

平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「化粧品・医薬部外品としての天然保湿因子の探索  
と生産技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成22年6月

|     |                  |
|-----|------------------|
| 委託者 | 東北経済産業局          |
| 委託先 | 財団法人あきた企業活性化センター |

## 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<br>(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者) | 4  |
| 1-3 | 成果概要                          | 5  |
| 1-4 | 当該プロジェクト連絡窓口                  | 7  |
| 第2章 | 成果報告                          | 8  |
| ①   | NMF生産酵母・糸状菌の選定及び生産能力向上        | 8  |
| ②   | NMFの生産酵母・糸状菌による最適生産培養法の開発への対応 | 14 |
| ③   | 生物学的効果及び物理学的効果の検証             | 27 |
| 第3章 | 全体総括                          | 32 |
| 3-1 | 全体総括                          | 32 |
| 3-2 | 事業終了後の方針                      | 33 |

## 「化粧品・医薬部外品素材としての天然保湿因子の 探索と生産技術の開発」

### 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

化粧品に含まれている天然保湿因子(以下NMF)として知られている植物コラーゲン及び天然セラミドは、優れた保湿効果を示し、ヒアルロン酸と並ぶ重要なスキンケア素材として知られている。

コラーゲンの原料は牛由来が主流であったが、BSE問題の発生以降、豚や魚由来が主流となっている。しかし、いずれのコラーゲンも臭いの問題で高配合出来ず、高度の脱臭を行えば高コストになる。動物由来のコラーゲンはそれ自体、分離精製が煩雑であり、キログラム単価が数百万円に及ぶ場合もある。

また、セラミドに関しては、コラーゲン同様牛由来が主流であったが、現在は大部分が植物由来となっている。しかし植物由来セラミドは乾燥植物に微量しか含まれず、高価になってしまう。

化学的手法による疑似コラーゲンやセラミドも合成されているが、大きなコスト低下には繋がっていないのが現状である。一方、安全や環境保全の観点から天然志向が高まっており、脱石油素材である微生物などからの価格優位性のある素材の開発が望まれている。

そこで、本開発は自然環境の中から保湿因子高生産酵母・糸状菌を探索し、安価な食品廃棄物を発酵培地とする培養方法によって、無臭で低コストなセラミドとコラーゲンの生産技術を開発することを目的とする。本開発の成果は、メーカーから提示される、より低コストで消費者のニーズに応える、安全で安心な化粧品・医薬部外品の原料等として用いる。

株式会社秋田今野商店が保有する約200株の酵母・糸状菌は、自然界の種々の環境下から分離同定されたものであり、天然保湿因子の生産能が期待される。

しかし、天然保湿因子を高生産する技術等は確立できていないのが現状である。こうした状況の下、これらの不安定な各々の発酵要素を断片的にはなく、複合的に組み合わせることにより、天然保湿成分の探索と生産技術の確立を目指す。

## 1－2．研究体制

### 【事業管理者】

財団法人あきた企業活性化センター

#### ①管理員

| 氏名    | 所属・役職              |
|-------|--------------------|
| 松橋 亨  | 技術支援グループ<br>サブリーダー |
| 佐藤 真也 | 技術支援グループ主査         |
| 渡辺 淳一 | 技術支援グループスタッフ       |

### 【再委託先】

株式会社秋田今野商店

| 氏名    | 所属・役職        |
|-------|--------------|
| 今野 宏  | 代表取締役社長      |
| 佐藤 勉  | 生産部長・研究開発責任者 |
| 瓜生 摂  | 研究開発課スタッフ    |
| 菅原 雄悦 | 研究開発課スタッフ    |
| 高橋 昭仁 | 研究開発課スタッフ    |

丸善製菓株式会社

| 氏名    | 所属・役職      |
|-------|------------|
| 栞原 浩誠 | 独自商品開発課副課長 |
| 林 多恵子 | 独自商品開発課研究員 |

秋田県総合食品研究センター

| 氏名   | 所属・役職         |
|------|---------------|
| 戸松 誠 | 食品開発グループ主任研究員 |

学校法人加計学園 岡山理科大学

| 氏名    | 所属・役職       |
|-------|-------------|
| 三井 亮司 | 理学部生物化学科准教授 |

### 1-3 成果概要

#### ①-1：NMF生産酵母、糸状菌の選定

未同定株である *Pythium* sp. AOK HKD-1 のポテトデキストロース培地における静置培養物に 0.93%Hyp の含有が確認された。これは双子葉植物の一次細胞壁に含有される Hyp と同等量(0.1～1.0%)であった。微生物コラーゲンは培養により無尽蔵に増殖可能であり、植物のように生育に時間を要することがなく、大変有利である。

#### ①-2：NMF生産酵母・糸状菌の生産能力の向上

微生物バンク内の有用野生酵母の中でグルコシルセラミドの生産能力を高めるためにエタンスルホン酸メチル(EMS)等の化学変異処理による育種を行い、脂肪酸合成酵素阻害剤であるセルレニン耐性株を造成した。グルコシルセラミド生産能の知られる酵母株からそれぞれ3株に25  $\mu$ M セルレニン耐性株を得ることに成功した。

#### ②-1：最適培養条件の検討

セラミド生産性が期待される各種酵母について細胞内脂肪粒の蓄積条件を培養時の炭素と窒素の含有比(C/N比)で比較検討したところ *Lipomyces kononekoe* subsp. *kononekoe* NBRC10375 が細胞内に著量の脂肪粒を蓄積した。細胞粒の形成率は静置培養においてN源が少ないほど良好であり細胞内に最大70%近くの脂肪粒を確認することが顕微鏡上確認出来た。増殖は炭素源が同じであれば振とう培養ではN源が多いほど良好であった。

グルコシルセラミドの効果的な生産法を開発する上で *Kluveromyces thermotolans* AOK AN109 をモデル系とし、培養時の炭素源について各種炭素源を検討したところ、黒糖培地は有望な培地と判断された。本酵母でのグルコシルセラミド抽出及び分析条件の検討を行ったところ0.1mg程度の含有量であってもTLCにより明瞭なスポットとして分離できる方法及び条件を確立した。抽出効率をあげるための一案として実施された本酵母に対して細胞壁溶菌活性を有する細菌を用いたグルコシルセラミド抽出法を考案し特許出願準備中である。

また、グルコシルセラミド生産酵母として知られる *Saccharomyces kluyveri* のYM培地及び黒糖培地の培養液及び菌体の細胞毒性を調べたところいずれにも細胞毒性はないことを明らかにした。

次に生理機能評価を行った。加齢に伴う神経変性疾患に対しての治療剤として報告されている神経成長因子Nerve Growth Factor (NGF)と同様の活性をスクリーニングした菌株エタノール抽出液が有することを発見した。なお、グルコシルセラミド標品には、NGF様活性は認められなかったことから、これらについて特許出願準備中である。

#### ②-2：植物性有機廃棄物を用いた低コスト生産法の開発

原材料のコスト削減を目指し安価な米糠、おから、リンゴ搾汁粕に部分的に代替することにより原料コストの低減化を目指した。各植物性有機廃棄物の培養特性を調べたところ、おから、米糠、リンゴ搾汁粕ともに微生物の培地として具備すべき蛋白質、糖質、灰分等を十分に持つ

ていることが明らかになった。さらにそれぞれの植物性有機廃棄物中に含有されるグルコシルセラミド及びコラーゲン含量の指標となる Hyp の含量を TLC 及びヒドロキシプロリン (Hyp) 専用分析装置により分析を行ったところ、Hyp については、おからに多く、リンゴ搾汁粕はリンゴの品種によってその蓄積量に差が認められた。

### ②-3：②-2 により得られた NMF と既知 NMF との比較解析

フルーツ、米、こんにゃくの順相クロマトグラフィー精製サンプルを HPLC により分析した際のグルコシルセラミドのチャートパターンは、TLC でワンスポットであっても、内容組成が異なることが確認できた。さらに *K. thermotolerans* 発酵液と植物由来のグルコシルセラミドの HPLC のチャートパターンが異なることが確認できた。

### ③-1：生物学的効果及び物理学的効果の検証

*K. thermotolerans* 黒糖発酵液をマウスを用いて単回投与毒性試験を実施したところ、対照群と同様の体重増加傾向を示し、特に異常は認められなかった。各投与群の代表例について、剖検を行ったところ、特に異常は認められなかった。さらに LD<sub>50</sub> 値は 2000mg/kg 以上であることが分かり、安全性において特に問題はないと結論された。

次に同酵母の黒糖発酵液の安全性試験の一環として、皮膚感作性試験をモルモットを用いて Maximization 法により検討したところ、本試験条件下で同酵母黒糖発酵液には原液の使用においても皮膚感作性はないと結論された。その他に様々な *in vitro* 評価を行い、既存の市販 NMF 製品と比較して発酵による有効性の上昇が確認され、特許出願の準備を進めている。

### ③-2：物理学的効果の検証

同酵母の黒糖発酵液を化粧料として調整を行いペーパーディスク法により保湿試験を行ったところ、固形 0.1%・10%BG(ブチレングリコール)黒糖発酵液は、固形 0.1%グルコース溶液及び 10%BG 水溶液と比較して保湿性が認められた。

次に同酵母を用いた黒糖発酵液化粧料 40℃、20000Lx の蛍光ランプの下で保管しその色調の変化を 2 週間にわたり調べたところ、固形 0.1%の黒糖発酵液は光照射下で退色が認められたために、褐色瓶での保管が望ましいことが判明した。

次に保存安定性試験を黒糖 5%水溶液で培養した同酵母をオートクレーブ滅菌後セライトろ過後、pH 調節しオリ引き後再度セライトろ過した化粧料について 5℃、室温 40℃の各温度で保存しその色調変化を観察したところ、40℃、遮光での保管では着色、オリの発生、pH の低下が見られるため冷蔵保存が望ましいと判明した。

次に製剤の配合と化粧料の安定性試験を実施した。防腐及び保湿効果を付与できる高粘性を有する BG(ブチレングリコール)を化粧料基材として調整したところ BG10%では微生物の増殖がみとめられた。一方で防腐剤として用いられるフェノキシエタノール 0.5%添加した化粧料には微生物の増殖が認められなかったため BG30%もしくは BG10%にフェノキシエタノール 0.5%を添加することで、微生物の増殖を抑えられることが判明した。

#### 1－4．当該プロジェクト連絡窓口

住所：〒010-8572 秋田市山王三丁目1番1号 秋田県庁第2庁舎2階

名称：財団法人あきた企業活性化センター

連絡担当者所属役職・氏名：技術支援グループ サブリーダー 松橋 亨

Tel: 018-860-5624 Fax: 018-860-5704

E-mail: toru-matuhashi@bic-akita.or.jp

## 第2章 成果報告

### ①NMF生産酵母・糸状菌の選定及び生産能力向上

#### ①-1：NMF生産酵母・糸状菌の選定

##### <目的>

セラミド生産に期待の持てる有用野生酵母 100 株の中の NMF 成分、具体的にはセラミドの含有量及びコラーゲンの含有量を比較した、さらには、対照株として標準菌株の含有量も併せて分析し比較する必要があるため、標準菌株は脂肪蓄積が知られている 180 株を分析した。

また、植物コラーゲンは、本来植物由来の糖蛋白質ではあるが、糸状菌である卵菌類もその細胞壁構成主要成分が植物と同じセルロース（セルロース-グルカン）を持つことからセルロースを細胞壁構成成分に持つ菌類 100 株の Hyp 含量も併せて分析した。

さらには、これらのセラミドやコラーゲン生産性の酵母のヒット率を考慮した上で特定の種属の自然環境からの分離を行うとともに生産性の向上を目指し、これら酵母の子のう胞子の形成を促し、単孢子分離を行い、さらなる生産性の向上を目指した。

##### <方法>

#### A. カビ（卵菌類）サンプル作成のフローチャート

##### 使用培地

・ PD 液体培地

Difco Potato Dextrose Broth

・ 黒糖液体培地

黒糖 5%水溶液

##### 培養

各液体培地を K1 フラスコに 50m l ずつ分注



121℃20min オートクレーブで殺菌



冷却した培地に 0.7 mm 四方ほどの菌体を切り取り接種



28℃で 7 日間静置培養（培養条件は温度と日数を同じにした）

##### 培養後菌体と培養液を分離

菌膜をピンセットで回収しキムタオルにて水分を取る



接種時の 0.7 mm 四方の菌体は取り除く



培養液にクラゲ状の菌体が存在するのでろ紙ろ過



ろ紙上の菌体も回収



↓  
 回収した菌体の湿重量測定  
 ↓  
 ろ液の pH 測定  
 ↓  
 回収した菌体と培養液を凍結保存

## B. 酵母のサンプル調整

使用培地

・ YM 液体培地

|               |      |
|---------------|------|
| Glucose       | 1.0% |
| Peptone       | 0.5% |
| Yeast extract | 0.3% |
| Malt extract  | 0.3% |

・ 黒糖液体培地

黒糖 5%水溶液

**培養**

各液体培地を K1 フラスコに 50ml ずつ分注

↓

121°C20min オートクレーブで殺菌

↓

冷却した培地にスラントより 1 白金耳接種

↓

28°Cで 48 時間振とう培養 (100rpm)

↓

培養後培養液は凍結保存

## C. グルコシルセラミドの TLC 分析

培養液 → 凍結保存 → 解凍 → 遠心チューブ (2ml) 重量測定 → 遠心チューブ菌液 (2ml 分注)

↓

遠心 (スイングロータ 室温, 15000rpm, 1min) → 遠心 (アングルロータ 4°C, 15000rpm, 10min)

↓

上澄みを除く → 遠心エバポレーター減圧乾固 → エタノール分注 (1ml) → 超音波処理

↓

攪拌 → 超音波処理 → エタノール抽出 (60°C, 1hr) ブロックヒーター使用

↓

遠心 (スイングロータ 室温, 15000rpm, 1min)

↓

遠心 (アングルロータ 4°C, 15000rpm, 10min) → 上澄み分取 (遠心チューブ)

↓

遠心エバポレーター減圧乾固 → メタノール溶解 → TLC 分析 → 硫酸発色

↓

写真撮影及びコピー

#### D. アミノ酸アナライザーによる Hyp の測定

- ・ 分析サンプルの調整

サンプルを加水分解後アミノ酸アナライザーによる分析を行った。

コントロールとして動物性コラーゲンをを用いた。

〔加水分解〕

分析サンプルをダーラム管に適量取り、乾燥させる。

ダーラム管ごと密閉容器に入れ、6N の塩酸を約 300  $\mu$ l 加えアスピレーターで減圧しながら密閉を確認。

容器ごとヒートブロック恒温槽で 150°C に加温し、4 時間加水分解を行った。

加水分解終了後、サンプルを乾固させ、再度蒸留水をダーラム管に加えて再乾固させてサンプルの塩酸を完全に除去した。

- ・ サンプル調整

サンプルをアミノ酸アナライザー用サンプル Buffer で溶解後

0.2  $\mu$ m のメンブランフィルターで処理

- ・ 分析

日本電子 JLC-500-V2 を用い測定。分析条件は生体アミノ酸分析メソッドを用いた。

- ・ 分析量

動物性コラーゲン (FCP-A)

0.1mg サンプルを 200  $\mu$ l のサンプル Buffer に溶解し 50  $\mu$ l 分析

サンプル量：25  $\mu$ g

- ・ 供試サンプル

1mg サンプルを 200  $\mu$ l のサンプル Buffer に溶解し 50  $\mu$ l 分析

サンプル量：250  $\mu$ g

#### <結果>

①-1：保存されている有用野生酵母のうちセラミド生産が期待される 100 株につきそれぞれの酵母の培養サンプル調整を行い *S. kluyveri* には若干の有機酸生産能が認められ、一方で黒糖に由来する緩衝作用が認められた。これら培養サンプル中のグルコシルセラミドを TLC により確認したところ、未同定株 80 株中 75 株にはグルコシルセラミドが認められなかった。次にコラーゲン生産性酵母として知られる *K. thermotolerans* の培養菌体及び動物性コラーゲンの Hyp を分析した結果その生産量は 0.02mg/g と微量であった。

菌株保存機関より購入したセラミド、コラーゲンの生産性が期待できる菌株 180 株のうちコラーゲン生産が期待される卵菌類については 52 菌株のうち 30 菌株のサンプルがすでに培養調整済みである。これらの菌株はすべて菌株保存機関より分譲後再生した株であるにもかかわらず、PD、黒糖培地での培養では極めて生育の良好な株もあれば、生育の遅い株、まったく生育しない株も多く、極めて弱く死にやすいものと考えられた。

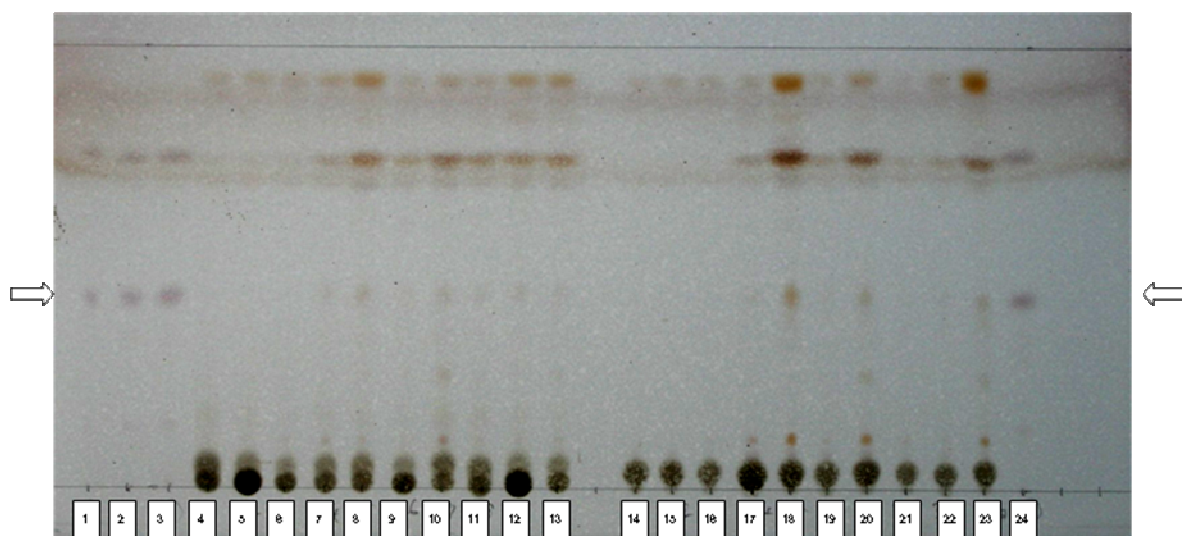
その中の生育の良好であった保存菌株 *Pythium*. sp AOK HKD-1 の PD 静置培養菌体を乾燥後、

加水分解を行いアミノ酸アナライザーによる Hyp 含有量を分析した。乾燥菌体 1g 当たり Hyp が約 9.3mg 含まれていた。

双子葉植物の場合、一次細胞壁中の Hyp 含量が乾燥重量の 0.1~1.0% であり Hyp 量を考慮するとエクステンシン含量はそれの 5~10 倍存在すると推定されている。*Pythium*. sp AOK HKD-1 株にも双子葉植物と同等の 0.93% の Hyp が含有されることを明らかになった。植物性コラーゲンと比較して微生物の生産するコラーゲンは微生物の培養によって得られるので、生育が早く収量の面で大きなメリットがあることが判明した。

次に菌株保存機関より購入した酵母の一部について加水分解処理を行いグルコシルセラミドの TLC 分析を実施した。①-1 図 1 にその一例を示したが、*Lipomyces kononenkoae* subsp. *kononenkoae* 及び同属同種の subsp. *Spencer-Martinsiae* において黒糖培地培養物、及び YM 培地培養物においても 3  $\mu$ g/g 相当の生産が認められた。

⇒ セラミド



|    |      |                                 |             |          | 乾燥菌体重量(mg/ml) |
|----|------|---------------------------------|-------------|----------|---------------|
|    |      | 1 植物抽出物セラミド1 μg                 |             |          |               |
|    |      | 2 植物抽出物セラミド2 μg                 |             |          |               |
|    |      | 3 植物抽出物セラミド3 μg                 |             |          |               |
| 31 | 黒糖培地 | 4 <i>Lipomyces starkeyi</i>     | NBRC 101517 | 120 μl相当 | 1.35          |
| 32 |      | 5 <i>Lipomyces starkeyi</i>     | NBRC 101518 | "        | 1.05          |
| 33 |      | 6 <i>Lipomyces starkeyi</i>     | NBRC 101519 | "        | 0.50          |
| 34 |      | 7 <i>Lipomyces tetrasporus</i>  | NBRC 10386  | "        | 1.10          |
| 35 |      | 8 <i>Lipomyces tetrasporus</i>  | NBRC 10387  | "        | 2.05          |
| 36 |      | 9 <i>Lipomyces tetrasporus</i>  | NBRC 10388  | "        | 1.50          |
| 37 |      | 10 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10389  | "        | 2.30          |
| 38 |      | 11 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10390  | "        | 1.50          |
| 39 |      | 12 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10391T | "        | 1.55          |
| 40 |      | 13 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10392  | "        | 1.55          |
| 31 | YM培地 | 14 <i>Lipomyces starkeyi</i>    | NBRC 101517 | 120 μl相当 | 0.15          |
| 32 |      | 15 <i>Lipomyces starkeyi</i>    | NBRC 101518 | "        | 0.20          |
| 33 |      | 16 <i>Lipomyces starkeyi</i>    | NBRC 101519 | "        | 0.30          |
| 34 |      | 17 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10386  | "        | 1.20          |
| 35 |      | 18 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10387  | "        | 3.50          |
| 36 |      | 19 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10388  | "        | 1.65          |
| 37 |      | 20 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10389  | "        | 1.80          |
| 38 |      | 21 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10390  | "        | 0.70          |
| 39 |      | 22 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10391T | "        | 1.30          |
| 40 |      | 23 <i>Lipomyces tetrasporus</i> | NBRC 10392  | "        | 2.60          |
|    |      | 24 植物抽出物セラミド3 μg                |             |          |               |

①-1-図1 菌株保存機関より購入した酵母のグルコシルセラミドのTLC分析

TLC条件

展開溶媒：クロロホルム：メタノール：酢酸：水（20：3.5：2.5：0.7）

展開距離：8cm

スポット量：3 μl

検出：硫酸-105℃処理

またセラミド生産候補株 *Kluyveromyces thermotolerans* の黒糖培地による50リットルジャーファーメンタ培養を行い回収菌体についてもTLC分析を行いセラミド含有を確認した。

#### <今後の課題>

①-1: *S. kluyveri* はグルコシルセラミド生産性酵母として知られているので今後、培地及び培養条件、抽出方法、条件の検討を加えた上で再分析を進めていきたい。

今回我々が *Pythium* sp. 株より見出した Hyp 含量は双子葉植物の一次細胞壁中の Hyp の乾燥重量とほぼ同量認められた。エクステンシンの合成量は細胞壁の成長時とその成長が停止した場合での Hyp 含量が大きく異なることから、最適な卵菌細胞の培養齢を特定し、より効率的な抽出精製を進めていきたい。グルコシルセラミドについては残る加水分解済みサンプルの TLC 分析を急ぎ特定の菌株を選抜し、それらの株については 50 リットルジャーファーメンタを用いて大量培養を行い各セラミドの詳細分析を進めていきたい。

#### ①-2: NMF 生産酵母・糸状菌の生産能の向上

##### <目的>

NMF 生産能を有する野生酵母の生産能力を高めるために、エタンスルホン酸メチル (EMS) 等の化学変異処理、紫外線による育種を行い、NMF 高生産酵母・糸状菌の取得を目指し育種を行った。

##### <方法>

モデル系として脂肪酸合成酵素の変異した株を取得するために、この酵素の特異的な阻害剤であるセルレニンを使用して育種を行った。セルレニンは脂肪酸合成酵素の縮合活性部位に不可逆的に結合して活性を阻害することが知られている。そこで、セルレニンに対する耐性株では脂肪酸合成酵素に何らかの変化が起こり、それによって活性が変化するために生成する脂肪酸の種類の変化に期待できる。そこでセラミド生産性が知られている *S. kluyveri* 及び *K. thermotolerans*、*L. kononenkoae* subsp. *kononenkoae* の 3 株について EMS により突然変異を誘起しセルレニン含有の YM 培地に生育可能な株を選抜し、さらに V8 培地のような子う胞子形成培地で子う胞子を形成させ、半数体株をマイクロマニピレーションにより単胞子を分離し、交雑育種によって親株よりセラミド蓄積量の多い株の造成を行った。

##### <結果>

3 株ずつ 25  $\mu$ M セルレニンに生育可能な酵母計 9 株の分離を EMS 変異処理により得ることに成功した。

#### <今後の課題>

現在これらの株の子う胞子形成を確認中である。今後、各々のグルコシルセラミド含量を比較していきたい。また、育種を進めていく上で他の脂肪合成阻害剤として知られる薬剤を用いて変異誘導を進めていきたい。またこれら酵母の一倍体は変異が容易に生じ、いわゆるバックミューテーションを発生しやすいので、高次倍数体を造成することも併せて行っていきたい。高次倍数体を減数分裂させることによって変異を生じさせ、得られた半数体の中か

らグルコシルセラミド高蓄積株を選抜していきたい。

## ②NMFの生産酵母・糸状菌による最適生産培養法の開発への対応

### ②-1-1 最適培養条件の検討

#### <目的>

①-1、①-2により得られたセラミド、植物コラーゲン生産菌を用いて、培地中の微量なミネラルやC/N比の最適条件を把握するとともに、小型ジャーファーメンタを用いた液体培養条件の最適化を行った。また、既にグルコシルセラミド生産が報告されている酵母 *K. thermotolerans* を使用し、菌体内に蓄えるグルコシルセラミドを分析する方法と確立を目的に合成培地を用いて生育条件の検討を行った。

#### <方法>

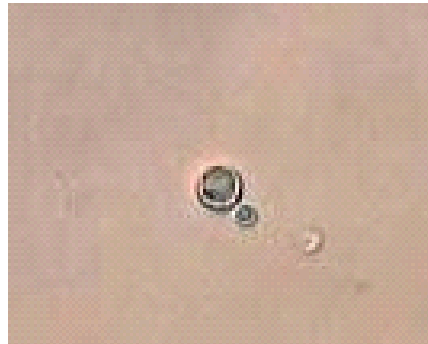
脂肪蓄積に関係するひとつの因子として「栄養源の制限」がある。C/N比を変えた Czapek Dox 培地での *L. kononkoe* subsp. *kononenkoe*、*L. starkeyi*、*K. thermotolerans*、*K. lactis* var. *lactis*、*S. Kluyveri*、*Y. lipolytica*、*R. benthica* 以上 8 株の脂肪粒の形成を調べた。また *K. thermotolerans* の炭素源の検討を加え、炭素源としてコハク酸、ガラクトース、ラクトース、マルトース、グルコース、スクロースをそれぞれ 1 % (w/v) 添加し、生育とそれに伴う pH の変化を確認した。培養条件としては 28℃ で坂口フラスコを用いて 110 strokes/min で振とう培養した。

#### <結果>

TLC により顕著なグルコシルセラミドの蓄積が認められた。*L. kononkoe* subsp. *kononenkoe* NBRC10339 においては通常区での静置培養区の生育が最も良かったが、振とう培養区では C 源を 1/4 に、N 源を 2 倍に増した区での生育が良好であった。さらに、これらの細胞を顕微鏡下で観察し細胞内の脂肪粒の蓄積を観察したところ、C 源を通常量にし N 源を 1/4 倍に減した区において増殖量の大小にかかわらず、細胞内に最大 70% 近くの大きな脂肪粒を確認することが出来た。以下に一例として TLC によってグルコシルセラミド含量の多い *L. kononkoe* subsp. *kononenkoe* NBRC10339 の振とう培養における細胞内への脂肪蓄積が確認された写真を添付した。



C 源：30g/ℓ N 源：2g/ℓ

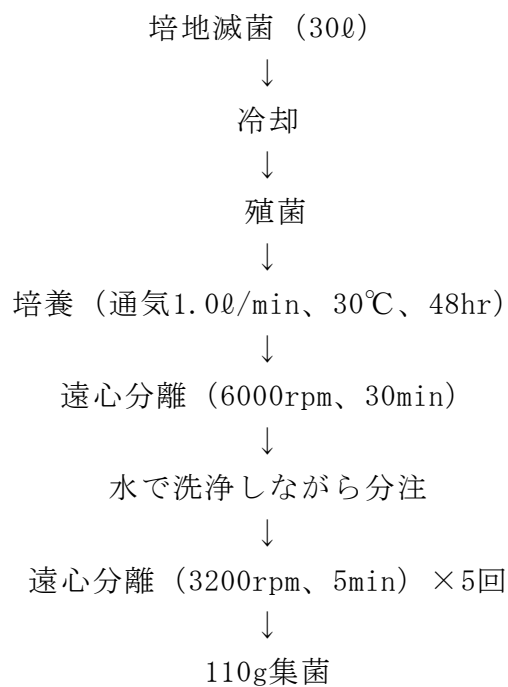


C 源：30g/ℓ N 源：0.5g/ℓ

②-1-1 図1 C/N比を変えた Czapek Dox 培地上での *Lipomyces kononkoe* subsp. *kononenkoe* NBRC10339 の細胞内の脂肪粒の蓄積

また、*K. thermotolerans* の炭素源の検討では単一炭素源として用いた場合スクロース、グルコース以外では、菌体の生育は確認できなかった。顕著な生育が見られたのはスクロースだった。このことから黒糖培養液での良好な生育が期待できる。また、*K. thermotolerans* の黒糖培地による 50 リットルジャーファーマンタ菌体回収量は 50 リットルジャーファーマンタでの菌体回収量は 100g/30ℓであった。

#### ・50 リットルジャーファーマンタによる培養方法



#### <今後の課題>

今後 C/N 比以外のグルコシルセラミド蓄積条件の検討を行っていききたい。具体的には初発 pH の影響をはじめ、塩類添加や培地への不飽和脂肪酸の添加、アルコールの添加、ビタミン、ミネラル添加の影響も併せて検討をしていきたい。

また培養細胞の培養齢による蓄積グルコシルセラミド含量についても検討していきたい。

### ②-1-2：細胞毒性試験

#### <目的>

細胞毒性陰性の菌株についてのみ生産性の向上及び低コスト生産法を検討することにした。そこで菌株を培養した後、菌体抽出液を調製し、ヒト培養細胞に対する細胞毒性試験を行った。

#### <方法>

試料調製方法を②-1-2 図 1 に示した。細胞毒性試験は、ヒト胎児肺由来正常 2 倍体線維芽細胞株である WI-38 細胞の培養液に菌体抽出液を添加、培養後の生存率を測定した。WI-38 細胞の培養は、10%非働化ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む MEM 培地中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件で行った。96 ウェル平底マイクロプレートに WI-38 細胞を  $1 \times 10^4$ /ml になるように 90 µl ずつ播種し、24 時間培養後に適宜希釈したサンプルを 10 µl 添加した。44 時間培養後に、テトラゾリウムを水溶性ホルマザンへ変換するミトコンドリア内の脱水素酵素活性により生細胞数を測定する方法である WST-1 法にて生存率を求めた。

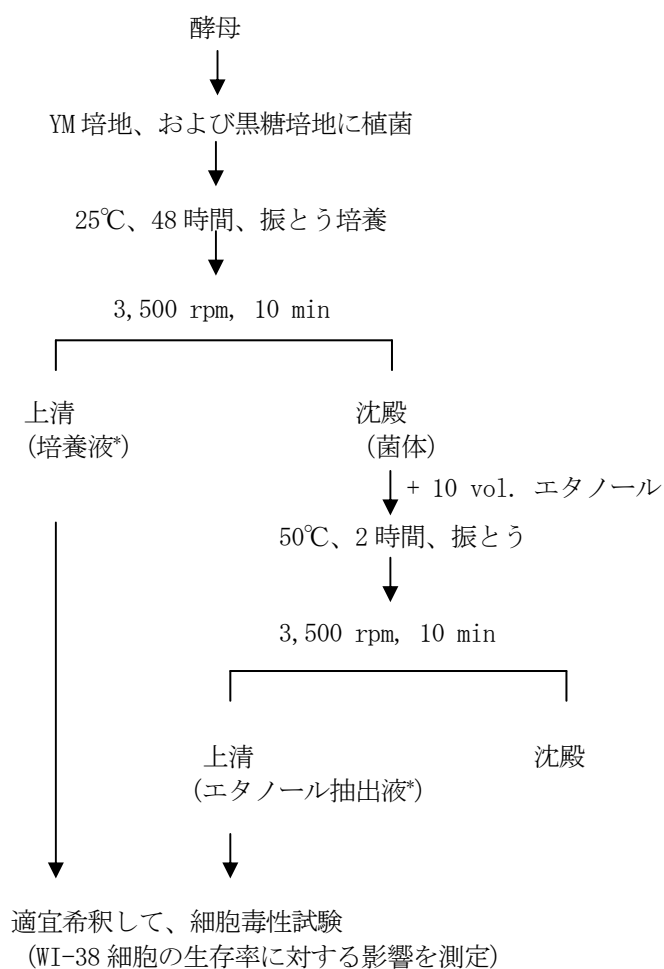
#### <結果>

菌株として酵母を用いたサンプル 120 点について、各々最終濃度が 1~32 µl /ml となるよう調整して細胞毒性試験を行ったが、培養液については生存率の減少は認められなかった。エタノール抽出液では、*S. kluyveri* AOK YK6、同 YK9、同 YK17、同 YK19 株で生存率の減少が見られた（②-1-2 図 2）。しかし、生存率を 50%以下にするほどの強い細胞毒性を示すものではなく、今回試験したサンプルについては、ほぼ細胞毒性はないと考えられる。

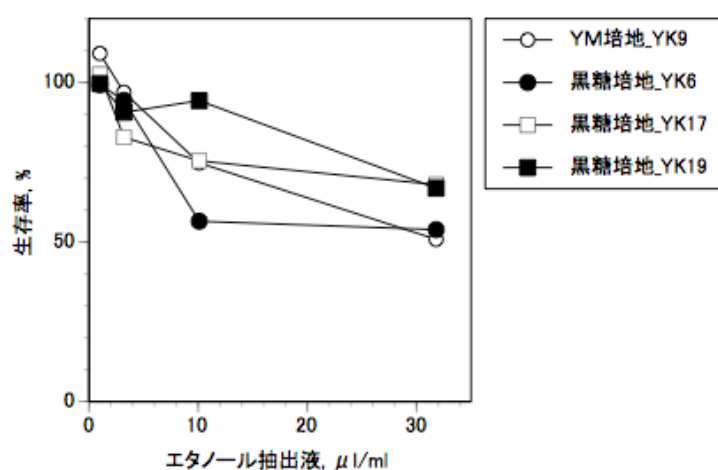
#### <今後の課題>

今後は、残りの酵母、および植物コラーゲン生産が期待される糸状菌についても試験を行い、細胞毒性陰性の株についてセラミド・植物コラーゲン生産能を向上させる方法について検討していく必要があると考えている。





②-1-2 図 1 細胞毒性試験のための試料調製方法



②-1-2 図 2 WI-38 細胞生存率の酵母エタノール抽出液添加濃度依存性

### ②-1-3：酵母抽出液の生理機能性評価

#### <目的>

近年、神経細胞から分泌される神経成長因子 Nerve Growth Factor (NGF) などの神経栄養因子が、加齢に伴う神経変性疾患に対して可能性のある治療剤として報告され、注目を集めている。本事業のグルコシルセラミド生産菌について、NGF と同じ作用を示すかどうかを評価することにした。

#### <方法>

菌体からのエタノール抽出液の調製は、②-1-2 の方法に準じた。  
NGF 様活性は、ラット副腎髄質褐色細胞腫から分離された PC12 細胞（東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから分譲）の培養液に菌体エタノール抽出液を添加、培養し、経時的に細胞の形態を観察することで行った。

#### <結果>

今回スクリーニングした菌株エタノール抽出液のうちのいくつかが神経突起伸長作用を有することが分かった。これらは、NGF 様作用剤として有用であると思われる。なお、グルコシルセラミド標品には、NGF 様活性は認められなかった。

#### <今後の課題>

他の菌株についての NGF 様活性測定、活性成分の単離・同定、および活性成分生産能を向上させるための方法（菌の変異、培養条件等）の検討等が課題であろう。

### ②-1-4： *K. thermotolerans* 由来グルコシルセラミドの抽出および分析条件の検討

#### <目的>

植物由来のセラミドを指標として分析条件の確立を行った後に *K. thermotolerans* の破碎液の作製および抽出操作を行い、グルコシルセラミドの検出を行うことを目的とした。

#### <方法>

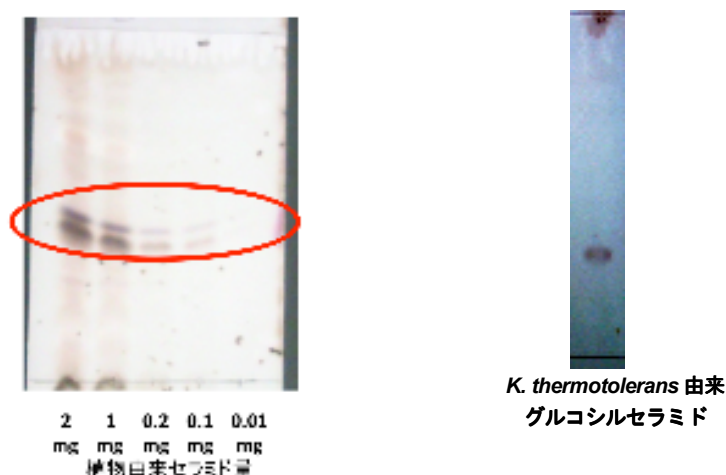
コメ由来のグルコシルセラミドを 2、1、0.2、0.1、0.02mg TLC にスポットし展開した。展開溶媒は(クロロホルム:メタノール:水=65:16:2(体積比))を用いた。50%硫酸(v/v)を噴霧後、105℃にて 15 分間加熱して発色させた。

グルコシルセラミドの HPLC による分析は以下の条件で行った。カラムは TSK gel ODS-80TM を直列に 2 本連結し、溶離液として 95%メタノールを流速 ; 0.7 ml/min で分離し UV210nm で検出した。*K. thermotolerans* 由来のグルコシルセラミドの抽出は、まず菌体を培養後、遠心分離機で集菌し、菌体を pH7、50mM リン酸緩衝液で懸濁した。この懸濁液をビーズミルにて 5 分間冷却しながら破碎した。破碎液をトリクロロ酢酸(終濃度 5%)でタンパク質を変性沈殿させ除去した後、ヘキサンを用いてセラミド抽出を行った。有機層を遠心エバポレーターで濃縮後、

メタノールに溶解してサンプルとして用いた。このサンプルを同様に TLC および HPLC を用いて分析した。

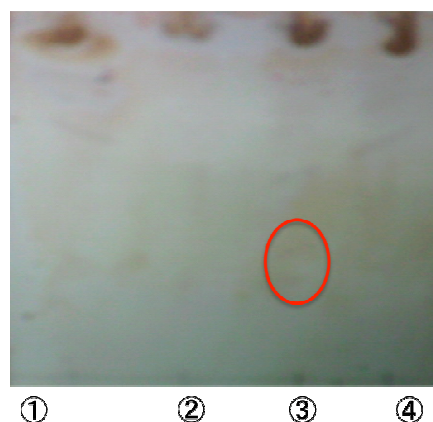
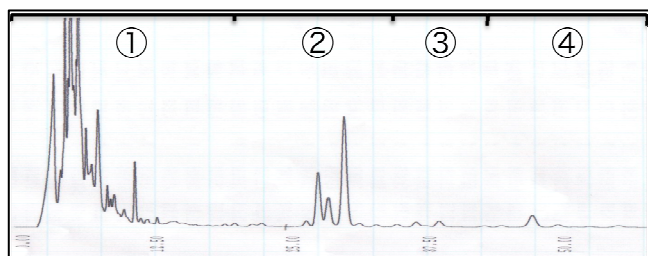
#### <結果>

植物由来のグルコシルセラミドを用いて各濃度における発色を確認した結果、サンプル量 0.1mg 程度まで検出できることが明らかとなった (②-1-4 図 1 左)。また、セラミド量が増加するにつれて発色が濃くなることが明らかとなったことから、この Rf 値に相当するスポットがグルコシルセラミドであることが明らかとなった。この条件を用いて *K. thermotolerans* グラスビーズ破碎液から抽出したサンプルを用いてグルコシルセラミドの検出を試みた (②-1-4 図 1 右)。この結果、植物由来グルコシルセラミドとほぼ同じ Rf 値にスポットが確認できた。しかし、植物由来のグルコシルセラミドでは常に 2 つのスポットが分離され *K. thermotolerans* 由来のものは 1 つのスポットしか検出されなかった。また、硫酸による発色においても植物由来のものは褐色を示すのに対し、*K. thermotolerans* 由来のものは赤味の強い発色をする特徴が見られた。

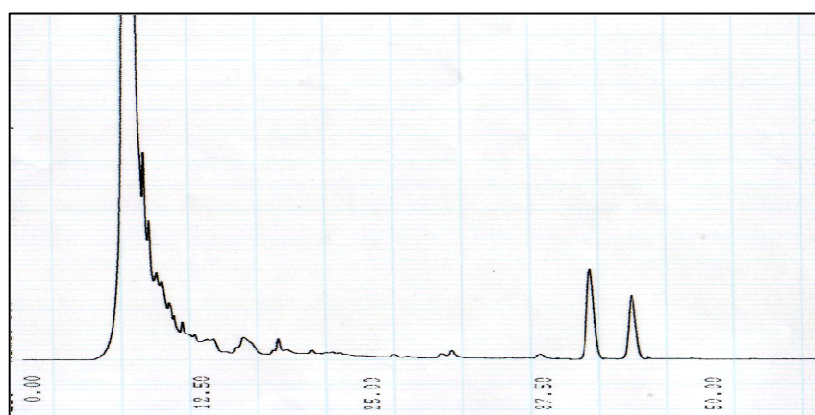


②-1-4 図 1 グルコシルセラミドの TLC による検出

そこで、TLC にて検出されたスポットに含まれるグルコシルセラミドのさらなる分離と好感度での微量検出を目的として HPLC による分析を検討した。ピークを分取し、濃縮後、再度 TLC により相当するグルコシルセラミドであることを確認した (②-1-4-図 2)。この結果より、分画③の 40 分前後にグルコシルセラミドに由来する 2 つのピークが検出されることが明らかとなった。さらにシリカゲルカラムを用いて精製濃縮を行い、HPLC により分析した (②-2-4-図 3)。この結果、HPLC を用いて感度よく検出でき、主要な TLC におけるスポットに由来するグルコシルセラミドの HPLC での同定を行うことができた。



②-1-4 図2 *K. thermotolerans* 由来グルコシルセラミドの HPLC による検出



②-1-4 図3 *K. thermotolerans* 由来グルコシルセラミド濃縮物の HPLC クロマトグラム

#### <今後の課題>

上述した TLC と HPLC を用いる手法で極めて感度良く *K. thermotolerans* のグルコシルセラミドを分析する技術を確認したので②-1-4 は完了とする。

#### ②-1-5: *K. thermotolerans* 溶菌酵素を用いたグルコシルセラミドの抽出

##### <目的>

ここではデータを示さないが培養液の界面活性剤の添加によるグルコシルセラミドの抽出を試みたが、本法によるグルコシルセラミドの漏出は難しく、菌体に蓄えたグルコシルセラミドを効率良く抽出する方法として菌体をできるだけ穏やかな条件で破壊し漏出させることができれば菌体の回収や抽出の操作が省略できる。このような目的のため、*K. thermotolerans* を溶菌させる酵素を取得し検討した。

## <方法>

熱処理酵母寒天培地にて溶菌活性を持つ菌株分離を試みた。 $K_2HPO_4$  1g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g/L に、*K. thermotolerans* 菌体を 70g/L となるように加えた熱処理酵母平板培地を作製した。サンプルは 0.75%滅菌生理食塩水 1mL に懸濁して用いた。培養は好氣的条件下 28℃で行った。*K. thermotolerans* 溶菌に伴うクリアゾーンを形成した菌株を選別し、平板培養を繰り返し行い菌体の単離を行った。溶菌酵素を用いたグルコシルセラミドの抽出の検討では上記培養液を用いて溶菌活性を有する菌株を培養後、遠心分離にて菌体を除去した上清液を酵素液として用いた。菌体と酵素液を混合し、30℃にて振とう反応させた。抽出操作は②-1-3 に従った。

## <結果>

平板培養の結果、クリアゾーンを形成する菌株を 11 株分離し、その内大きいクリアゾーンを形成した 2 株 (NT2 株, NT26 株) を以後の実験に用いた。

これら 2 株は遺伝子解析の結果 *Cellulosimicrobium* sp. *Bacillus pumilus* と同定され、ともに病原性は報告されておらず、バイオセーフティーレベル 1 の菌株であった。*K. thermotolerans* に対する溶菌活性を分離菌株の培養液のみを用いて反応させた。反応後の顕微鏡観察の結果、NT2 株由来酵素は酵母の原型を残さず溶菌するのに対し、NT26 株由来の酵素はプロトプラスト状の形態が残ることが確認できた。

次に溶菌酵素を用いたグルコシルセラミドの抽出を試みた。*K. thermotolerans* を YPD 培地で培養後、菌体 1.5 g (湿重量) を用いてグルコシルセラミドの抽出を行った。米糠由来のグルコシルセラミドから推定される Rf 値周辺に少量菌体からでも TLC で発色を確認できるグルコシルセラミドを検出することができた。

酵母の生産するグルコシルセラミドは強固な細胞壁中にあり、いくつかの検討を加えたが、培養液中に検出できるほど漏出してくることはなかった。このことよりグルコシルセラミドを抽出するには何らかの機械的な操作が必要であるが、これらの操作により水溶性の低いグルコシルセラミドの生産性を培養条件から定量的に評価することは難しいと考えられる。溶菌酵素とガラスビーズで破碎抽出した方法を比較すると検出に必要な菌体量は 10 分の 1 以下であった。このことから、操作ステップを大幅に少なくできることからグルコシルセラミド抽出効率も大幅に上昇したためと考えられる。

## <今後の課題>

溶菌酵素を用いた抽出方法は機械的な操作に比べて抽出効率も操作性も良いことから、今後溶菌酵素による抽出法を採用することによって、本技術は完成したものとする。

## ②-2：植物性有機廃棄物を用いた低コスト生産法の開発

### ②-2-1：植物性有機廃棄物の培地としての適性

#### <目的>

原材料のコスト削減を目指し、市販培地による NMF 生産とは別に発酵培地として秋田県内

で植物性有機廃棄物として多量に副産する安価な米糠、おから、リンゴ搾汁粕等に部分的に代替することにより、市販培地と同等の NMF 生産性を維持することにより原料コストの 50% 削減を目指した。

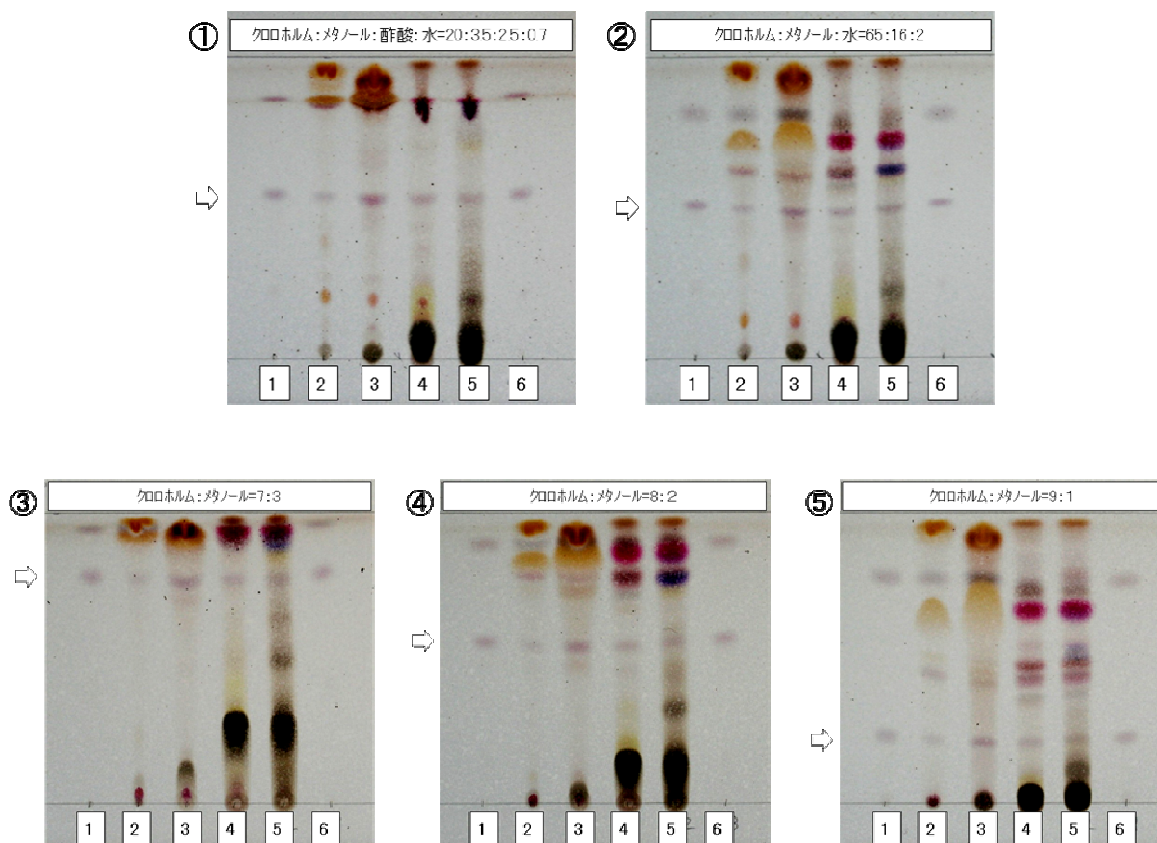
#### <方法>

培地となる植物性有機廃棄物中に含まれる栄養成分を比較した。また、これらに含まれる NMF 分析を行った。

#### <結果>

各植物性有機廃棄物中に含まれる栄養成分は培地成分としては各植物性有機廃棄物に十分な C 源、N 源及び灰分が含有されており、いずれにも各種微生物の増殖が可能であった。

次にこれら各植物性有機廃棄物に含有されるグルコシルセラミドの分析を行った。結果は②-2 図 1 に示した。



②-2-1 図1 おから、米糠、リンゴ搾汁粕（ふじ）、リンゴ搾汁粕（つがる）サンプル中の TLC によるセラミド分析

・サンプル

- |   |             |
|---|-------------|
| 1 | 植物由来セラミド    |
| 2 | おから         |
| 3 | 米糠          |
| 4 | リンゴ搾汁粕（ふじ）  |
| 5 | リンゴ搾汁粕（つがる） |
| 6 | 植物由来セラミド    |

・展開溶媒

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| ① | クロロホルム：メタノール：酢酸：水＝20：3.5：2.5：0.7 |
| ② | クロロホルム：メタノール：水＝6.5：16：2          |
| ③ | クロロホルム：メタノール＝7：3                 |
| ④ | クロロホルム：メタノール＝8：2                 |
| ⑤ | クロロホルム：メタノール＝9：1                 |

米糠・おから・リンゴ搾汁粕中のエタノール抽出液の TLC 分析を行い各サンプルからグルコシルセラミドが検出された。グルコシルセラミド含量は米糠が比較的多く、またリンゴ搾汁粕中には米糠・おからに検出されないスポットも確認された。

次にこれら植物性有機廃棄物（おから、米糠、リンゴ搾汁粕）中の Hyp とすでに我々によって見出された *Pythium* sp. AOK HD-1 株の Hyp、市販のマリンコラーゲンである FCP-A（魚由来）の Hyp の比較分析を行った結果、おから 1.24mg/g-Dry、米糠 0.37 mg/g-Dry、リンゴ搾汁粕（ふじ）0.21mg/g-Dry、リンゴ搾汁粕（つがる）0.04mg/g-Dry、*Pythium* sp. AOK HKD-1 9.00 mg/g-Dry であった。市販動物性コラーゲンの含有量は 73.3mg/g-Dry であった。おからには米糠と比べて

3 倍以上の Hyp が含有されていたが、リンゴ搾汁粕においてはその品種により Hyp の含有量に差がみられ「ふじ」は「つがる」の 5 倍以上の Hyp の蓄積が認められた。

#### <今後の課題>

高桑らによるとリンゴ搾汁残渣に沢山のグルコシルセラミドを含有するとの報告があるので、今後リンゴ搾汁粕からの抽出方法の再検討を行っていき、より安定したグルコシルセラミドの収量が得られる条件を確立していきたい。また、これらの植物性有機廃棄物をグルコシルセラミド高生産性微生物の培地として用いた場合の蓄積量も分析していきたい。

同様に Hyp 高蓄積性微生物の培地としての植物性有機廃棄物の高度利用もあわせて行っていく方針である。

### ②-2-1：黒糖培地を用いた酵母(*K. thermotolerans*)溶菌液の作製

#### <目的>

植物性原料を用いた NMF 生産を具体的なものとするため、*K. thermotolerans* を黒糖水溶液用いて培養し、溶菌酵素を用いてセラミド抽出が可能であるか検討することを目的とした。

#### <方法>

培地は 5% (w/v) 黒糖溶液 500 ml (pH6.0 無調整) を用いた。前培養は YPD 培地 28℃で 3 日間培養後、小型ジャーファーマンタにて培養(28℃, 300 ml air/min, 400 rpm)した。培養終了後オートクレーブにて滅菌処理し、pH 7.5 に調整した。その後 NT2 培養液上清を酵素液として 10ml、4,800U 相当を添加した。ここで 1U は 30℃で 30 分間に *S. cerevisiae* 懸濁液 OD<sub>800</sub>=1 を 10%減少させる酵素量と定義した。溶菌反応終了後 オートクレーブにて滅菌および酵素の変性失活処理をした。この溶菌過程を顕微鏡観察した。

#### <結果>

黒糖培地への *K. thermotolerans* の生育を濁度の上昇と pH の変化で経時観察した。乳酸生産およびアルコール発酵による炭酸の溶解に由来すると考えられる pH の低下が見られた。NT2 株由来の酵素は中性付近で培養を行っているため溶菌酵素も中性付近に最適反応 pH と持つと考えられる。このことから、黒糖発酵液の pH を中性付近まで戻したのちに酵素を添加した。黒糖発酵液の菌体に対しても溶菌酵素は分解活性を示した。約 1 日反応後の溶菌液では菌体はほとんど見られず、溶菌に伴う残渣が確認できた。酵素濃度を上げることや反応温度を検討することでさらに短時間で溶菌に伴うグルコシルセラミド抽出を行うことができると考えられる。

#### <今後の課題>

溶菌酵素を用いた効率的なグルコシルセラミド抽出法を確立できた。今後、溶菌酵素の酵素化学的な性質を検討することでさらに効率的な酵素添加量や反応至適 pH および温度など数値に基づいた添加が可能になると考えられる。また、*Cellulosimicrobium* sp. NT2 と *Bacillus*



*pumilus* NT26 の酵素化学的性質および溶菌機作も効率的な抽出に寄与する可能性が考えられる。また、酵素の供給源が現在酵母菌体そのものを使うこともあり、酵素の調製に時間がかかることがあげられる。今後、廃ビール酵母などの適用が可能であるか、培養条件を検討することが必要であると考えられる。

## ②-3：②-2により得られたNMFと既知のNMFとの比較解析

設定した条件にて、植物由来の市販セラミドと本研究により得られた酵母由来セラミドの比較を行い、それぞれの特徴を確認した。

また、コラーゲンに関しても短時間で簡易的に Hyp を分析出来る条件を検討し、動物由来の市販コラーゲンと本研究により得られた酵母由来の Hyp の比較を行った。

### ②-3-1：ダイオードアレイ検出器を用いたグルコシルセラミド分析

#### <目的>

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）での分析条件の検討を行った後、チャートパターンの比較を行った。

#### <方法>

サンプルを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。分析方法としては、検出器をダイオードアレイ検出器として、三次元データ解析を行った。

さらに、*K. thermotolerans* 黒糖発酵液を HPLC 分析して、グルコシルセラミド含有の確認を行った。

#### <結果>

TLC で精製したサンプルおよび逆相クロマトグラフィーで精製したサンプルを解析した。TLC で1スポットであっても、多くの成分が含まれ、Rt は異なるが、三次元スペクトラムが同様であることを確認した。また、逆相クロマトグラフィーでの精製サンプル結果より、グルコシルセラミドのスペクトラムは吸収極大波長を持たないことを確認した。

これらの結果より、今回検討を行ったダイオードアレイ検出器を用いた三次元分析で解析を行うことで、短時間で簡易にグルコシルセラミドの有無と相対的な量を比較できることが明らかになった。

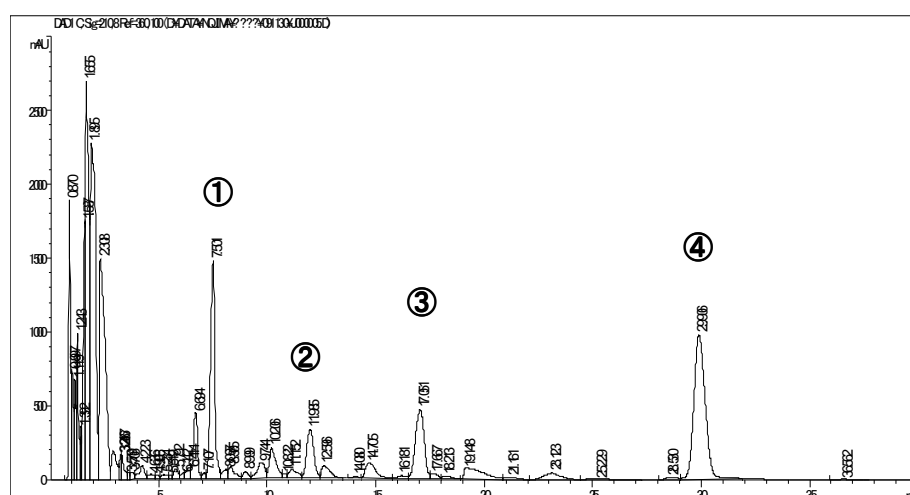
*K. thermotolerans* 黒糖発酵液を HPLC 分析した結果、グルコシルセラミドと思われるピーク④を確認することが出来た（②-3-1 図 1）。また、その他のピークは極大吸収波長を持っていたことから、グルコシルセラミドとは異なるピークであると判断した。今回調製した *K. thermotolerans* 黒糖発酵液は、単一のグルコシルセラミドが含まれていることが示唆された。

#### <今後の課題>

グルコシルセラミドに関しては、汎用的な検出器であるダイオードアレイ検出器にてパター

ン分析が可能となったので今後微生物が生産するグルコシルセラミドの種差を確認し、バリア機能と水分保持能がともに高い発酵液の開発を目指す。

グルコシルセラミドに特異的な抗体、および糖のついていないセラミドに特異的な抗体を用いたセラミド定量法を確立することで、迅速、簡便な分析が可能になるよう取り組む。



②-3-1 図1 *K. thermotolerans* 黒糖発酵液の HPLC 分析チャート

## ②-3-2：逆相カラムを用いた Hyp 分析

### <目的>

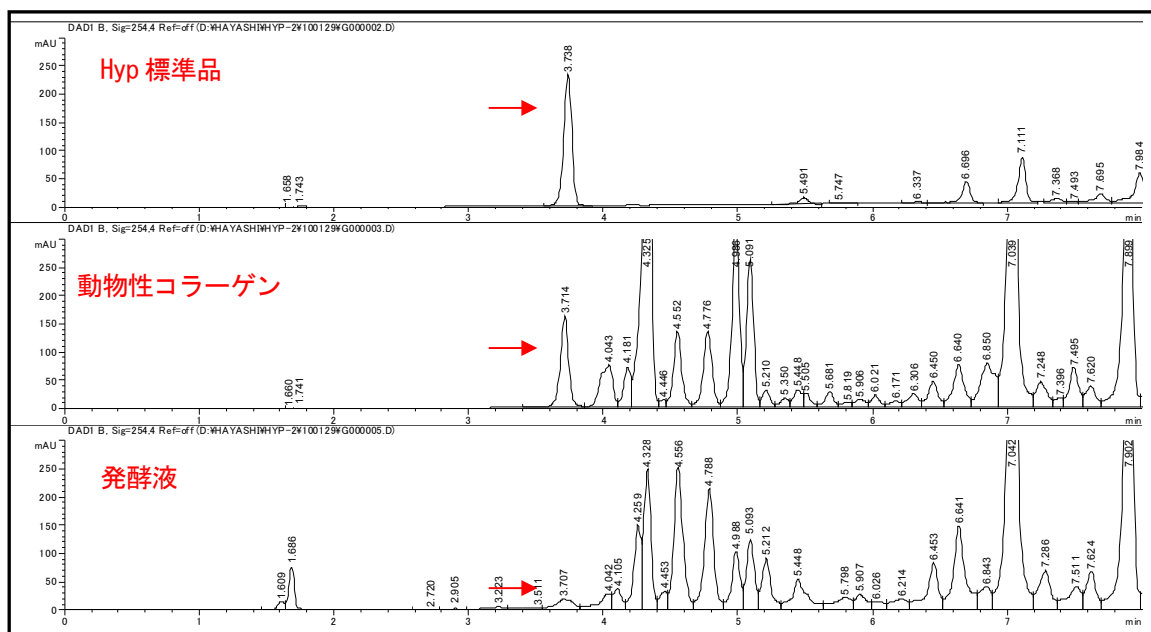
動物由来の市販コラーゲンと、*K. thermotolerans* 黒糖発酵液のアミノ酸組成を比較するために、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）での分析条件の検討を行った後、チャートパターンの比較を行った。

### <方法>

サンプルを秤取したダーラム管をバイアル瓶につめた後、ミニナートバブルでバイアル瓶を密封した。密封したバイアル瓶を 150℃で 4 時間加熱処理を行ったサンプルを Phenyl Isothiocyanate で処理を行い誘導体化させた後、HPLC 分析を行った。

### <結果>

市販コラーゲンの Hyp 含量が 7%であるのに対して、*K. thermotolerans* 黒糖発酵液にも 0.14%と微量であるがHypが含まれていることが確認できた。PITCでのラベル化は感度が高く、低濃度でも分析が可能であることを確認した（②-3-2 図1）。



②-3-2 図1 Hyp 分析チャート

#### <今後の課題>

Hyp に関しては、感度の高い短時間分析方法の確立は出来たが、*K. thermotolerans* 黒糖発酵液には低濃度しか含まれていなかったため、スクリーニングからピックアップされた菌株に関して同様な試験を行う。

### ③ 生物学的効果及び物理学的効果の検証

#### ③-1：生物学的効果の検証

NMF を含有する *K. thermotolerans* 黒糖発酵液を化粧料として調整し、生物学的に効果を有するか検証した。

##### ③-1-1 *K. thermotolerans* 黒糖発酵液の有効性評価

#### <目的>

発酵によるグルコシルセラミドおよびHypの付加を目指して検討を進めているが、*in vitro* 評価による発酵前後での有効性の相違を確認した。

#### <方法>

調整した化粧料を、各試験に使用した。

#### <結果>

様々な *in vitro* 評価を行い、既存の市販 NMF 製品と比較して発酵による有効性の上昇が確認され、特許出願の準備を進めている。

#### <今後の課題>

同酵母黒糖発酵液に既存の市販 NMF 製品と比較して新規性が認められたので、特許出願準備を進めていく。

### ③-1-2：生物学的安全性の検証Ⅰ急性毒性試験

#### <目的>

*K. thermotolerans* 黒糖発酵液を化粧品として製品化を行うための人での評価を行なうためには、生物学的に安全であると証明する必要がある。そこで、動物を用いて急性毒性試験を実施した。

#### <方法>

上記③-1-1の方法で調整した *K. thermotolerans* 黒糖発酵液を用いてマウスにおける急性毒性試験を実施した。

#### <結果>

被験物質投与群に関しては観察期間中、死亡例および一般状態の異常はなく、マウスの体重変化においても対照群と同様の増加傾向を示し特に異常は認められなかった。各投与群の代表例について、剖検を行ったところ、特に異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下で *K. thermotolerans* 黒糖発酵液の LD<sub>50</sub> 値は 2000mg/kg 以上であることが分かり、安全性において特に問題はないと結論された。

#### <今後の課題>

今後スクリーニングアップされた菌株について、同様のマウスにおける急性毒性試験を行い安全性の確認を進めていく。

### ③-1-3：生物学的安全性の検証Ⅰ皮膚感作性試験

#### <目的>

*K. thermotolerans* 黒糖発酵液の安全性試験の一環として、モルモットを用いた皮膚感作性試験を Maximization 法により実施した。

#### <方法>

上記③-1-1の方法で調整した *K. thermotolerans* 黒糖発酵液を用いてモルモット皮膚における皮膚感作性試験を実施した。

#### <結果>

被験物質感作群・被験物質非感作群では、惹起処置後 24 及び 48 時間目いずれにも、紅斑や浮腫等の皮膚反応は全く認められなかった。全例の一般状態に特記すべき変化は認められな

かった。

以上の結果から、本試験条件下で *K. thermotolerans* 黒糖発酵液には原液の使用においても皮膚感作性はないと結論された。

#### <今後の課題>

*K. thermotolerans* 黒糖発酵液の有効性評価結果より、黒糖に確認できない作用が発酵後の黒糖培地に確認された。補足データを採取終了後、特許出願作業を目指す。

また、急性毒性試験および皮膚感作性試験の結果から *K. thermotolerans* 黒糖発酵液が生物学的に安全であることが確認されたことから、製剤での安定性が担保できる発酵条件検討を早期に解決させ、上記安全性を含む7項目の安全性試験を実施し、ヒト試験へとステップアップを目指す。

### ③-2：物理学的効果の検証

酵母・糸状菌由来の NMF を用いて製品化するための物理化学特性を検証した。化粧品・医薬部外品に配合されている原料との相溶性や pH の安定性、熱安定性に加え製品配合試験を行った。また、製剤化された製品の効果を物理学的に検証した。

#### ③-2-1：化粧料の創造Ⅰと安定性試験

##### <目的>

*K. thermotolerans* を用いて黒糖溶液を発酵させ、化粧料として調整を行なった後、光照射による加速試験を実施した。

##### <方法>

調整した化粧料を 40℃・20000lx（蛍光灯 FL40SS・W/37）下で保管し、色調の変化を確認した。

##### <結果>

今回調整した黒糖発酵液は、にごり、沈殿なども問題は確認されなかったが、光照射下で 25% ほど退色が進むことを確認した。

#### <今後の課題>

黒糖発酵液が化粧料製品で安定であるような製剤化をさらに検討していくとともに、今後スクリーニングアップされたサンプルにおいても化粧料としての同様の安全性試験を進めていく。

#### ③-2-2：化粧料の創造Ⅱと安定性試験

##### <目的>

*K. thermotolerans* を用いて黒糖溶液を発酵させ、化粧料として調整を行なった後、光照射による加速試験と各温度における保存安定性試験を実施した。

#### <方法>

下記のフローで調整した化粧料を、5℃・遮光、室温・露光、40℃・遮光の条件下で保管し、色調の変化およびオリの有無の確認、pH、乳酸量測定を行なった。

(サンプルは12ヶ月前に調整しており今回の研究の参考データとして記載する)

#### <結果>

固形1%化粧料では、40℃・遮光の保管で着色、オリの発生、pHの低下が見られるため、現状の調製方法だと冷蔵保管の必要性が示唆された。

#### <今後の課題>

今後スクリーニングアップされたサンプルにおいても化粧料としての同様の安全性試験を進めていく。

### ③-2-3：化粧料の製剤化検討

#### <目的>

化粧料の製剤化において、安定である添加剤の配合について検討した。

#### <方法>

化粧料基剤として下記の5つの化粧料を調整し、上記の安定性試験の結果を考慮して *K. thermotolerans* 黒糖発酵液が安定である製剤化を検討した。

- I 固形1.0%・BG30 %
- II 固形0.1%・BG30 %
- III 固形0.1%・BG10 %
- IV 固形0.1%・BG10 %・フェノキシエタノール0.5 %

#### <結果>

約2週間の室温静置で微生物のコロニーが確認された。BG10%では防腐効果が弱く安定に保管が出来なかった。I、II、IVは目視での色の変化・臭いの変化は確認されなかったが、黒糖発酵液の固形濃度は0.1%が好ましい。

#### <今後の課題>

BG30%もしくはBG10%にフェノキシエタノール0.5%を添加することで、微生物の繁殖を抑えられると考えられるので本サンプルと同様、今後スクリーニングアップされたサンプルにおいても同様の製剤化検討を加えていく。

### ③-2-4：保湿性試験

#### <目的>

化粧品としての物理的機能として、保湿効果は最も重要視される。そこで、ペーパーディスク法を用いて水分残存率を測定し、保湿の効果を検証した。

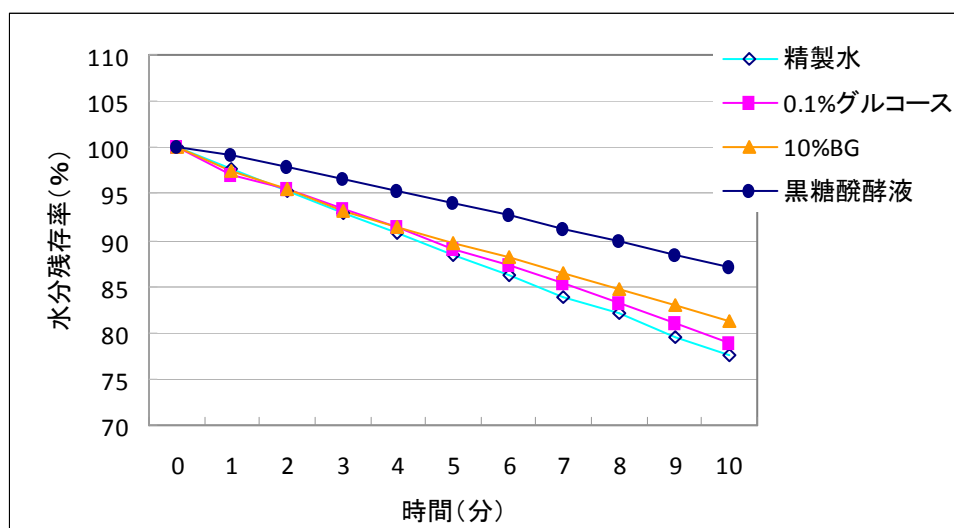
#### <方法>

*K. thermotolerans* を用いて黒糖溶液を発酵させ、化粧品として調整を行なった後にペーパーディスク法により保湿性試験を行った。

#### <結果>

室温 25℃、湿度 60%の部屋で試験を行った。

固形 0.1%・10%BG 黒発酵醗液は、固形 0.1%グルコース溶液および 10%BG 水溶液と比較して保湿性が認められた (③-2-4 図1)。



③-2-4 図1 黒糖発酵液の水分残存率

#### <今後の課題>

ペーパーディスク法による保湿試験の結果、保湿化粧品として有効であることが示唆されている。今後、異なるパターンで試作を行い、安定性の高い製剤を検討する必要がある。また、今回調製したグルコシルセラミド含量や Hyp 含量などを測定し、商品力の高い製剤化を目指す。

## 第3章 総括

### 3-1 全体総括

現在、優れた皮膚 NMF であるセラミドとコラーゲンは、ヒアルロン酸と並ぶ重要なスキンケア素材である。しかし、動物由来の素材は分離精製が煩雑で製造コストが高く臭いもある。植物由来の素材は含有量が少なく、さらに高価である。そこで本事業は自然界の中から保湿因子高生産酵母・糸状菌を探索し、安価な食品廃棄物を発酵培地とする培養法で無臭で低コストなセラミドとコラーゲンの生産技術を開発する目的で行われ以下の結論を得るに至った。

1. スクリーニング株の中の卵菌類の一種が多量の Hyp を蓄積することを見出した。微生物の生産物であるがゆえに、植物のように長い生育期間を持つことなく多量の微生物由来コラーゲンを短期間で得ることが出来る方法を確立した。

また、既知の酵母とは別種の酵母のなかに、グルコシルセラミド高蓄積株を見出した。

2. また既知のグルコシルセラミド生産性菌株として知られる酵母 3 株について脂肪酸合成酵素の阻害剤であるセルレニンを用いてセルレニン耐性株の取得に成功した。また、TLC と HPLC を用いる手法で極めて感度良く *K. thermotolerans* のグルコシルセラミドを分析する技術を確立した。グルコシルセラミド生産を蓄積させるための最適な培養条件の検討として C/N 比が重要であることを明らかにするとともに、植物性有機廃棄物中にも NMF 成分が含有されることから有望な培地であることを明らかにし、安価な大量生産開発の足がかりになった。また、グルコシルセラミドの抽出に関して抽出効率をあげるために考案された酵母細胞壁溶解酵素を用いることにより極めて効率よくかつ低コストでグルコシルセラミドを抽出することに成功した。

3. フルーツ、米、こんにゃく由来の植物由来グルコシルセラミドと微生物由来のそれを比較すると相互に異なる生産物をつくることから、微生物由来セラミドに付加価値が付与される可能性が示唆された。また、モデル系の酵母を用いた生物的效果については、安全性の確認がなされた。さらには、物理学的効果の検証についても褐変瓶での冷蔵保管が望ましいことやフェノキシエタノール等の添加により防腐が可能であることを明らかにしたことによって製品化の足がかりが出来た。

以上の結果から安価な食品廃棄物を発酵培地とし、保湿因子高生産酵母・糸状菌を培養し無臭で低コストなセラミドコラーゲンの生産技術に基づき事業化する意義と見通しが得られたものと判断し、今後もモデル系の微生物以上の NMF 生産性を有する微生物の探索を進めていくことはもちろん、これらに高付加価値が付与出来るように様々な角度から事業化に向けた研究を持続していく方針である。



### 3-2 事業終了後の方針

#### ①-1：NMF生産酵母・糸状菌の選定

我々は既にこの450株にも及ぶユニークな菌株の2つの方法による液体培養物、すなわちYM培地(イーストマルトエキス培地)及び黒糖培地の静置培養及び振とう培養により得られた菌膜及び培養液を集め(サンプル総数 1800)グルコシルセラミド分析用のサンプルとコラーゲン蓄積量の指標になる Hyp 分析用として加水分解処理まですすめることにより、総サンプル 3600にも及ぶ多量の処理を実施中である。静置培養には培養日数が7日を要するので本事業期間内に処理できるサンプルの数には限界があり現在 642 サンプルのグルコシルセラミド、Hyp の分析が終了しているが30 サンプルは現在もなお日々分析進行中である

既に我々は分析を終えたサンプルの中には今まで報告のない *Pythium* sp. 株による双子葉植物由来コラーゲン(エクステンシン)と同等の生産性を持つ菌株を見出している。エクステンシンは植物由来であるため生長した植物体からの抽出精製と大変煩雑な方法により得られるが、微生物であれば容易にかつ無尽蔵に増殖させることは可能である。さらに植物体細胞壁と異なり特に *Pythium* sp. 株は容易に細胞壁を破壊することが可能であり、植物に含まれる Hyp の 0.1～1%と比べて本菌株の生産量 0.9%はエクステンシンと充分に対向できる素材として考えられる。

今後残るサンプルの分析を日々進めていく方針であり早い製品化を目指す。

#### ①-2：NMF生産酵母・糸状菌の生産能力向上

①-1 によってスクリーニングアップされた高 NMF 生産菌(高 Hyp の蓄積株)(高グルコシルセラミド蓄積株)は、さらなる生産能力の向上に向けて EMS 処理(エタンスルホン酸メチル)を行い子のう胞子を形成させることにより、より交雑も可能になり、より高い NMF 生産株が育種出来る可能性を持つものである。今後さらなる変異誘導、濃縮、子のう胞子形成、単胞子分離、交雑の手法を駆使し育種を進め製品化を目指す。

#### ②-1：最適培養条件の検討

脂肪蓄積に関係する因子として、細胞内でのエネルギーが余剰になれば脂質が貯蓄されるという関係本酵素の生産性を変え脂肪蓄積の動向を調べる必要がある。選択株のグルコシルセラミドの高蓄積条件を検討し該当微生物の製品化に結び付けたい。

また我々はこれら微生物の蓄積したグルコシルセラミドの効率的な抽出方法も既に細菌の生産する溶菌酵素により成功しており、本技術の特許出願を急ぎたい。最終的な製品化に向けて低コストの抽出法として本技術の実用的な確立を目指す。

また、いくつかのグルコシルセラミド生産菌が、NGF 様活性成分を生産していることを見いだしたので、特許出願を行いたい。NGF に関した新しい事業化の芽を見出すことができた意義は大きいと考えている。

#### ②-2：植物性有機廃棄物を用いた低コスト生産法の開発

グルコシルセラミド生産酵母として知られる *K. thermotolerans* はスクロースでの生育が極めて良好であるので黒糖培地は有望なグルコシルセラミド培地と言える。黒糖培地を用いることにより、よりストレス耐性の強い酵母を培養することが可能になり製品化の上では大きいメリットとなりうる。そこで、今後事業化に向けて本培地(黒糖)の優位性を、さらに探ると共にそれらを付与した高付加価値製品化を目指す。

各植物性有機廃棄物には米糠はグルコシルセラミドがおからにはコラーゲン蓄積量の指標となる Hyp の含量がほかの植物性有機廃棄物と比較して多く含有されることから、これらを培地にしてスクリーニングアップされた微生物の培養を行いグルコシルセラミド及び Hyp の安定した蓄積をはかり具体的に数値化出来る生産コストの低減化を目指す。

### ②-3：②-2により得られたNMFと既知のNMFとの比較解析

今後事業化に向けては、植物由来セラミドや植物由来コラーゲン、動物由来セラミドや動物由来セラミドと比較して具体的なそれぞれのアミノ酸組成やステロール配糖体の含量、セラミドの脂肪酸、スフィンゴ脂質の構成成分の分析を行い、微生物由来コラーゲン、セラミドの特性を把握していく。

### ③-1：生物学的効果の検証

既に我々は *K. thermotolerans* 発酵液に抗炎症作用があり、急性毒性、皮膚感作性は無いことを明らかにしたので、次の段階で MNF を含有した化粧品を調整しその化粧品の有効性を 6 名の男女(27～60 歳)と対象に MNF 含有化粧品と非含有化粧品の比較をシリコーンレプリカ法により測定しその有効性の確認の上で事業化に結び付けたい。

### ③-2：物理学的効果の検証

既に我々は光、熱安定性、pH について *K. thermotolerans* の発酵液を用いた化粧品として安定性試験を実施しているが、事業化に向けてさらなる詳細な条件の設定を化粧品基材の相溶性や製品配合試験などを実施した上で事業化を目指したい。