効成分の抽出を試みた。

まず、マキネッタ抽出器の反応装置としての特性を、その温度・圧力測定によって明確にした。圧力保持能力は粉末試料の充填状態で決定され、圧力が保持できないと目標とする高压高温水を得ることができない。そこで、チャネリングの発生を抑えるために、各種濾

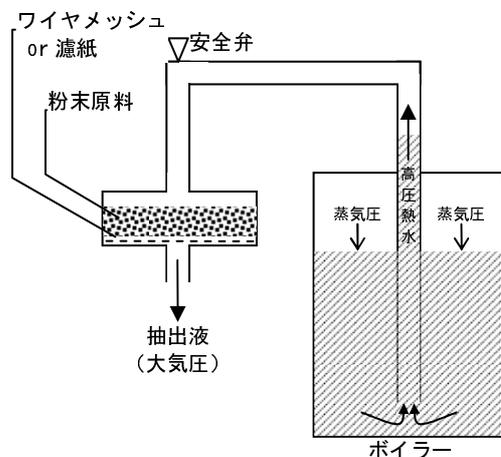


図1 マキネッタ抽出器の作用機構

表1 本研究で使ったマキネッタ抽出器

形式	特徴
Electrolux 製 EP930 (スウェーデン)	水蒸気式エスプレッソコーヒーマシンの基本機能を持つ。
DeLonghi 製 EMK6 (ドイツ)	伝統的マキネッタ抽出器を電気加熱式にしたもの。下部から上部に向かって高温水が試料中を通過する。
la pavoni 製 V120 (イタリア)	手動のプレス機で粉体試料部分を圧搾する機能を併せ持つ。

紙を出口部に装着し、その圧力保持能も検討した。

続いて、マキネッタ抽出器の特徴を活かした β -1,3 グルカン抽出を検討した。評価項目は、抽出量、全糖濃度、 β -1,3 グルカン濃度、分子量、単糖であるグルコース量などである。

抽出挙動が明らかになった後、様々な食用キノコを原料として抽出液を得、抗腫瘍活性データを得た。さらには、グリチルチリン酸、ベルベリン、タンニンなどの抽出にも適用可能であるか検討した。

4. 研究成果

(1) ブクリョウからの β グルカンの抽出

主成分が β グルカンであるブクリョウ（茯苓）は、漢方薬として煎じて処方されている。そこでまず、マキネッタ抽出の常法である、粉末試料の圧搾のみでの抽出を試みた。抽出液の全糖量をフェノール硫酸法により、高分子量 β グルカン量はアニリンブルーを発色剤とした蛍光発色法（励起 398nm、蛍光 502nm）により求めた。さらに、単糖にまで低分子化したグルコース量は HPLC により定量した。

表2は、各種マキネッタ抽出と、比較のためのソックスレー抽出の結果を示す。いずれのマキネッタ抽出器も、ソックスレー抽出に比べ全糖収率、全糖濃度が高く、効果的に抽出されていることが分かった。

次に全糖収率および全糖濃度が高い値を示した EP930 を用い、抽出温度の影響を検討した。この実験では、充填量によって圧力保

表2 各種抽出器によるブクリョウからの可溶性糖の抽出

	抽出温度 [°C]	全糖濃度 [g/L]	全糖収率 [wt%]
ソックスレー	100	0.4	0.3
EP930	135	3.5	1.2
EMK6	125	1.8	1.1
V120	122	5.2	0.9

※マキネッタ抽出は粉末圧搾充填法を適用

持能を変化させることにより抽出温度を変化させた。その結果、抽出温度の上昇に伴って、全糖量、高分子量βグルカン濃度、全糖量に占めるβグルカン含有率（即ち選択率）が高くなる傾向があった。しかし、142℃では全糖量に占めるβグルカン選択率が低下した。これは、温度が上がりにすぎたために過度の分解が生じたことが考えられる。

(2) 濾紙による圧力保持と温度上昇効果

これまで述べた方法では、粉体自体に圧力保持能を持たせた伝統的マキネッタ抽出法を適用したが、抽出時の温度のコントロールが困難で、チャネリングがしばしば発生した。特に、少量の試料では圧力保持ができなため、抽出には全く適用できなかった。そこで、粉体試料の下部に濾紙を敷き、濾紙を圧力保持体として作用させることを検討した。

その結果、濾紙の種類によって最高到達温度をコントロールすることができ、枚数を増やすことでさらに抽出温度を上昇させることもできた。最も高い水温を示したのは、東洋濾紙製の硬質濾紙 No. 4A であった。

濾紙 No. 4A を併用したマキネッタ抽出器によるブクリョウからのβグルカン抽出の結果、原料約1gからでもチャネリングを起こさず良好に抽出できた。また、濾紙に加えて粉末試料自体の圧力保持能が加わるため、最高到達温度は150℃まで上昇した。少量の粉末原料からも抽出可能となったため、抽出率が約60%と飛躍的に向上し、濃縮操作を行わずに10g/L以上の高濃度のβグルカン水溶液を得ることができた。

(3) 食用キノコからのβグルカンの抽出と、その抗腫瘍活性

キノコなどの菌体には抗腫瘍活性を有する多糖類であるβグルカン（β-1,3, β-1,6グルカン）が多く含まれている。そこで、食用キノコであるエリンギ、ブナシメジ、シイタケからのβグルカン抽出を検討した。これらのキノコには、ブクリョウよりも含有量は

表3 食用キノコからのマキネッタ抽出法によるβグルカンの抽出

試料	充填量 [g]	濃度 [g/L]	収率 [%]	温度 [°C]
ブクリョウ	0.9	16.8	61	150
ウ	5.2	15.2	16	
ブナシメジ	1.1	5.6	26	143
ジ	5.1	12.5	14	
エリンギ	1.1	5.1	24	145
	5.2	12.0	13	
シイタケ	1.0	4.9	24	140
	5.2	8.1	9	

※EP930, 濾紙 No. 4A を1枚使用

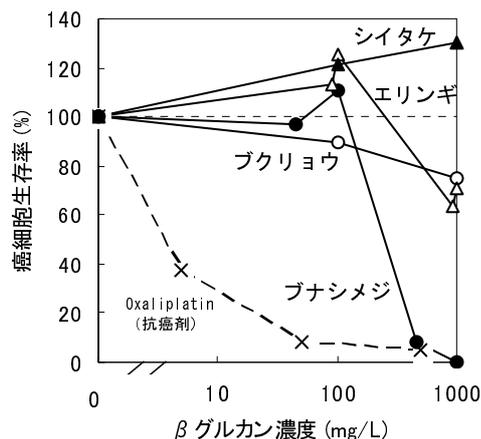


図2 マキネッタ法による食用キノコ抽出液のヒト結腸癌細胞(Caco-2)生存率への影響

低い約25%のβグルカンが含まれている。

EP930に濾紙 No. 4A を併用して抽出した結果を表3に示す。いずれのキノコからもβグルカンを高収率で抽出することができた。充填量を多くすると収率は低下するが、より高濃度の抽出液を得ることができた。なお、ブクリョウからの抽出物の分子量をGPCで測定したところ、PEG換算で2~5万の高分子体であった。

続いて、βグルカンの抗腫瘍活性を検討した。結果を図2に示す。ブクリョウを原料とした場合、その抽出液の抗腫瘍活性は市販のβグルカンと大差ないものであった。しかし、ブナシメジからの抽出液は、βグルカン濃度400mg/Lでヒト結腸癌細胞(Caco-2)の90%を、1000mg/Lでは100%死滅させる抗腫瘍活性が確認された。また、それより弱い、エリンギからの抽出液にも活性が見られた。これらの高い活性は、タンパク質成分あるいは抗酸化物質の分解が抑えられたまま抽出されたためと推定される。この溶液活性は、抗がん剤であるoxaliplatinよりは弱いものの、漢方薬として処方されるブクリョウからの抽出液より強いものであった。なお、シイタケ抽出液には活性は見られなかった。

本方法は、一般家庭でも使用できる極めて簡易な機構の抽出装置を用いており、装置の安全性は高い。さらには原料が食品であるため薬事法に抵触せず、本来食品であるため過剰摂取による副作用も少ないものと期待できる。

(4) カンゾウからのグリチルリチン酸の抽出

グリチルリチン酸はカンゾウ(甘草)の根に含まれる天然の有効成分で、その甘みから

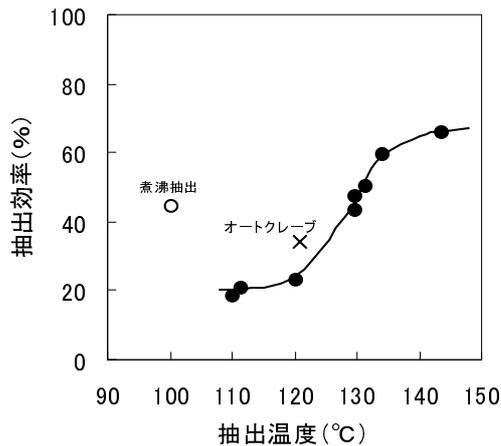


図3 マキネッタ法によるカンゾウからのグリチルリチン酸の抽出

様々な食品に利用されている。そこで、マキネッタ抽出の効果を検討した。グリチルリチン酸の抽出量は、日本薬局方によって HPLC を用いて求めた。また、温度 120°C、保持時間 10 分でのオートクレーブ加熱による抽出、沸騰水で 20 分程度煎じて抽出する方法も比較のため行った。

グリチルリチン酸抽出収率を図3に示す。ここで収率は薬局方によって求めた原料中のグリチルリチン酸含有量を基準として表示している。抽出温度は濾紙の種類や枚数によって変化させた。抽出率は 110°C から 143°C の範囲において温度が上昇するにつれて増加する傾向にあり、特に 120°C から 135°C の間で大きな上昇効果がみられた。135°C を超えたあたりから増加量は小さくなっているが、これは温度の上昇に伴いグリチルリチン酸の分解が併発したのではないかと思われる。他の抽出法と比較すると、マキネッタ法では 130°C 以上の抽出温度で他の抽出法よりも高い抽出効率を得た。

以上の結果から、カンゾウからのグリチルリチン酸抽出に対して、濾紙を併用したマキネッタ抽出法は簡便に短時間で効率的な抽出が可能な抽出法であると言える。

(5) オウレン、オウバクからのベルベリンの抽出

オウバク（黄柏）はミカン科の植物でキハダの樹皮であり、オウレン（黄連）はキンポウゲ科の植物でシナ黄連の根茎をとり乾燥したものである。この二つの生薬の主成分であるベルベリンは各種グラム陽性菌、陰性菌に幅広く抗菌作用を示す。そこで、これらからのベルベリン抽出に対して、マキネッタ法の効果を検討した。

V120 を使用し、濾紙は用いず、粉体自体を圧力保持体として繰り返し抽出を行ったと

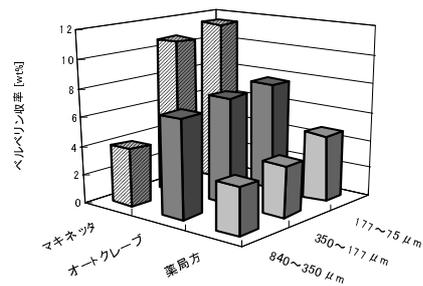


図4 各種抽出法によるオウバクからのベルベリン収率

ころ、最初の3回の抽出で全抽出量の半分以上が抽出された。また、試料の粒径が細くなるにつれ、抽出率が高くなった。

オウバクを例として、各抽出法の比較を図4に示す。マキネッタ法による抽出は、薬局方と比較すると抽出率が3倍近く高い。したがってマキネッタ法による抽出は高抽出率で時間も短縮できるため、効率的な抽出法であると結論づけられる。特に効率的な抽出が難しいことが多い木本類（ここではオウバク）に対して、マキネッタ抽出法は効果的であった。

一方で、ベルベリンは高温水蒸気抽出過程でベルベリノール、ベルランピンへと熱変性すると考えられている。そこで、連続式高温高圧管型反応装置を用いベルベリン溶液の熱変性反応を検討した。

その結果、140°Cにおいて変化は見られず、180°C~260°Cにおいて一次反応的にベルベリンの回収率が低下した。また 260°C 以上の高温では約 20 分でベルベリンは全て分解した。ベルベリンの熱変性は 140°C 程度では無視できるほどであり、マキネッタ抽出では抽出時間も短いことから、熱分解は無視できるものと結論付けられる。

続いて、高温処理した溶液の抗菌活性作用を、枯草菌を使用して確認した。ベルベリン共存下で培養後のコロニー数を測定したところ、温度や処理時間を変化させても無処理ベルベリンと同程度の抗菌活性を有していた。このことから、熱変性しても抗菌活性は持続しているといえる。

(6) 樹皮からのタンニンの抽出とそのタンパク質吸着能および抗菌作用

タンニンは、茶、ワイン、柿などに含まれる植物由来のポリフェノールの総称である。タンパク質や金属イオンの吸着特性があり、

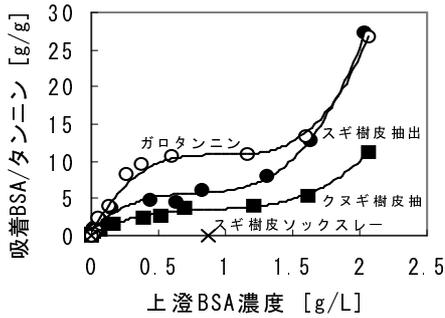


図5 マキネッタ抽出タンニン-タンパク質 (BSA)吸着等温線

皮をなめしたり抗菌処理に使われている。樹木の樹皮に含まれるタンニンは縮合型高分子のため水に不溶で利用しにくい。今回マキネッタ抽出法が高温高圧かつ短時間で抽出可能であるため、高タンニン活性を有する水溶液の製造を検討した。

まず、クヌギ樹皮の粉末から、圧力保持体である濾紙の枚数により抽出温度をコントロールしてマキネッタ抽出を行った。その結果、抽出温度を上げることにより、抽出収率は低下した。これは、短時間ではあるが、高温抽出によってタンニン自体が縮合あるいは凝集して水に不溶となったためと考えられる。

続いて、スギおよびクヌギ樹皮の粉末から、約 127°C でマキネッタ抽出し、溶液を適宜希釈後、タンパク質である牛血清アルブミン (BSA) 水溶液に加えてタンパク質-タンニン複合体を沈殿させた。上澄み液に含まれる BSA 濃度を Bradford 法で測定して、吸着した BSA 量を求めた。

得られた抽出液の BSA に対する吸着等温線を図5に示す。いずれの抽出液でも吸着等温線は S 字カーブを示し、Langmuir 型ではなく BET 型に類似した吸着挙動を示した。市販ガロタンニンと比較した場合、低 BSA 濃度領域では吸着量がやや劣るものの、高 BSA 濃度領域では高いタンパク質沈殿能を有していた。また、広葉樹であるクヌギよりも、針葉樹であるスギからの抽出液が高い活性を示した。なお、ソックスレーによって得られた抽出液には、タンパク質吸着能はほとんど見られなかった。

通常、BET 吸着は固体と不活性気体の吸着に多く見られ、固液系では希である。今回の結果は、沈殿物同士の凝集作用や吸着サイトの不均質などの要因が考えられる。本方法により、これまでほとんど利用されていなかったスギの樹皮から有効成分を得ることができると期待される。

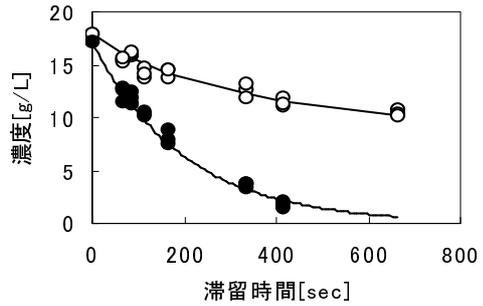


図6 亜臨界水 (220°C, 20MPa) によるグルコース (○) およびセロビオース (●) の分解挙動

次に、タンニン水溶液の抗菌活性を調べた。ここでは、V120 マキネッタ抽出器によりスギ樹皮から約 120°C で抽出液を得た。続いて黄色ブドウ球菌の懸濁液とタンニン抽出液を混合し、培養後コロニー数を計測した。

その結果、約 5~8 g/L のタンニン濃度において黄色ブドウ球菌が死滅した。これより、未利用で安価なスギ樹皮より、抗菌活性を有する成分が抽出可能であることがわかった。

(7) 糖類の熱分解挙動

高温熱水抽出における糖類の熱分解の挙動を理解するため、亜臨界水による熱分解挙動を速度論的に解析した。

まず、グルコースあるいはセロビオース水溶液を連続式亜臨界水分解装置で処理し、得られた反応液中の濃度を HPLC で測定した。結果を図6に示す。セロビオースの分解と比べて、グルコースの分解は起こりにくい。セロビオースの分解は加水分解が主で、グルコースは熱分解が生じる。総じて、加水分解は容易に起きるが、熱分解は比較的緩慢であると言える。なお、両者とも熱変性生成物であるフルクトースが僅かに生成することが確認された。

セロビオースの加水分解反応は 1 次反応として解析可能であったが、グルコースの分解反応は、当初の予想および多くの文献での解析で採用されている一次反応では解析できなかった。そこで、n 次の積分型速度式に当てはめて反応次数を求めた。

その結果、220°C と 200°C では 3.5 次反応、180°C では 2.8 次反応と算出された。グルコースの分解が 1 次反応ではないことは、分解率が初期濃度に強く依存することを意味する。あるいは、ある濃度まで分解が進むと、それからは分解の進行が抑えられることとなる。

一方、220°C 一定での圧力依存性については、僅かではあるが 20MPa で最も分解を抑え

られることがわかった。これは、圧力によるモル体積や水のイオン積の変化などが影響しているものと考えられる。

糖類の水溶液中での熱分解について以上の結果が得られたが、総じてマキネッタ抽出法で適用される 150℃程度までの温度範囲や数分程度の抽出時間では、糖類の分解は無視しうる程度であると結論付けられる。

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 2 件)

- ① Shigematsu M, Chuman R, Mizuki Y, Masamoto H: Application of a macchinetta extractor to solubilize β -1,3 glucan in water: Transactions of the Materials Research Society of Japan, 査読有, 33, 1189-1192 (2008)
- ② 正本博士、高田雅子、永田和周、重松幹二: ニューラルネットワーク解析法による亜臨界水中でのマルトース加水分解反応の最適化: Journal of Computer Chemistry, Japan, 査読有, 7, 171-178 (2008)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ohashi D, Yamada H, Doumen M, Masamoto H, Shigematsu M: Application of a macchinetta extractor to the effective extraction of various natural constituents: The 23rd International Symposium on Chemical Engineering (Fukuoka) PF-08 (2010. 12. 4)
- ② 大橋大、馬場康徳、山口真幸、重松幹二、正本博士、大賀祥治、亀井一郎: マキネッタ抽出法を用いた菌糸体からの水可溶性 β -1,3 グルカン抽出: 第 17 回日本木材学会九州支部大会 (福岡) p. 45-46 (2010. 8. 31)
- ③ 伊藤義隆、北岡秀和、山田篤史、正本博士、重松幹二: 亜臨界水におけるセロビオース及びバイオマスの加水分解と熱変性: 第 60 回日本木材学会大会 (宮崎) PP009 (2010. 3. 17)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 幹二 (SHIGEMATSU MIKIJI)
福岡大学・工学部・教授
研究者番号: 00242743

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大賀 祥治 (OHGA SHOJI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 60117075

正本 博士 (MASAMOTO HIROSHI)
福岡大学・工学部・助教
研究者番号: 30122740

(4) 研究協力者

三島 健一 (MISHIMA KENICHI)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00320309

亀井 一郎 (KAMEI ICHIRO)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号: 90526526