

平成 24 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「菌類バイオマス残渣からの高付加価値脂質とグルカンの回収」

研究開発成果等報告書

平成 25 年 3 月

委託元 東北経済産業局

委託先 国立大学法人東北大学 未来科学技術共同研究センター

目次

第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	10
1-3 成果概要	11
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	13
第2章 平成22年度研究成果	14
① 脂質成分抽出法の開発	14
①-1 糸状菌由来の有用脂質抽出開発	14
①-2 ブナシメジ由来の有用成分の抽出、同定	14
①-3 廃棄担子菌より脂質成分の抽出法の開発	14
② 廃棄菌体（担子菌・糸状菌）よりのグルカン成分の抽出開発	15
②-1 アルカリ抽出法による検討	15
②-2 グルカン類の高純度化と高付加価値化	16
②-3 グルカン類の量産抽出技術	18
③ 素材機能・評価・食品安全データ	20
③-1 健康サプリメント等の機能性食品向け安全性データ	20
③-2 抽出グルカンおよび脂質の機能性評価	21
④ 成果発表報告	22
第3章 今後の進め方	23
3-1 継続研究について	23
3-2 事業化へ向けた取組	23

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1) 研究開発の背景・研究の目的

本研究開発では、発酵、分離精製、酵素処理に関わる技術を駆使して、菌類バイオマス残渣から数百倍以上に付加価値を高めた新素材を開発し、健康サプリメント市場、医療技術開発用の試験研究素材市場に提供する。菌体残渣より、機能性ステロール・セラミド等の脂質、菌体細胞壁成分であるグルカン類(α -1, 3-及び β -1, 3-)をカスケード的に分離高純度化する方法を開発し、産物の活性研究を通じて新規商材を開発することを目的とする。

2) 研究の概要

国内の発酵醸造過程・食品加工過程において、麹菌や酵母菌体・担子菌菌体（石付きなどの非可食部）が整腸剤や栄養剤、食品添加物などへの菌体一部の利用を除いて（例：エビオス、ワカモト、酵母エキス・酵素剤など）、廃棄されており、有効利用・高度利用が進んでいないのが現状である。本研究開発では、残渣菌体より機能性脂質およびグルカン類を高度に分離精製して、川下産業に向けた供給を目指す。

また、岐阜セラック製造所では、食用の糸状菌・担子菌菌体から酵素の抽出をおこない、製造販売を行ってきた過程で、酵素の抽出後の残渣である菌体を大量に産業廃棄物として排出していた。本研究開発では、新たに残渣である菌体より、更に高付加価値で有用な成分を抽出生産することを目指す。

これまでの予備的検討から、残渣菌体には、ステロール、セラミドなどの機能性脂質と細胞壁成分であるグルカンが残っていることが明らかになっている。これらの機能性脂質成分およびグルカン類をエタノール及びヘキサンを利用した有機溶媒抽出法、及びカラム精製法を利用して有用な脂質画分を分離精製する。平行して脂質画分についての生理活性を評価し、川下産業となっている食品・健康サプリメント産業および医療研究開発産業に素材として供給・販売できる開発を行う（図1）。

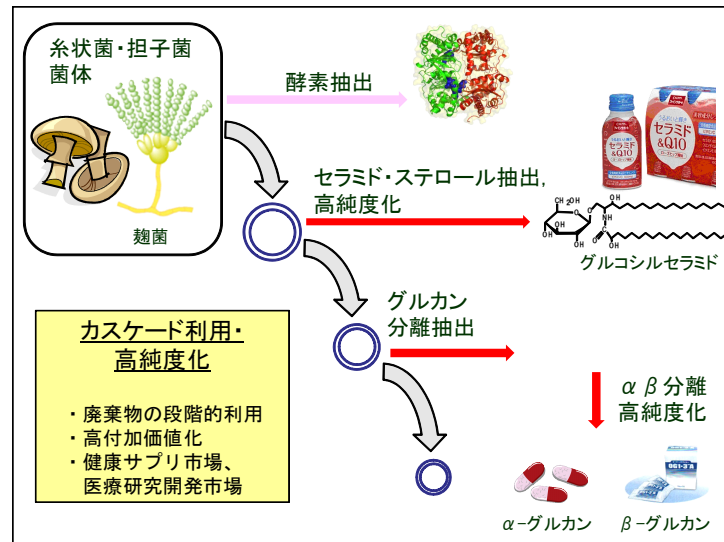


図1. 真菌バイオマス残渣（糸状菌, 担子菌）の高度機能の利用開発

具体的には以下の項目に関して、研究開発を進め、図2のフローを完成させる。

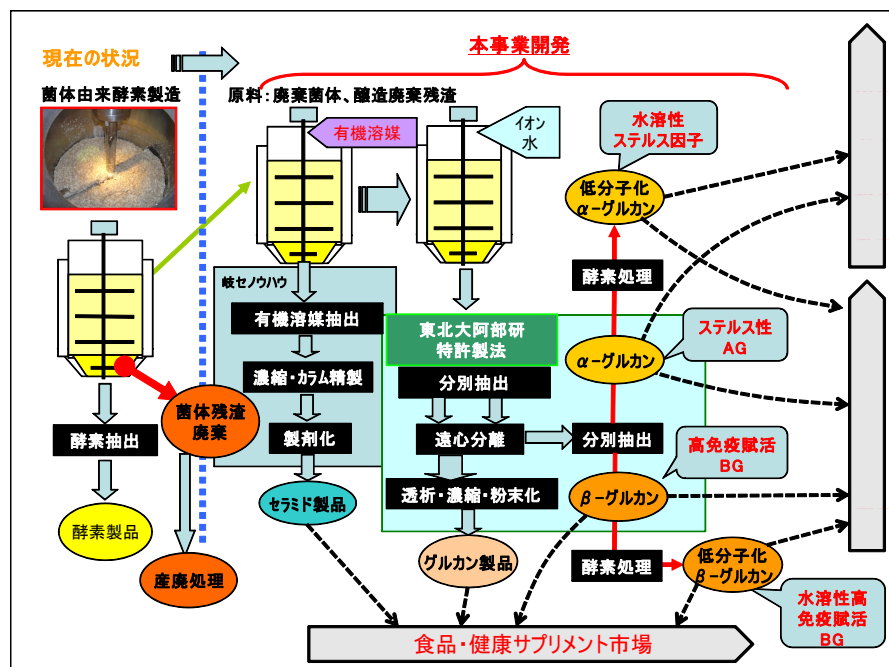


図2. 真菌バイオマス残渣よりの機能性脂質、グルカンのカスケード分離工業フロー

3) 実施内容

①脂質成分抽出法の開発

以下の3項目を実施した。

①-1 廃棄糸状菌より脂質成分の抽出法の開発

- ・東北地区及び東北地区以外での菌体残渣を排出している地区の調査を継続し、菌体バイオマスの原料調査を行う。
- ・実際に得られる菌体バイオマスについてラボ抽出実験を平成23年度と同様に継続し、各々実験から中性脂質画分（セラミド類，ステロール類）を含有したラボスケールでのエキスを得る。
- ・得られた脂質画分の定性分析を継続して実施する。得られた脂質画分の定性分析を LC/MS/MS を用いて行う。

①-2 廃棄担子菌より脂質成分の抽出法の開発

- ・担子菌菌体残渣（きのこ類）で資源調査を実施した中で、東北地区から産するナメコ菌体残渣などについて、エタノール、アルカリ性エタノール、酢酸エチル、ヘキサンなどの抽出溶媒を用いて脂質類を抽出するラボ実験を継続して実施しラボスケールでの粗抽出物を得る。評価分析を継続して実施する。
- ・中性脂質画分（セラミド類，ステロール類含有）を目標とした分画を得て、脂質画分の定性分析を行う。

①-3 ①-1～①-2 の量産技術の開発

- ・成分抽出検討、予備生理活性検討を実施したブナシメジ残渣、ナメコ残渣（担子菌菌体バイオマス）について菌体バイオマスを使用して量産試験抽出を実施する。抽出精製方法は本研究開発期間中に開発したプロセスプロトコルを用いて行う。
- ・また、糸状菌菌体バイオマスとして麴菌残渣の量産試験抽出を1回実施する。これらで得られた担子菌、糸状菌からの脂質抽出物の継続の生理活性、追試生理活性試験を試験するサンプルに供すると共に、市場での素材提案できる製品サンプルの作成を行う。

②グルカン成分抽出条件の検討

糸状菌・担子菌の細胞壁は α -1,3-グルカン[AG]、 β -1,3-グルカン[BG]、キチンの混合物である。国立大学法人東北大学阿部研究室は、糸状菌菌体成分に多量の新規グルカンとしてAGを見出し、段階的アルカリ抽出法を用いた精製AGと精製BG

の物質特許および製造特許を有し、実験室規模でのグルカン類分離基礎技術は確立していた(阿部ら 特許 4595074)。この特許法を最適化して AG の回収率をさらに向上させる方法の開発を行なって、目標の回収率を達成した。また本法を担子菌に適用し、AG・BG 分離精製が可能であることも確認した。更に、亜臨界水抽出法によるグルカンの抽出を試み、AG・BG 分離精製条件を確立した。

以下の 3 項目を実施した。

②-1 廃棄糸状菌よりグルカン成分の抽出条件の検討

- ・ 確立した改良法を適用し、脂質抽出後の菌体を原料としてグルカンを抽出し、高効率にグルカンを回収する。
- ・ 工業規模生産に適する透析効率を有する濾過システムを評価して、ラボプロセス条件を確立する。

②-2 廃棄担子菌よりグルカン成分の抽出条件の検討

- ・ 脂質抽出後の菌体を原料として、確立した改良法を適用し高効率にグルカンを回収する。
- ・ アルカリ改良法での工業化検討を用いてラボプロセス及びパイロットスケールでの試験生産を継続する。

②-3 ②-1, ②-2 の量産技術の開発

- ・ 量産スケールでグルカンの抽出を脂質抽出後の担子菌残渣を用いて実施する。抽出したグルカン類を本試験中に確立した濾過システムを使用して透析・脱塩実験を行い、多糖の分離率と透析率を評価する。

③ α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカン (BG) の高純度分離精製技術の開発

市場における糸状菌・担子菌のグルカン類は、 α -1, 3-グルカン (AG) と β -1, 3-グルカン (BG) の混合物であり、動植物の免疫刺激の点で夫々が相反する機能を有することから商材により活性が一定していなかった。すなわち AG には免疫刺激活性が無く、BG 本体には強い免疫刺激活性がある。そのため、BG への AG 混入率を減らすと、BG の免疫刺激活性が高まる。高純度 AG は免疫刺激の無いステルス素材として需要がある。

東北大特許製造法の改良法から得られた AG, BG について、混入多糖に対する分解酵素を用いた高純度化を行い、糖質分析装置による糖分析ならびに NMR 法により、高純度を確認した。また亜臨界水抽出を用いたグルカン溶解条件を確立し、流通式亜臨界水抽出での工業化スケールの溶解条件を確立した。

以下の 3 項目を実施した。

③-1 糸状菌抽出グルカンよりの α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカン (BG) の高純度分離精製技術の開発 (実験室規模)

- ・ 可溶性画分の濾過システムの条件検討の継続・最適化。
- ・ AG および BG 画分の混入多糖に対する分解酵素を用いた高純度化を継続する。
- ・ 純度検定：抗体法および NMR 法、糖質分析装置を用いて純度を決定する。

③-2 廃棄担子菌グルカンよりの α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカンの高純度分離精製技術の開発 (実験室規模)

- ・ 可溶性画分の濾過システムの条件検討の継続・最適化。
- ・ AG および BG 画分の混入多糖に対する高純度化を継続する。
- ・ 純度検定：抗体法および NMR 法、糖質分析装置を用いて純度を決定する。

③-3 ③-1, ③-2 の量産技術の開発

- ・ 脂質抽出後の糸状菌残渣及び担子菌残渣を出発材料として、量産規模でグルカンの抽出を実施する。

最終目標となる工業化スケール生産での高純度分離グルカン精製達成に向けて、実験室規模、パイロット規模での高純度を達成する。ここで確立した抽出法を工業化スケール生産での分離グルカン精製に適用し、グルカンの高純度精製を確認する。

④精製グルカンの低分子化による水溶性化と高機能化

③において得られる高純度高分子 AG、BG は共に分子質量 7 ～ 30 万の水不溶性である。AG、BG の機能性を維持したまま低分子化することが可能になれば、生体吸収性、均一溶液状態での反応性を高めて工業剤としての付加価値が高まる。AG、BG は分子量 5,000 以下 (DP 30 以下) で一般に水溶性が高まると考えられる。

そこで、弱酸分解、酵素分解、亜臨界水処理等を組み合わせて分子質量 5,000 以下の水溶性オリゴ糖シリーズを得ることとさらなる高付加価値化を狙う。

亜臨界水抽出法によりグルカンを抽出・可溶化できる条件を確立した。更にその可溶化画分の一部を酵素処理することで、低分子化したオリゴ糖の高純度化条件を確立した。これらの知見に基づき工業スケール生産に向けて、以下の項目について詳細な検討を実施した。

④-1 不溶性 AG、BG の酸加水分解によるオリゴ糖生産条件の検討

- ・加水分解酸処理濃度条件の検討—オリゴ糖の生成パターンを継続して評価する。
- ・加水分解温度のオリゴ糖の生成パターンを継続して評価する。

④-2 亜臨界水処理による AG、BG 可溶化処理条件の検討

- ・研究室レベルでのバッチ装置による亜臨界水可溶化条件を、流通式亜臨界水連続装置での温度・圧力条件検討に適用する。
- ・連続抽出装置を用いて、連続的にグルカン類を抽出する温度・圧力・時間条件の検討を行い、酵素処理低分子化検討用の可溶化素材を調製する。

④-3 亜臨界水処理可溶化液の酵素処理条件（酵素種・酵素量・反応時間）の検討

亜臨界可溶化直後の可溶化多糖に酵素を添加して、各種重合度のオリゴ糖を調整するのに適した、酵素種、酵素濃度、反応時間、反応温度条件を最適化する。得られたオリゴ糖（分子質量 5,000 以下）は、除タンパク処理、脱塩処理精製を行った後、オリゴ糖分析装置を用いてオリゴ糖種を同定する。

⑤ 素材機能・評価・食品安全データ

⑤-1 脂質成分の定性分析・生理機能評価系検討

- ・ 脂質定性分析：菌体から抽出分離された脂質成分に含有される主要セラミド成分及びステロール成分について、HPLC 装置を使用して、定性定量分析を行い、主要ステロール、セラミド成分含量を HPLC 分析により定量する。
- ・ 生理機能性評価：東北大有する生理機能評価系を用いて、細胞増殖機能等のスクリーニング試験を、培養細胞を用いた評価系で一次スクリーニングを行い、再現性を追試する。活性の有意差を見出したものについてはさらにマウス等を用いた試験系を調査、検討の計画準備を行う。

実施項目

- ・ 脂質成分の分析プロセスの定常的な運用を行い、試料の品質評価体制及び製品規格書の作成。
- ・ 純度検定などを通過した試料については、細胞レベルでの活性試験を実施する。

⑤-2 グルカン類の定性分析・生理機能評価系検討

- ・ グルカン類の定性分析：糖特異的抗体および核磁気共鳴スペクトル（NMR）を用いて測定・評価する。また、酵素分解後の糖成分について糖質分析装置を用いて詳細に解析・評価する。
- ・ 生理機能性評価：東北大が有する生理機能評価系を用いて、免疫活性の評価を行う。オリゴ糖シリーズの機能の評価し、グルカンの高付加価値化を確認する。

実施項目

- ・ グルカン類 NMR 分析および、分析プロセスの定常的な運転を行い、試料の品質評価を継続する。
- ・ グルカンの免疫活性作用について、すでに樹立している純度検定などを通過した試料について、細胞レベルでの生理機能評価系を用いた評価を継続して実施する。

⑤-3 健康サプリメント等の機能性食品向け安全性データ取得先の調査

糸状菌・担子菌は食用であり、それら由来のセラミド、グルカン共に十分な食経験に支えられているが、さらに抽出区分の化学的特性と安全性データを補充することを目的とする。食品分析センターなどでの衛生試験、成分含量試験及び簡易的な毒性試験を実施する。

(ア) 急性毒性試験 (LD50) 単回投与方式

(イ) 変異原性試験 (エイムズ試験)

(ウ) 衛生試験 (重金属、微生物)

1-2 研究体制

研究を円滑に推進するため、一連の研究全体について事業管理法人、P L, S L, 再委託先などプロジェクトを円滑に進めるためマトリックス的な情報交換、企画立案を行い、本研究開発を統括する。また経理指導を管理法人が行った。(東北大、P L, S L)

1 P J 管理委員会・進捗確認会議の開催

各技術課題の達成目標管理・進捗評価をP L及びS Lが中心に行った。(東北大、P L, S L)

2 進捗管理 (東北大・岐阜セラック・ファームラボ)

主たる以下の開発課題についての進捗状況を四半期ごとに電子会議または通常会議を開催し、プロジェクトの円滑な推進を行う。

・ラボ及び量産製造プロセス開発進捗管理 (東北大・岐阜セラック・ファームラボ)

・機能評価進捗管理 (東北大・ファームラボ)

適時、研究各課題解決のための調査・企画を行った。

1－3 成果概要

① 脂質成分抽出法の開発

①-1 廃棄糸状菌より脂質成分の抽出法の開発

麴を入手し、予定通り3月までに当初の目的を達成できた。【目標達成度：100%】

①-2 廃棄担子菌より脂質成分の抽出法の開発

製品の元となる原体脂質サンプルを調製し生物活性試験へ供した。結果について、2013年度日本農芸化学会で成果報告し、トピックス賞に選出された【目標達成度：100%】

①-3 ①-1～①-2の量産技術の開発

計画通りプロセスフローを作成済み。H24年度には計画どおり量産抽出を開始した。
【目標達成度：100%】

② グルカン成分抽出条件の検討

②-1 廃棄糸状菌よりグルカン成分の抽出条件の検討

東北大学に導入設置した「微生物培養システム」「糖質分析システム」を用いて計画通りに実施。さらに効率的なグルカン抽出法を開発した。【目標達成度：100%】

②-2 廃棄担子菌よりグルカン成分の抽出条件の検討

糸状菌で開発した改良抽出法を担子菌にも適応できることを明らかにし、予定通りグルカンを回収した。【目標達成度：100%】

②-3 ②-1, ②-2の量産技術の開発

きのこ、黄こうじを原料に計画通りに実施した。【目標達成度：100%】

③ α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカンの高純度分離精製技術の開発

③-1 糸状菌抽出グルカンよりの α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカンの高純度分離精製

混入多糖の除去法を開発し、改良抽出法との組合せにより更なる高純度化を達成した。【目標達成度：100%】

③-2 廃棄担子菌グルカンよりの α -1, 3-グルカン (AG) および β -1, 3-グルカンの高純度分離精製

糸状菌と同様に混入多糖の除去法と改良抽出法との組合せにより更なる高純度化を達成した。【目標達成度：100%】

③-3 量産技術の開発

きのこ、黄こうじを原料に計画通りに実施した。【目標達成度：100%】

④ 精製グルカンの低分子化による水溶性化と高機能化

④-1 酸加水分解によるオリゴ糖生産条件の検討、

酸加水分解より、酵素処理あるいは亜臨界水処理が有効であることが明らかとなったため計画を変更し、④-2 に注力した。【計画変更】

④-2 亜臨界水処理による可溶化処理条件の検討

量産を意識した亜臨界水抽出の試験を行い、可溶化抽出条件を検討した。その結果、オリゴ糖の生産に成功した。【目標達成度：100%】

⑤ 素材機能・評価・食品安全データ

⑤-1 脂質成分の定性分析・生理機能評価系検討

高機能脂質については、生理機能評価を完了した。また、高機能化グルカンについては、免疫細胞試験中であり結果は得られていないが、近日中には得られる見込み【目標達成度：100%見込み】

⑤-2 グルカン類の定性を抗体反応系、核磁気共鳴スペクトル (NMR) を用いた測定・評価

抗体反応系、NMR 分析とも定常的に運用が可能であり、計画通り完了した。【目標達成度：100%】

⑤-3 健康サプリメント等の機能性食品向け安全性データ取得

調査対象とする安全性試験項目について評価した。【目標達成度：100%】

1－4 当該プロジェクト連絡窓口

国立大学法人東北大学 未来科学技術共同研究センター

開発企画部 助教 平塚 洋一

〒980－8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6－6－10

Tel：022－795－7105

第2章 研究成果

① 脂質成分抽出法の開発

糸状菌・担子菌に含まれるステロール類およびセラミド類は、食用であることから、安全かつ、生活習慣病予防や美容の観点で有用性を有しており、市場においてもセラミド類5～10%品で十分な競争力を持つ。

本研究では、菌体残渣よりステロールとセラミド（糖脂質）類の分離抽出をラボスケールおよび工業スケールで行い、ステロールとセラミド（糖脂質）類の定性的成分分析を行なった。

①- 1 糸状菌由来の有用脂質抽出開発

東北地区及び東北地区以外での菌体残渣を排出している地区の調査を継続し、菌体バイオマスの調査を行ってきた。その中で、昨年度に麴菌残渣を排出していることが明らかになった会社から麴残渣を入手した。また、同社から有効な脂質成分を抽出するため、麴菌の性質調査用に複数の菌株を取寄せた。さらに、黒麴菌残渣を入手した。これらの菌体サンプルを用いた脂質分析を実施した。

①- 2 ブナシメジ由来の有用成分の抽出、同定

ブナシメジの非可食部の有効利用を目指し、この非可食部より昨年度決定した抽出法により効率よく脂質を抽出し、定性分析を行った。その結果、有効性分として図 1 に示すようなスフィンゴ脂質を見出した（図 1）。また、この非可食部より抽出されたスフィンゴ脂質に有益な生理機能を期待し、皮膚の炎症に対する効果を検討した。

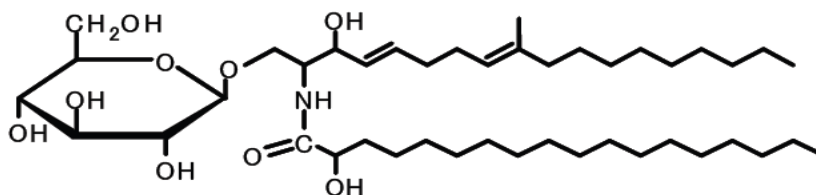


図1 キノコ由来スフィンゴ脂質

①- 3 廃棄担子菌より脂質成分の抽出法の開発

なめこ由来の脂質（グルコシルセラミド）の精製、同定

なめこ中には他の担子菌（シメジ）同様、有用成分としてグルコシルセラミドが含まれていると推察されている。そこで我々は先の量産試作にて得られた脂質中のグルコシルセラミドの確認と同定、それに続くアッセイを目的として、なめこ脂質の単離精製を試みた。

② 廃棄菌体（担子菌・糸状菌）よりのグルカン成分の抽出開発

糸状菌・担子菌の細胞壁は α -1,3-グルカン[AG]、 β -1,3-グルカン[BG]、キシンの混合物である。グルカン類については、東北大では、糸状菌菌体成分に多量の新規グルカンとしてAGを見出し、段階的アルカリ抽出法を用いた精製AGと精製BGの物質特許及び製造特許を出願しており、実験室規模でのグルカン類分離基礎技術は確立している（阿部ら特許 4595074 号）。

本研究開発では、糸状菌および担子菌廃棄菌体からの機能性グルカン成分のカスケード抽出の量産試作技術開発を目的としていた。後工程でのAG, BGの分離精製段階で回収率を上げるためには、まず前工程でのAG-BG混合物の回収率を上げる必要がある。今年度は、工業規模へのスケールアップに向けて、さらに簡便な抽出法の開発とグルカン類の精製法の開発、高機能化へ向けたオリゴ糖化の条件決定と量産生産技術を開発する。

②- 1 アルカリ抽出法の改良

従来法の多段階アルカリ抽出法をさらに簡素化するため、アルカリ濃度、処理時間を検討し、1回のアルカリ抽出でもグルカン類を効率よく抽出できる改良法を開発した。本改良法により抽出したグルカン類について、糖質分析装置を用いてグルカン類の分析を行ったところ、従来法と同様に高純度のグルカン類が抽出可能であることを確認した。また、高純度AGの抽出を確認するため、 ^{13}C NMR分析を行い、標準に使用した虫歯菌由来のNMR結果とほぼ同一のスペクトルが得られ、高純度AGが抽出できていることを確認した（図2）。

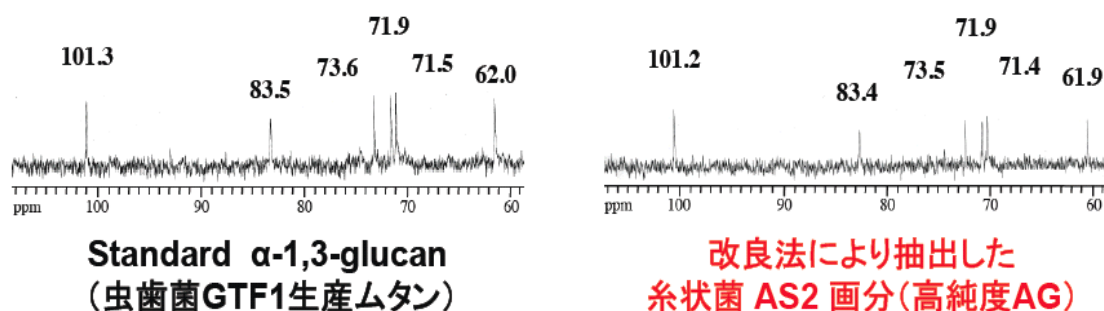


図2 改良法により抽出したAGの ^{13}C NMR分析

次に、改良アルカリ法を用いて廃棄担子菌（なめこ）からグルカン類を流出した。抽出したグルカン類について糖質分析装置を用いて、構成糖を分析したところアルカリ可溶画分からは、グルコースとマンノースが著量検出され、なめこは高純度なアルカリ不溶のグルカンの抽出には適さないことが示唆された。一方、アルカリ不溶画分は、主にグルコースから構成されており（図3）、後述するキチンの除去を適用することにより高純度のBGが得られることが明らかになった。

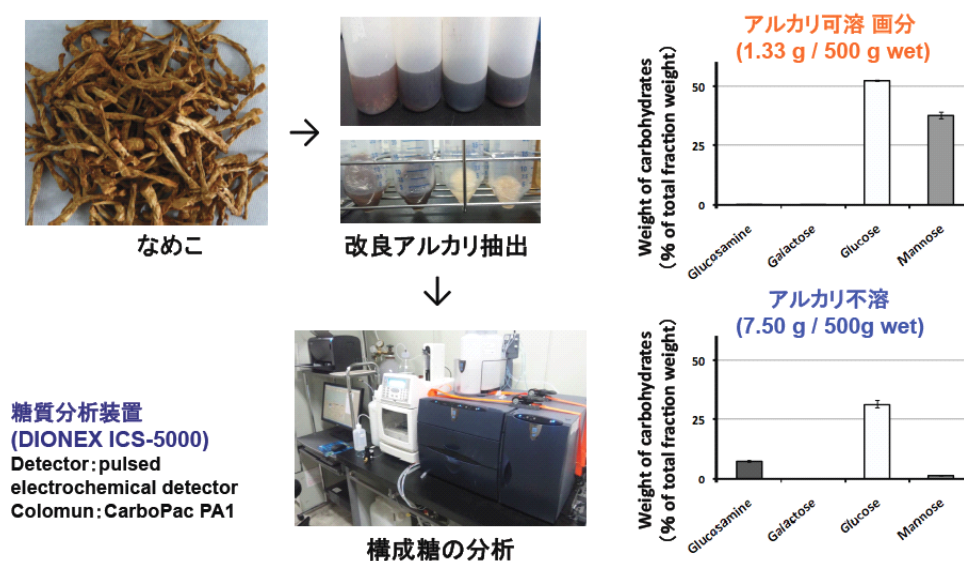


図3 廃棄担子菌からのグルカン抽出と糖質の分析

②ー2 グルカン類の高純度化と高付加価値化

改良アルカリ法において得られた高分子AG、BGは共に分子質量7～30万の水不溶性である。AG、BGの機能性を維持したまま低分子化することが可能になれば、生体吸収性、均一溶液状態での反応性を高めて工業剤としての付加価値が高まる。AG、BGは分子量5,000以下(DP30以下)で一般に水溶性が高まると考えられる。そこで、酵素分解、亜臨界水処理等を組み合わせて多糖の高純度化と分子質量5,000以下の水溶性オリゴ糖シリーズを得ることでさらなる高付加価値化を狙う。

(1) 酵素分解による高純度化

改良アルカリ法により得られた BG 画分のキチンを除去した。糖質分析結果から本処理により、キチン由来のグルコサミンが検出できなくなり、キチンが除去できていることを確認した。

(2) 酵素分解によるグルカン類の高付加価値化

亜臨界水抽出によるグルカン類の水溶性化（高付加価値化）に取り組んだ。

(3) 亜臨界水処理によるグルカン類の高付加価値化

前述のように酵素分解によりオリゴ糖の生産は可能であることが明らかとなったが、比較的短鎖のオリゴ糖に限られる。また、当初予定していた酸加水分解によるオリゴ糖生産については、二糖あるいは単糖しか得られなかったため、効率的でないと判断し、亜臨界水抽出によるオリゴ糖生産に注力した。以下（図 4）が結果である。

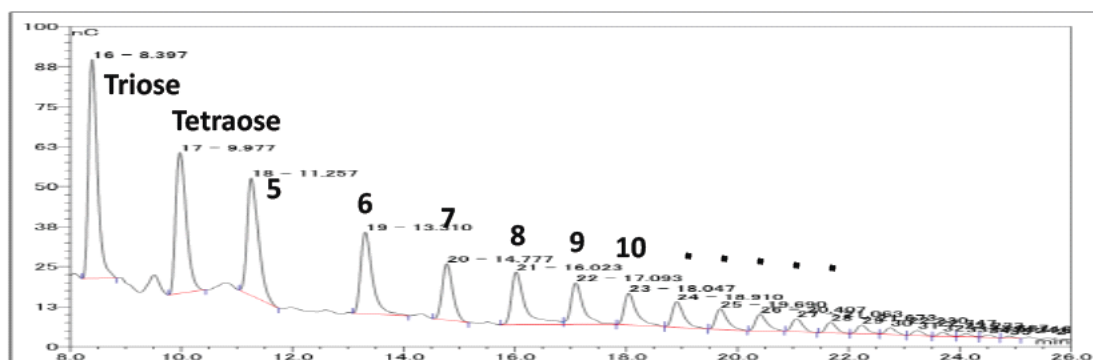


図 4 高純度化した AG オリゴ糖

(4) 亜臨界水処理によるグルカンオリゴ糖の分取

生成したオリゴ糖は糖鎖の長さによって機能性の効果に差があり、最も効果的なオリゴ糖を分取することによって更なる高付加価値化が期待できる。

そこで、導入した示差屈折検出システムおよびフラクションコレクターを用いて、オリゴ糖の分取条件を検討した。その結果、本システムによりオリゴ糖のサイズ分離が可能であることが明らかになった。

②-3 グルカン類の量産抽出技術

(1) 担子菌なめこ由来のグルカン成分の量産抽出

担子菌の細胞壁は α -1,3-グルカン[AG]、 β -1,3-グルカン[BG]、キチンの混合物である。東北大学では、糸状菌菌体成分に多量の新規グルカンとしてAGを見出し、段階的アルカリ抽出法を用いた精製AGと精製BGの物質特許および製造特許を有している。そのため、実験室規模でのグルカン類分離基礎技術は確立されている（特許4595074）。

スライスブナシメジを原料としたアルカリーグルカン抽出し、パイロットスケールへと適用し、特許法を用いてそれぞれ α グルカン画分、 β グルカン画分を分取出来た旨を報告した。更に研究室での規模を工業生産レベルへとスケールアップし、廃棄菌体バイオマスよりのグルカン量産抽出分離を行った。

スケールアップ原料として用いた原料（写真1）は、担子菌なめこの石づきから茎にかけて、大量に廃棄されている。この廃棄される担子菌なめこから脂質やグルカンなど有用物質が得られれば、コスト的にも非常に安価に、バイオマスの活用が可能になる。また、なめこの茎や石づきにはあまり脂質が含まれておらず、シメジよりも効率的にグルカンの抽出が行なえることが明らかとなっている。



写真1 廃棄される担子菌なめこ
（石づき、茎）

なめこ原料に対して脂質の除去を行なった。得られた脂質は有用成分（グルコシルセラミド等）が含まれるため、濃縮別回収し、成分分析を行なった。



写真9 釜内に仕込んだ菌体残渣（右）とエタノール（左）



写真3 粉碎されたグルカン（左上）、フリーズドライしたグルカン（左下）
ダイノームル装置（右）

(2) 糸状菌黄こうじ由来のグルカン成分の量産抽出技術

糸状菌の細胞壁もまた α -1,3-グルカン、 β -1,3-グルカン、キチンの混合物であり、ラボスケールでの脂質およびグルカンの抽出分離が可能であることを見出している。それらを踏まえ、糸状菌のグルカン量産試作を試みた。

用いた糸状菌原料は、乾燥黄色こうじである（写真4）。



写真4 黄こうじ菌糸

これらの黄こうじから得たグルカン類について、糖質分析装置を用いて糖質を分析した。その結果、アルカリ可溶画分（AG 画分）はほぼ純粋な AG であり、アルカリ不溶画分（BG 画分）においてもこれまでと同様キチンの混入はあるが高純度の BG であることが明らかになった（図5）。

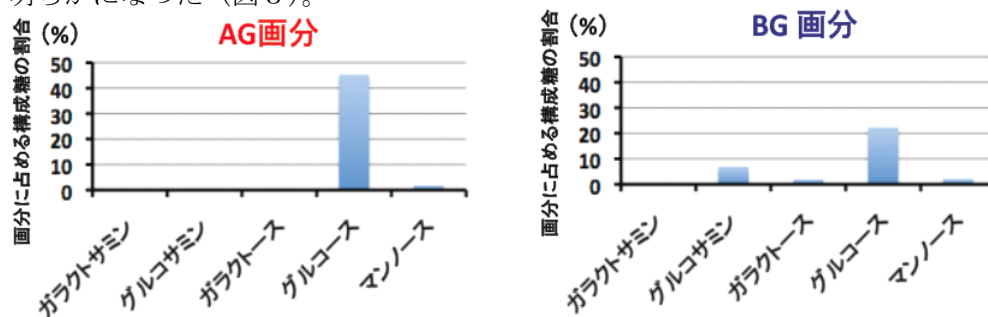


図5 黄こうじ由来グルカンの糖分析

③. 素材機能・評価・食品安全データ

③ー 1. 健康サプリメント等の機能性食品向け安全性データ

糸状菌・担子菌は食用であり、それら由来のセラミド、グルカン共に十分な食経験に支えられているが、さらに抽出区分の化学的特性と安全性データを補充することを目的として本項目を計画した。また事業化を視野に入れば、これら新たな機能性の発見・評価は必須となる。このような理由から、先に報告した量産試作にて得られたサンプルを用いて、各種生理活性試験を行なった。

・「好中球を用いた抗酸化・抗炎症・免疫賦活作用の同時評価」

試験結果

なめこ水溶性抽出物：抗炎症作用

なめこ脂溶性抽出物：抗炎症作用・免疫賦活作用

なめこ由来グルカン：抗酸化作用

を有するということがそれぞれ明らかとなった。今後これら生理活性を生かした形での事業化、商材化を検討する。

・「シメジ脂質」「黄こうじ脂質」およびコントロール品 2 種の 閉鎖パッチテスト (24 時間連続貼付)

24 時間連続貼付による閉鎖法パッチテストにおける皮膚刺激指数は、シメジ脂質及び黄こうじ脂質については「要改良品」という判定であった。

この要因として、菌体に細胞刺激性の物質が含まれる事が挙げられる。これまでの知見から、菌体にはエルゴステロール・フィトステロールやスフィンゴ脂質の他に、細胞刺激性を有するトリテルペン系化合物が含まれていることが判っている。このことから、得られた脂質の脱脂（ヘキサン抽出、あるいはカラム精製）を行い純度を上げることで、肌毒性は大きく改善されると思われる。現在、効率的な脱脂法について引き続き検討を行っている。

・担子菌脂質（なめこ）、担子菌多糖（ β グルカン）に対する Ames 試験

被験物質 2 種 (DMSO solv) について、ネズミチフス菌 *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および大腸菌 *E. coli* WP2uvrA を用いて試験実施。陽性判定基準となる復帰変異コロニー数の最高値が陰性対照値の 2 倍以上に増加しなかったことから、陰性判定であった。

用量設定試験においては、代謝活性化しない場合 4.88 μ g/plate以上の用量にて、代謝活性化した場合 78.1 μ g/plate以上の用量にて、被験物質の沈殿が認められた。本試験においては、代謝活性化の有無に関わらず 156 μ g/plate以上の用量にて、被験物質の沈殿が認められた。一方、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても生育阻害は認められなかった。

無菌試験については、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても菌の生育はみられなかった。

③ー 2 抽出グルカンおよび脂質の機能性評価

(1) グルカンオリゴ糖の機能性評価

グルカンオリゴ糖の機能を評価するため、亜臨界水抽出したグルカンオリゴ糖について、オリゴ糖の分取を行った。

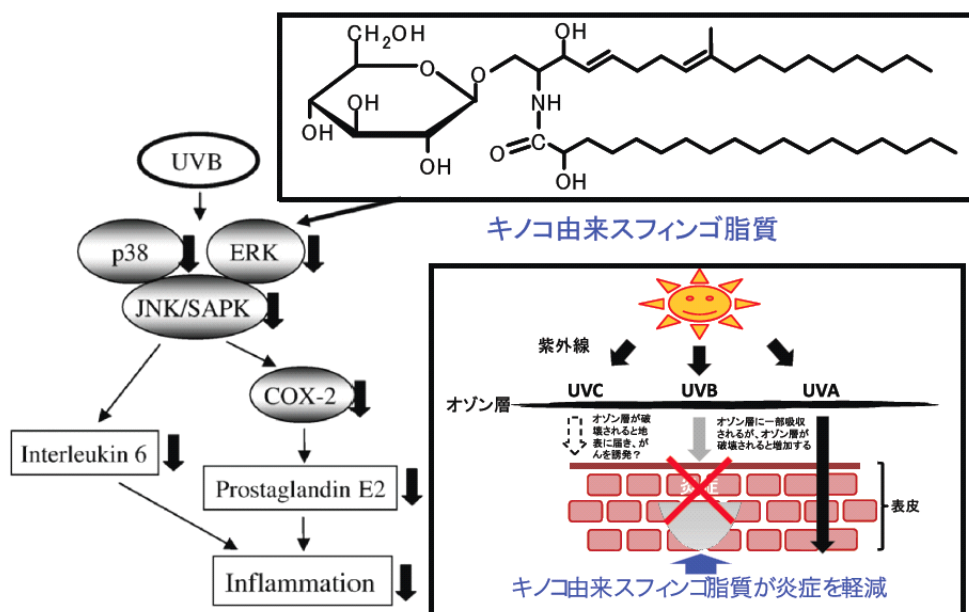
(2) 抽出脂質の機能性評価

近年、グルコシルセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質の生理活性に注目が集まっている。我々は、キノコ類の非可食部の有効利用を目指し、この非可食部より効率よくスフィンゴ脂質を抽出した。そこで我々は、この非可食部より抽出されたスフィンゴ脂質に有益な生理機能を期待し、皮膚の炎症に対する効果を検討した。本研究では、培養細胞試験により、紫外線惹起による皮膚炎症に対するキノコ由来スフィンゴ脂質の抑制効果とその作用機構を明らかにすることを目的とした。

【結果】 HaCaT 細胞への UV-B 照射により PGE₂ 産生が亢進し、これがキノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されたため、本モデルでスフィンゴ脂質の皮膚炎症抑制効果の検討が可能であると判断した。そこで種々の炎症促進関連分子 (IL-1 β , IL-6, MCP-1, COX-2) への影響を調べ、HaCaT 細胞への UV-B 照射で誘導されるこれらの炎症促進関連分子 (とくに COX-2) の遺伝子発現が、キノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されることを見出した。この COX-2 への影響を支持する知見として、COX-2 タンパクやストレス応答タンパク (JNK, p38, ERK) のリン酸化がキノコ由来スフィンゴ脂質により抑制されることがわかった。

【結語】 キノコ由来スフィンゴ脂質は MAPK シグナルの抑制 (COX-2 の発現低下) を介して、皮膚炎症抑制効果を発揮する可能性が考えられた。

結果



④ 成果発表報告

2013年日本農芸化学会において、以下の成果発表を行ったので報告する。

①菌類残渣からのグルカン類抽出法の改良と高純度化

発表者：吉見 啓（ファームラボ）

②紫外線惹起による皮膚炎症に対するキノコ由来スフィンゴ脂質の抑制効果

発表者：都築毅

本事業で行った AG の抽出法について以下の論文に掲載された。

掲載誌：PLOS ONE (2013) January 2013, Volume 8, Issue 1, e54893

タイトル：Functional Analysis of the alpha-1,3-Glucan Synthase Genes agsA and agsB in *Aspergillus nidulans*: AgsB Is the Major alpha-1,3-Glucan Synthase in This Fungus

著者：A. Yoshimi et al.

第3章 今後の進め方

3-1 継続研究について

本研究開発で量産プロセスを実施する為の条件を求める事ができた。平成25年度以降は、実際に工場で製造ラインを稼働させてロット生産を試みる。また、コスト面などを加味して最適化の見直しを行い、より安価に大量生産を行う可能性を探る。

尚、企業での製造ライン稼働時に発生する様々な問題については、引き続き東北大でフォローし少しでも早い事業の立ち上げを産学で目指す。

また、原料（麴、なめこ等）に依存しない製品スペックを定める為の研究も継続して進める。

3-2 事業化へ向けた取組

事業化へ向けて、製品スペックを定めた後でのサンプル出荷を目指すと共に、国内外での展示会への出品で顧客への情報提供を心がける。

具体的には、平成25年10月にドイツ・フランクフルトで開催される食品機能材の展示会「F I E 2 0 1 3」及び、11月に日本国内で開催される「食品開発展2013」へ各々サポイン事業化を目的として展示ブースに菌類由来グルカン、セラミド試作品の展示を予定している。