

平成 2 8 年度

博士

学位論文

エチル- α -D-グルコシド発酵生産法の開発と新規保湿
機能および線維芽細胞に与える影響に関する研究

金沢工業大学大学院 工学研究科

バイオ・化学専攻

7400056

坊垣 隆之

指導教授 尾関 健二 教授

目次

第1章 序章	1
第1節 研究の背景	2
第2節 既往研究と研究開始時における課題	5
第1項 製造法	5
第2項 α -EG の機能性	6
第3節 本研究の目的	7
第4節 本研究の成果と意義	8
第2章 α -EG 高含有酒の発酵生産法の開発	12
第1節 緒言	13
第2節 材料および方法	15
第1項 材料	15
第2項 方法	16
第3節 結果および考察	21
第1項 麹菌の選定	21
第2項 酵母，麹および麹歩合の検討	24
第3項 酵素剤添加量が α -EG の生産性に与える影響	26
第4節 小括	29
第3章 発酵生産法による α -EG を高含有する焼酎もろみの開発	31
第1節 緒言	32
第2節 材料および方法	33
第1項 材料	33
第2項 方法	33

第3節 結果および考察	40
第1項 麴と酵素剤の添加量の検討	40
第2項 もろみに添加する麴量と二次発酵温度の検討	42
第3項 焼酎の官能評価	45
第4節 小括	47
第4章 清酒醸造副産物を利用した α -EG 高含有酒粕再発酵酒の発酵生産法の 開発	50
第1節 緒言	51
第2節 材料および方法	53
第1項 材料	53
第2項 方法	54
第3節 結果および考察	59
第1項 酒粕と α 化米添加量の検討	59
第2項 汲み水量の検討	60
第3項 α -グルコシダーゼの種類と使用量の検討	61
第4項 酒粕添加の必要性の検討	62
第5項 白ヌカ液化液の液化条件の検討	63
第6項 白ヌカ液化液添加量の検討	64
第7項 異なるデンプン原料を用いた小仕込み試験における α -EG の生産量	66
第8項 保湿効果の検証	68
第4節 α -EG 発酵生産の原料コスト試算	70
第5節 小括	71
第5章 α -EG の保湿機能	74

第1節 緒言	75
第2節 材料および方法	77
第1項 材料および機器	77
第2項 方法	77
第3節 結果および考察	79
第1項 α -EG 試薬の保湿効果	79
第2項 0.01%エタノールを基剤とした α -EG 試薬の保湿効果	80
第3項 0.1%エタノールを基剤とした α -EG 試薬の保湿効果	81
第4項 α -EG による保湿効果の持続性の検討	82
第5項 α -EG を配合したシャンプーの保湿効果	86
第6項 炭酸水に溶解した α -EG の保湿効果	87
第4節 小括	89
第6章 α -EG が線維芽細胞に与える影響	93
第1節 緒言	94
第2節 材料および方法	96
第1項 材料	96
第2項 方法	97
第3節 結果および考察	104
第1項 α -EG の細胞生育阻害試験	104
第2項 細胞増殖に与える影響	105
第3項 コラーゲン生成に与える影響	106
第4項 保湿関連遺伝子の発現に与える影響	107
第4節 小括	114
第7章 総括	121

査読付発表論文.....	127
学会発表.....	128
その他の業績.....	129
謝辞.....	132

略号・酒造用語

略号

酵素

AA： α -アミラーゼ剤，スミチーム L

AG： α -グルコシダーゼ剤， α -グルコシダーゼ「アマノ」S D

TGB： α -グルコシダーゼ剤，四段用 TG-B

GA：グルコアミラーゼ

その他

α -EG：Ethyl- α -D-glucoside

DMEM：ダルベッコ改変イーグル培地

MTT：メチルチアゾリルジフェニルーテトラゾリウム〔3-(4,5-Dimethylthial
-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide〕

酒造用語

掛け米：蒸し後放冷して直接もろみに仕込まれる米。

汲み水：もろみに加える仕込水。

麴 米：麴に使用する米。

麴歩合：米の総使用量に対する麴米の割合。

もろみ：米，麴，水，酵母を加えて発酵させている発酵液。

仕込み：お酒を醸造すること。

三段仕込み：初添，仲添，留添の3回に分けてもろみに原料を添加する仕込み。

初添（添仕込み）：もろみ原料を最初に添加する行為。

仲添（仲仕込み）：初添の二日後に初添の2倍量の原料を加える。

留添（留仕込み）：仲添の2倍量の原料を仲添えの翌日もろみに加える。

二段仕込み：初添と仲添を同時に行い，2回に分けて原料を添加する仕込み

第 1 章 序章

第1節 研究の背景

エチル- α -D-グルコシド(以下 α -EG)は、清酒に含有されている、水、エタノール、グルコースに次ぐ第4の成分である¹⁾。しかし、4番目に高含有されている成分でありながらその発見は遅かった。1970年、 α -EGは今成らによって飲酒したヒトの尿から検出されたことをきっかけとして清酒中に同定された²⁾。 α -EGは分子量208.21、グルコースの1位の炭素にエトキシ基が α 結合した非還元糖である(図1)。

岡らが α -EGを清酒から単離し呈味特性を調べ、 α -EGが即効性の甘味と遅効性の苦味を持ち清酒の苦味と濃厚味に関する一つの因子である可能性を示した¹⁾。その後、 α -EGのもろみ中における生成機構におけるデンプン分解系酵素の関与について研究されてきた^{3, 4, 5, 6)}。 α -EGの物性を表1に示した。

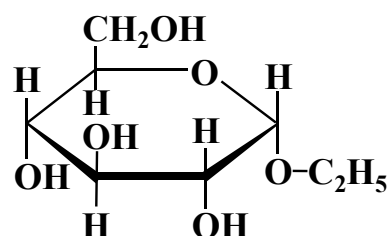


図1 α -EGの化学式

清酒は、日本で伝統的に製造されてきたアルコール飲料であり、糖化と発酵を同時に行う並行複発酵で醸造され、アルコール度数は原酒で20 v/v%に達する。清酒は米と水を原料として、微生物による発酵によって醸される。精米した後、蒸きょうされた蒸米に黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)を繁殖させ、デンプンを糖化するための酵素を生産する目的で麹が作られる。一方で酵母を増殖させる目的で酒母が作られる。一般的に酒母に3回に分けて麹、米、水が添加される三段仕込が行われている。糖化とアルコール発酵が同時に行われることから並行複発酵と呼ばれ、酵母の増殖、糖化速度を巧みに制御することでエタノール濃度は20 v/v%に達する。発酵の過程で麹は糖化に必要な α -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)(以下AA)、 α -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)(以下AG)、グルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)

(以下 GA) の他にプロテアーゼ等を生産する。酵母はアルコール発酵の過程で主な産物であるエタノール、二酸化炭素以外に有機酸、エステル化合物等を生産する。これら麴の生産する酵素の作用や酵母の代謝産物によって清酒の呈味に多様性が生じる。そして清酒の呈味に影響を与える成分の1つが α -EG である。

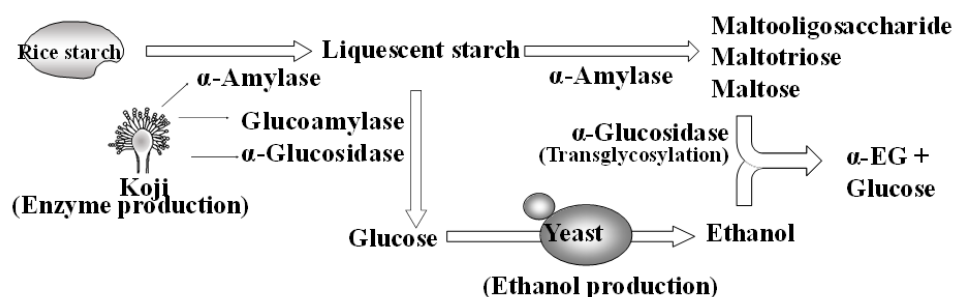
デンプンやオリゴ糖等を基質としてグルコースを生成する加水分解反応を触媒する酵素である AG は、マルトースやオリゴ糖などから α -1, 4 結合したグルコース残基を他の物質に転移する反応も触媒する⁶⁾。 α -EG は清酒もろみ中ではデキストリン、マルトオリゴ糖やマルトースといった二糖以上の糖を基質とし、エタノールをアクセプターとした AG が触媒する転移反応によって生成される(図2)。清酒醸造においてもろみ中の蒸米は、麴菌が生産する AA によりデンプン分子の α -1, 4 結合がエンド型にランダムに切断されて順次小さな分子になる。さらに AG や GA が、デンプンやマルトオリゴ糖の非還元末端からエキソ型にグルコース単位で加水分解することでグルコースが生産され糖化される。この過程で生じるマルトオリゴ糖が AG の糖転移反応の基質となりエタノールの存在下で α -EG を生成する。エタノールは主に3糖以下のマルトオリゴ糖とグルコースを酵母が資化し生産される。清酒醸造においては、デンプンの加水分解に必要な酵素は麴菌が分泌生産するが、加水分解を調整する目的で酵素剤を添加する場合がある。また、麴の酵素生産量は、AA, GA, AG の順に少なくなる⁶⁾。

なお、 α -EG と同じく清酒に含有される α -D-グルコシルグリセロール (α -GG)⁷⁾も、清酒もろみ中では酵母が生産するグリセロールとマルトオリゴ糖から麴が分泌生産する AG の転移反応により生成する⁸⁾。また、 α -EG とグリコシル-O 結合のアノマー配置が異なる β -EG については、清酒もろみ中には、基質となる β -グルカンが無い¹⁰⁾ために生産されていないと考えられる。しかし、焼酎もろみ中には大麦由来の β -グルカンが存在し、さらに焼酎麴に使用される白麴菌

(*Aspergillus kawachii*) , 黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) 共に β -グルコシダーゼを生産する¹¹⁾ことから β -EG が生産されている可能性がある。

表1 α -EG の物性^{4,8)}

CASNO	19467-01-7
分子式	$C_8H_{16}O_6$
分子量	208.21
融点	113～114℃
比旋光度	$[\alpha]_D^{20} +153^\circ$ (C=5.00, H ₂ O)
溶解性	水に易溶。無水エタノールに易溶 (溶解度 50%以上)
結晶	針状 (エタノールから結晶)
還元性	非
潮解性	有
安定性	中性では 121℃, 15 分処理しても分解しない
変異原性	陰性 (AMES 法による)
急性毒性	LD ₅₀ 値, 雄 : 56 g/kg (95% 信頼限界 48～66 g/kg), 雌 : 58 g/kg (95% 信頼限界 53～62 g/kg) (マウス経口毒性試験による)。グルコースと比較して顕著な毒性は認められ無い。

図2 もろみにおける α -EG 生成

第2節 既往研究と研究開始時における課題

第1項 製造法

α -EG の製造法として化学合成法，酵素法，発酵法の 3 種類をあげることができる。アルキルグルコシドの化学合成にはコスト面からデンプンの加水分解物あるいは精製グルコースを糖源としてアルコールと酸触媒の存在下に直接反応させる Fisher 法あるいはその改良法が用いられる¹¹⁾。酵素法として，*Aspergillus niger* 由来の AG を使用して 30・80 w/v% の高濃度のエタノール溶液中でマルトースなどを基質として α -EG を生産する方法がある^{9, 12)}。発酵法としては，10% 程度のエタノールとマルトース，マルトトリースを主体とする水飴を含む培地に *Schizosaccharomyces pombe* を接種して α -EG を生産する方法が開示されている¹³⁾。また発酵法の一つとして清酒を濃縮して α -EG 含有清酒濃縮液を製造する方法がある¹⁴⁾。

これらの従来の α -EG の製造方法には，以下の課題があった。化学合成法では，アノマーの混合物となるため， β -EG を取り除く必要がありコスト増の原因となる。*Aspergillus niger* 由来の AG を使用した酵素法では，エタノール濃度が高いために AG の失活が大きく酵素添加量が多くなり，また高価なエタノールを大量

に使用するためコスト面に課題がある。*Schizosaccharomyces pombe* を利用した発酵法では α -EG の濃度は 1 w/v% 程度でしかない。またこれらの方法では主に α -EG とグルコースが生成され有機酸やアミノ酸などの天然保湿成分は生成されない。清酒を原料とした製法では有機酸やアミノ酸なども同時に生産されるが、原料コストが高く α -EG の濃度は 0.7 w/v% 程度でしかない。

第2項 α -EG の機能性

1997 年 Kitamura らの研究により、 α -EG にケラチノサイトの分化を促進する事で UV-B による荒れ肌の改善機能があることが明らかにされた¹⁵⁾。この研究以降、 α -EG は単なる清酒の呈味成分としてだけではなく、化粧品素材として利用されその機能や製法の研究が行われるようになった。 α -EG を経口摂取すると一部が小腸で加水分解されるが、大部分は吸収され血中に移行し、約 60 - 90% は尿中に排出される^{16, 17, 18)}。この体内動態によって α -EG は、尿量増加⁹⁾や体重減少効果を示す利尿薬になる可能性がある^{19, 20, 21, 22)}。また、慢性アルコール性肝障害を抑制する効果が報告されている²³⁾。 α -EG は飲用摂取や肌への塗布を行うことによって、肌の角質層に働きかけ、表皮細胞の角化促進させる作用がある^{15, 24)}。すなわち UV 照射など外的要因によって表皮細胞がダメージを受けるとその修復のために表皮細胞の増殖が亢進し、表皮細胞の角化と増殖のバランスが崩れる。 α -EG を塗布すると表皮細胞の角化を促進しすることで増殖と角化のバランスが回復する事で、角質層からの水分蒸散量が減少し、荒れ肌が抑制される¹⁵⁾。 α -EG は細胞間脂質生合成を亢進し、角質層のバリア機能を改善することが報告されている²⁵⁾。結果として、保湿効果、荒れ肌改善効果が期待される。また、 α -EG を 1 w/v% 含有した清酒 1.5 合(270 ml)を単回飲用させた試験で、飲用前後の肘の角層水分量に有意差が認められた報告がある²⁶⁾。

α -EG の類似化合物である α -GG についてもマウスの皮膚に塗布すると、細胞の増殖を促進する insulin-like growth factor- I を増加させることが Harada らによって報告されている²⁷⁾。また、ヒトの頬に 0.01 w/v% α -GG を 14 日間塗布することで、皮膚の弾力が増したことが報告されている²⁷⁾。

このように α -EG が皮膚に及ぼす影響について多くの研究があるが、従来 α -EG を皮膚に塗布した試験では数日以上塗布した試験であり、短時間で観察される保湿効果を試験したデータはなかった。また、従来の研究は皮膚の角層に対する影響を対象としており、真皮に対する作用を明らかにする課題があった。

第3節 本研究の目的

発酵法で化粧品への利用を目的とした α -EG の生産を行うことで、発酵によって生成する他の有効成分との相乗または相加効果が期待される。しかし、米と麴のみを使用した清酒の発酵法では原料コストが高くなる。そこで、本研究では原料として醸造副産物である酒粕とヌカを利用し、清酒の醸造法を参考にして α -EG の発酵生産法を検討する。また、焼酎醸造の過程で生じる焼酎蒸留残渣から α -EG を回収することで生産可能であるか検討し、焼酎醸造において α -EG を副産物から生産する技術を確立する。本研究で生産した α -EG 含有発酵産物が持つ保湿効果について試験し、その有効性を評価する。また、 α -EG 試薬について基剤を替えて試験することで α -EG の皮膚に対する効果への影響を試験し α -EG の効果的な使用方法を検討する。さらに、真皮に存在する線維芽細胞に与える α -EG 試薬の影響についてヒト正常線維芽細胞を用いて細胞レベルで試験を行い、続いて細胞レベルでの効果を遺伝子レベルでも検討する。

第4節 本研究の成果と意義

第2章では、清酒の仕込みにおいて、麴および酵母の選定、麴および酵素剤の使用量を検討し、 α -EG 高含有酒の醸造法を確立した。

第3章では、焼酎の仕込みにおいて、麴および酵素剤の使用量、また仕込み温度を検討し、 α -EG 高含有となる焼酎の醸造法を確立し、焼酎蒸留残渣から α -EG を生産する技術を確立した。

第4章では、醸造副産物である酒粕と白ヌカ液化液または α 化米を利用した仕込みにおいて、酵素剤の使用量、白ヌカの液化条件、汲み水量等を検討し、 α -EG 高含有酒粕再発酵酒の醸造法を確立した。さらに、醸造した酒粕再発酵酒の保湿効果を確認した。

第3章（焼酎蒸留残渣抽出液）および第4章（酒粕再発酵酒）で開発した α -EG の製法において、清酒からの製造と比較してそれぞれ原料コストが約 20 分の 1 および約 7 分の 2 であり、製造コスト削減の可能性を示した。

第5章では、 α -EG 試薬を皮膚に塗布して直ぐに観察される保湿効果について塗布後 270 分持続することを新たに確認した。その際、 α -EG の保湿効果に与えるエタノールの影響について検討し、エタノールが α -EG の保湿効果を高める可能性を見出し、さらに α -EG を使用したシャンプーおよび炭酸風呂の商品化の可能性についても検討を加え、炭酸ガスが α -EG の保湿効果を高める可能性を見出した。

第6章では、 α -EG 試薬の線維芽細胞の増殖とコラーゲン生産に与える影響を試験し、線維芽細胞の増殖とコラーゲン生成賦活化作用を認めた。さらに α -EG 処理した線維芽細胞において増殖およびコラーゲン生産に関与する遺伝子の発現について検討し、mRNA 量が増加することを確認した。

近年の消費者の自然志向や発酵ブームを考慮すると、化学法やエタノールとマルトース等を原料に酵素剤を使用して製造する α -EG よりも、米、麴を使用して発酵法で製造した α -EG がより消費者ニーズに適合し、受け入れられやすいと考えられる。清酒から調製した米発酵液が化粧品に配合されているが、製造コストに課題があった。本研究で開発した酒粕再発酵酒は酒粕と白ヌカを原料としていることからアミノ酸や有機酸を含有し且つ、清酒から製造するよりも低価格な α -EG 含有機能性素材となる。

従来の研究では、 α -EG の機能性はマウスやラットの生体を用いた臓器の機能、培養細胞の形態変化や代謝物の測定、マウス、ラット、ヒトによる荒れ肌改善効果等が報告されている^{8, 15, 21)}が、遺伝子レベルで α -EG の機能性を調べた報告は無かった。本研究では真皮に存在する線維芽細胞に与える影響を培養細胞を用いて検討し、細胞実験で、線維芽細胞増殖賦活化作用、I型コラーゲン生産賦活化作用、遺伝子発現試験で *FGF1*, *FGF2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* 各遺伝子の発現を確認した。

これらの結果は α -EG の産業利用が推進される一助となる成果である。

参考文献

1. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎 : 日本農芸化学会誌, 第 50 卷, 455-461, 1976
2. T. Imanari and Z. Tamaru : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 321-324, 1971
3. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎 : 日本農芸化学会誌, 第 50 卷, 463-468, 1976
4. 岡智 : 日本醸造協会誌, 第 72 卷, 631-635, 1977
5. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健 : 日本醸造協会誌 : 第 77 卷, 393-397, 1982
6. 森本良久, 北本勝ひこ, 藤田義人, 五味勝也, 熊谷知栄子 : 生物工学会誌, 第 73 卷, 97-104, 1995
7. F. Takenaka and H. Uchiyama : *Biosci. Biotechnol. Biochem* , **64**, 1821-1826, 2000
8. 芳川憲司, 池田潔昭, 谷川弘晃, 山本一也, 宮本博文, 岡田茂孝 : 日本食品工業科学会誌, 第 41 卷, 878-885, 1994
9. 荒木茂樹, 伊藤一敏, 青江誠一郎, 池上幸江 : 栄養学雑誌, **5**, 235-251, 2009
10. 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌 : 第 86 卷, 536-539, 1991
11. 木野村圭右, 榊原敏之 : フレグランスジャーナル, **5**, 62-64, 1990
12. 小澤修, 小島芳弘 : 特開平 4-112798
13. 岡田茂孝, 芳川憲司, 神原積 : 特開平 2-291293
14. 広常正人, 樋詰和久, 長井潔 : 特開 2005-143418
15. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno, T. Horikoshi : *Skin Pharmacol.*, **10**, 153-159, 1997
16. T. Mishima, T. Hayakawa, K. Ozeki, H. Tsuge : *Nutrition* , **21**, 525-529, 2005
17. T. Mishima, Y. Katayama, Y. Takagi, K. Ozeki, T. Hayakawa, H. Tsuge :

- J. Nutr.Sci Vitaminol* , **51**, 22-26, 2005
18. T. Mishima, K. Tanaka, H.Tsuge, J. Nakahara, T. Hayakawa : *J. Agric.Food chem.* , **53**, 7257-7261, 2005
19. T. Mishima, S. Harino, J. Sugita, M. Nakahara, T. Suzuki, T. Hayakawa : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 393-397, 2008
20. T. Mishima, T. Hayakawa, K. Ozeki, H. Tsuge : 岐阜医療科学大学紀要, **3**, 219-223, 2009
21. T. Mishima, T. Hayakawa, K. Ozeki, Y. Isa, H. Tsuge : 岐阜医療科学大学紀要, **4**, 15-18, 2010
22. T. Mishima, T. Hayakawa, K. Ozeki, Y. Isa, H. Tsuge : 岐阜医療科学大学紀要, **5**, 31-34, 2011
23. H. Izu, K. Hizume, K. Goto, M. Hirotsune : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 951-957, 2007
24. M. Hirotsune, A. Harakake, A. Komiya, J. Sugita, T. Tachihara, T. Konami, K. Hizume, K. Ozeki, T. Ikemoto : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 948-952, 2005
25. M. Nakahara, T. Mishima, T. Hayakawa : *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **71**, 427-434, 2007
26. 広常正人 : 発酵・醸造食品の最新技術と機能性, シーエムシー出版, 276-283, 2006
27. N. Harada, J. Zhao, H. Kurihara, N. Nakagawa, K. Okajima : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** , 759-765, 2010

第 2 章 α -EG 高含有酒の発酵生産法の開発

第1節 緒言

本章では、清酒の醸造法を応用し、麴米、酵母、酵素剤のもろみへの添加量を検討することで α -EG 高含有酒の醸造法の開発を行った。 α -EG 高含有酒の醸造法を確立することで、 α -EG 高含有酒や酒風呂、また α -EG 高含有酒のエタノールを除くことにより酒濃縮物を作製し、ドリンク剤やサプリメントなど多種多様な商品展開が可能となる。

清酒はその製造工程で、酒母における乳酸発酵、麴菌を用いた製麴、酵母のアルコール発酵の各種微生物の発酵産物が巧みに利用されている醸造酒であり、動物実験で紫外線による荒れ肌改善効果を持つことが明らかにされている¹⁾ α -EG を含有している。単回経口摂取試験で 1 w/v% α -EG を含有する清酒を 270 ml 飲用すると、摂取前後でヒトの肘角層水分量に有意差が認められた²⁾。また、動物実験でガラクトサミン誘発肝障害の抑制作用³⁾、ヒトで入浴剤としての保温効果⁴⁾が報告されている。

市販清酒中に α -EG は約 0.2-0.7 w/v% 含有されており⁵⁾、0.3 w/v% 前後含有するグリセロールおよびその配糖体である α -D-グリコシドグリセロール (α -GG) と共に清酒のこく味に関係している⁶⁾。清酒中の α -EG は、もろみ中にデンプンの加水分解によって生成したマルトオリゴ糖やデキストリン成分を基質として、麴菌が生産する α -グルコシダーゼおよび酵素剤として添加される α -グルコシダーゼの糖転移反応によってエタノールをアクセプターとして生産される⁷⁾。従って α -EG をもろみ中に高生産するためには、主な糖基質であるマルトオリゴ糖およびアクセプターとなるエタノールの濃度を同時に高く保つ必要があると同時に、糖転移反応を触媒する α -グルコシダーゼ活性も高く保つ必要がある。デンプンの糖化が速く進みグルコースまで分解されマルトオリゴ糖が無くなると、グルコースを酵母が消費してエタノールを生産しても糖基質が無いため α -EG が生産され

ない。そこで、デンプンの糖化に必要な酵素を生産する麹の種類を検討した。また、エタノールを生産する酵母について検討した。温度などの仕込み条件、 α -アミラーゼ剤および α -グルコシダーゼ剤の添加量を変えて添加効果についても試験した。

第2節 材料および方法

第1項 材料

菌株

- ・清酒用麹菌 (*Aspergillus oryzae*: 白峯, ハイ G (榊樋口松之助商店, 大阪府大阪市))
- ・焼酎用麹菌 (*Aspergillus awamori*: KBN2012, 黒麹菌 (榊樋口松之助商店, 大阪府大阪市) および *Aspergillus kawachii*: KBN2001, 本格焼酎菌 (榊樋口松之助商店, 大阪府大阪市))
- ・清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2347)
- ・焼酎酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2373 および NBRC 0282)

仕込みに用いた米および水

- ・米: α 化米 (国産米, 精米歩合 70%, 徳島製麹, 徳島県阿波市)
- ・汲み水: Reverse Osmosis 処理水 (精製水) を乳酸で pH2.6 から pH2.7 に調整。

酵素剤

- ・ α -アミラーゼ (AA) 剤 (以下 AA 剤): スミチーム L (*Aspergillus oryzae* 由来), 12,000 U/粉末 g (新日本化学工業, 愛知県安城市)
- ・ α -グルコシダーゼ (AG) 剤 (以下 AG 剤): α -グルコシダーゼ「アマノ」SD (*Aspergillus niger* 由来), 60,000 U/粉末 g (天野エンザイム, 愛知県名古屋市)

第2項 方法

製麴

- ① α 化米に重量の 30%の製麴水(表 2-1)と 5.0×10^6 spores/ml の懸濁液を添加した。
- ② 30℃のインキュベータで 1 日培養した。
- ③ インキュベータから取り出し，スパテルでまんべんなく混ぜた。
- ④ 30℃のインキュベータで半日程度培養した。

表 2-1 製麴水組成

0.5 w/v% KH_2PO_4	50 ml
1 w/v% NaNO_3	50 ml

麴抽出液の作製

- ① 製麴した麴 5 g を 50 ml ファルコンチューブにいれた。
- ② 25 ml(5 倍量)の麴抽出 buffer(表 2-2)を入れた。
- ③ 1 時間に 1 回攪拌し，3 時間，常温放置した。
- ④ ろ紙 (No. 5 A, 東洋濾紙株式会社，東京都文京区) でろ過し、麴抽出液とした。

表 2-2 麴抽出 buffer 組成

10 mM 酢酸 buffer (pH 5.0)	40 ml
0.5 w/v% NaCl	1 g
滅菌水	160 ml

α -EG, エタノールおよびグルコースの定量

α -EG, エタノールおよびグルコースの定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 8)以下の条件で行った。

- ・ 測定器: Alliance HPLC システム 2695 (Waters, MA, US)
- ・ 検出器: RI 検出器 2414 (Waters, MA, US)
- ・ カラム: Shodex SPO 810, 8 × 30 mm, Pb 2+ cation exchange column (昭和電工(株), 東京都港区)
- ・ 移動相: H₂O
- ・ 流速: 400 μ L/min
- ・ 温度: 65°C
- ・ 分析時間: 35 min
- ・ 標準物質: 標準物質: α -EG (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市), エタノール (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市), グルコース (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ サンプルは 0.45 μ m のフィルターでろ過した後, インジェクションした。

酵素活性の測定

グルコアミラーゼ活性の測定

GA 活性は, 糖化力分別定量キット (キッコーマンバイオケミファ(株), 東京都港区) を用いて定量した。G2- β -pNP を基質として米麴抽出液を作用させると, AG および GA が作用して G1- β -pNP が生じ, さらに β -グルコシダーゼを作用させると発色基 (pNP) が遊離する。吸光度 (400 nm) の上昇を測定することにより糖化力活性を測定し, 糖化力活性と α -グルコシダーゼ活性から計算により GA 活性を算出した 9)。

pNP : 4-ニトロフェノール, G2- β -pNP : 4-ニトロフェニル β -マルトシド

〈測定方法〉

1. G2-β-*p*NP 溶液 0.5 ml と β-グルコシダーゼ溶液 0.5 ml を試験管に加え、37℃で約 5 分間予備加温した。
2. 希釈した測定試料 100 μl を加え、よく混合して反応を開始した。
3. 37℃で 10 分間反応させた後、反応停止液（炭酸ナトリウム溶液）を 2 ml 加え混合し、反応を停止させた。
4. 反応液の吸光度を波長 400 nm で測定した。

〈ブランク値の測定〉

1. G2-β-*p*NP 溶液 0.5 ml と β-グルコシダーゼ溶液 0.5 ml を試験管に加え、37℃で 15 分間加温した。
2. 反応停止液を 2 ml 加えてよく混合し、次に測定試料を 100 μl 加えて再び混合した。
3. 反応液の吸光度を波長 400 nm で測定した。

〈計算方法〉

$$\text{グルコアミラーゼ活性 (U/ml)} = (5.85 \times (E_s - E_b) - 14.1 \times (E_{2s} - E_{2b})) /$$

34.22

E_s : 測定試料の吸光度, E_b : ブランクの吸光度

E_{2s} : α-グルコシダーゼ活性における測定試料の吸光度, E_{2b} : α-グルコシダーゼ活性におけるブランクの吸光度

1 U は上記の測定条件において、1 分間に 1 μmol の *p*NP を遊離する力価。

α-グルコシダーゼ活性の測定

AG 活性は、糖化力分別定量キット（キッコーマンバイオケミファ㈱、東京都港区）を用いて定量した。*p*NPG を基質として米麴抽出液を作用させると、AG が作用して発色基（*p*NP）が遊離する。吸光度（400 nm）の上昇を測定することによ

り AG 活性を測定した⁹⁾。

p NP : 4-ニトロフェノール, p NPG : 4-ニトロフェニル α -グルコシド

〈測定方法〉

1. p NPG 溶液 1 ml を試験管に加え, 37℃で約 5 分間予備加温した。
2. 希釈した測定試料 50 μ l を加え, よく混合して反応を開始した。
3. 37℃で 10 分間反応させた後, 反応停止液(炭酸ナトリウム溶液)を 500 μ l 加え混合し, 反応を停止させた。
4. 反応液の吸光度を波長 400 nm で測定した。

〈ブランク値の測定〉

1. 基質溶液 1 ml を小試験管に加え, 37℃で 15 分間加温した。
2. 反応停止液を 500 μ l 加えてよく混合し, 次に測定試料を 50 μ l 加えて再び混合した。
3. 反応液の吸光度を波長 400 nm で測定した。

〈計算方法〉

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ活性 (U/ml)} = (E_{2s} - E_{2b}) \times 0.171 \times D_f$$

E_{2s} : 測定試料の吸光度, E_{2b} : ブランクの吸光度, D_f : 測定試料の希釈倍率

1 U は上記の測定条件において, 1 分間に 1 μ mol の p NP を遊離する力価。

α -アミラーゼ活性の測定

AA 活性は, α -アミラーゼ測定キット(キッコーマンバイオケミファ㈱, 東京都港区)を用いて定量した。N3-G5-B-CNP を基質として米麴抽出液を作用させると, AA が作用して G3-B-CNP と G2-B-CNP を生じる。これらに共役酵素として添加した GA と β -グルコシダーゼが作用して, 発色基(CNP)が遊離する。吸光度(400 nm)の上昇を測定することにより AA 活性を測定した⁹⁾

〈測定方法〉

1. 基質溶液 500 μl, 酵素溶液 500 μl を調整し, 37℃で 5 分間予備加温した
2. 測定試料を 500 μl 加え, 10 分間反応させた後, 反応停止液を 2 ml 入れよく混合して反応をさせた
3. この反応終了液を 400 nm で吸光度を測定した

〈ブランク値の測定〉

1. 基質溶液 500 μl, 酵素溶液 500 μl を試験管に加え, 37℃で 15 分間加温した。
2. 反応停止液 500 μl を加えて混合し, 次に測定試料を 500 μl 加え混合した。
3. 反応液の吸光度を波長 400 nm で測定した。

〈計算方法〉

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性(U/ml)} = (E3s - E3b) \times 0.179 \times Df$$

E3s: 検体の吸光度, E3b: ブランクの吸光度, Df: 検体の希釈倍率

小仕込み

本研究の小仕込みはすべて 2 段仕込みで行った。小仕込み配合を表 2-3 に示した。添・仲で, 麴米, 掛米, 汲水を入れ, 酵母を 5.3×10^6 cells/ml 添加し, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ でそれぞれ発酵させた。添・仲から 2 日間発酵させ, 留で掛米, 汲水を入れ, 設定した温度で発酵させた。留を発酵 1 日目とし, 15℃の場合 20 日間, 20℃および 25℃の場合 10 日間, 30℃の場合 5 日間, 発酵させた。

表 2-3 小仕込み配合*

	添・仲	留	合計
総米 (g)	12.0	13.0	25.0
掛米 (g)	7.50	13.0	20.5
麴米 (g)	4.50	0	4.5
汲水 (ml)	19.5	18.5	38.0

*: もろみに加える原料の添加量を定めたもの。総米は掛米と麴米の合計を示す。

第3節 結果および考察

第1項 麹菌の選定

仕込み温度と麹菌の種類が α -EG 生産に与える影響

清酒醸造の過程で生産される α -EG は、デキストリン、マルトオリゴ糖、マルトースといった2糖以上の糖ともろみ中の酵母がエタノール発酵によって生産したエタノールを基質として麹菌が生産したAGの糖転位反応によって生産される⁷⁾。従って、 α -EGの生産性を検討する上で、麹菌が生産する酵素の働きは重要である。また、清酒醸造では、通常黄麹菌が清酒用麹菌として使用されているが、 α -EG生産に適した麹菌であるとは限らない。そこで、清酒または焼酎醸造で用いられる実用麹菌から6株（黄麹菌（*A. oryzae*）、白麹菌（*A. kawachii*）、黒麹菌（*A. awamori*）それぞれ2株）について、製麹、発酵試験を行うことで、 α -EGの生産性を検討し α -EG 生産に適した麹菌の選別を行った。上述の6株を用いて製麹し、小仕込み試験を行った結果を図2-1に示した。

清酒醸造で使用されている黄麹菌（ハイ G, 白峯）に比べて、白麹菌（KBN2001, 本格焼酎）、黒麹菌（KBN2012, 黒麹）といった焼酎醸造で使用されている麹を用いた方が α -EG 濃度は高かった。また、黒麹菌である *A. awamori* KBN2012 株が6株の中で最も高く、 α -EG 濃度は約 1.1 w/v%であった。

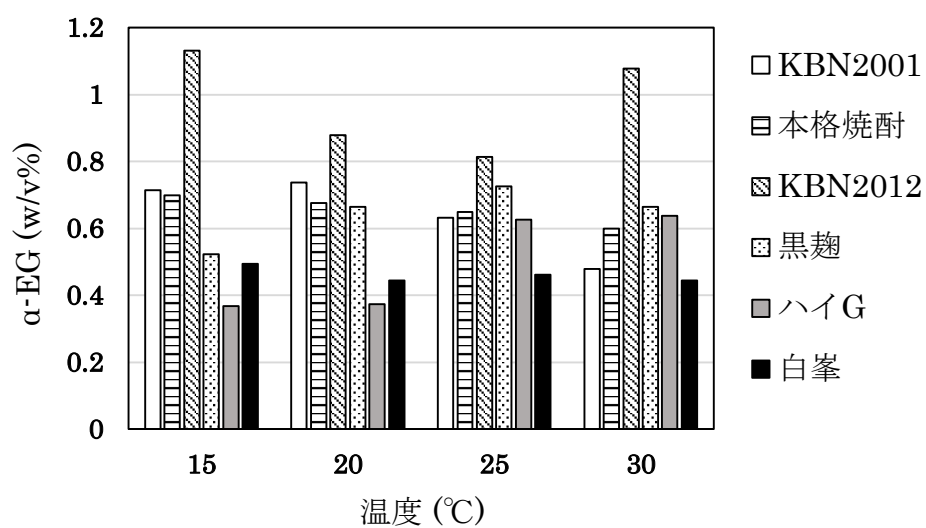
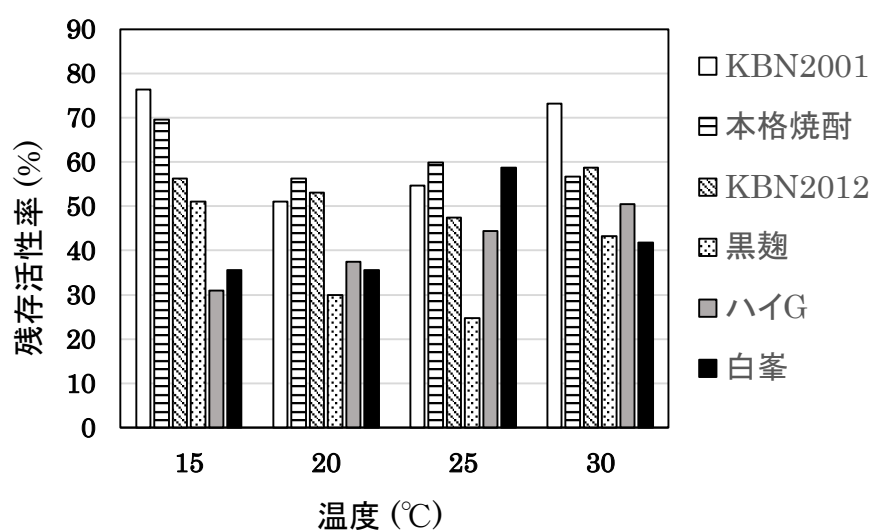


図 2-1 酒中の α -EG

6 種類の麹を用いて 15°C から 30°C までの異なる温度で仕込み、上槽後の α -EG 濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。

仕込み終了後の α -グルコシダーゼ残存酵素活性

小仕込み試験のサンプルの残存 α -グルコシダーゼ活性を図 2-2 に示した。 α -グルコシダーゼの残存活性についても，黄麹菌に比べて白麹菌および黒麹菌の残存率は高かった。これは， α -EG 生産に重要な酵素である α -グルコシダーゼが失活しにくかったことを示していた⁸⁾。 α -EG 分析結果と α -グルコシダーゼ残存酵素活性より，白麹菌，黒麹菌といった焼酎醸造で用いられている焼酎麹菌の方が清酒麹菌である黄麹菌に比べて α -EG 生産に適した麹菌であることが示唆された。

図 2-2 残存 α -グルコシダーゼ活性

6 種類の麹を用いて 15°C から 30°C までの異なる温度で仕込み，発酵終了後のもろみ中に残存する AG 活性を定量し，発酵開始時の活性を 100 として相対値で示した。値は 3 つの仕込みの平均値。

第2項 酵母，麴および麴歩合の検討

前項において、 α -EG 生産に適した麴菌が焼酎麴菌であることが分かった。本項では、焼酎麴 (*A. awamori*) を用いて、麴歩合と温度を変えることによる α -EG 生産性を検討し、麴歩合と発酵温度を決定した。また、 α -EG は、マルトースやマルトオリゴ糖とエタノールを基質として生産されるので酵母の観点から α -EG の生産性を検討し、エタノール発酵能が高く、 α -EG 高生産に適した酵母の選別を行った。

通常の小仕込みでは、総米当たり約 20% の割合で麴米を添加する¹¹⁾。本小仕込み試験では、麴の量を変化させ α -EG 生産性の検討した。また、エタノール発酵能が良く、 α -EG 高生産するのに適した酵母を選別する目的で、清酒酵母 1 株 (*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2347)、焼酎酵母 2 株 (*Saccharomyces cerevisiae*, NBRC 2373, NBRC 0282) を用いて小仕込み試験を行った。麴については焼酎麴 (*A. awamori*)、清酒麴 (*A. oryzae*) を用いて作製した麴を使用し、麴歩合を 10%、15%、20% とした。醸造した酒の α -EG 濃度を図 2-3 に酒のエタノール濃度を図 2-4 に示した。

NBRC 2347、NBRC 2373 は 13-17 v/v% 程度のエタノールを生産しており、NBRC 0282 と比較して発酵能が良い酵母であった。エタノールは α -EG 生産するための基質となるので²⁾、エタノールの生産量が低い NBRC 0282 は、 α -EG 生産に適していないと考えられた。 α -EG 生産に関して、焼酎麴の麴量 10% および 15% が高い傾向であった。最も α -EG を生産していたのは、焼酎酵母である NBRC 2373 であり、約 2 w/v% の α -EG を生産していた。

以上から、アルコール発酵能が良く、 α -EG の生産量が多くなった焼酎酵母 (*S. cerevisiae* NBRC 2373) が今回試験した 3 種類の酵母の中で最も α -EG 生産に適した酵母であると考えた。

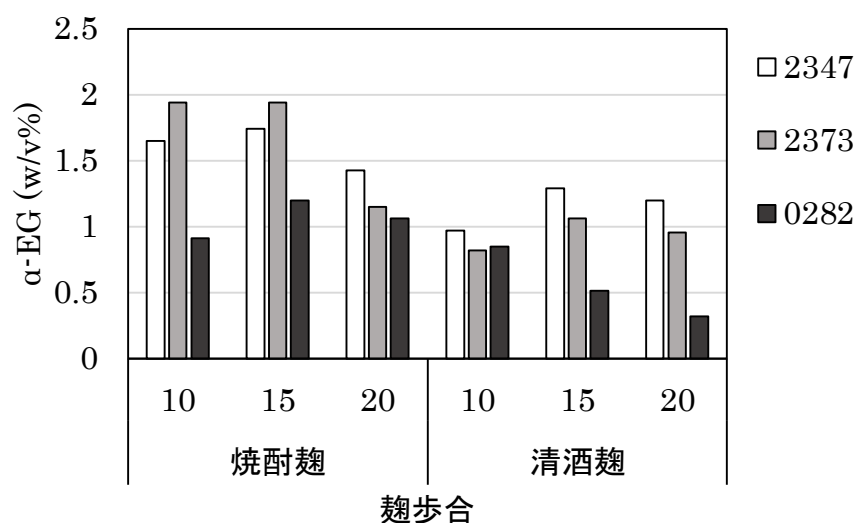


図 2-3 酒中の α -EG

焼酎麹または清酒麹を用いて麴歩合を 10, 15, 20 として 3 種類の酵母を使用して仕込み，上槽後の α -EG 濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。2347: *S.cerevisiae* NBRC 2347, 2373: *S.cerevisiae* NBRC 2373, 0282: *S.cerevisiae* NBRC 0282。

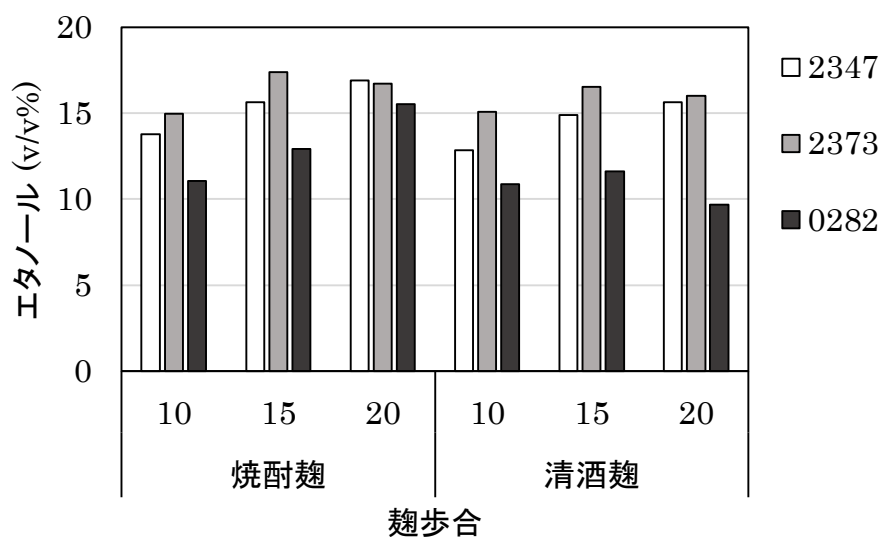


図 2-4 酒中のエタノール

焼酎麹または清酒麹を用いて麴歩合を 10, 15, 20 として 3 種類の酵母を使用して仕込み，上槽後のエタノール濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。2347: *S.cerevisiae* NBRC 2347, 2373: *S.cerevisiae* NBRC 2373, 0282: *S.cerevisiae* NBRC 0282。

第3項 酵素剤添加量が α -EG の生産性に与える影響

GA はデンプン、デキストリン、マルトオリゴ糖といった糖の非還元末端からグルコース単位で加水分解する酵素であり、GA によって AG の基質となるオリゴ糖がグルコースにまで分解されると α -EG の生産性が低下する⁹⁾。従って、 α -EG 高生産には、AG が多く、GA が少ない条件が好ましい。しかし、麹菌が生産する AG は GA に比べ少ない（表 2-4）。そこで、 α -EG を高生産するために、麹歩合を減らし、 α -EG 生産に重要な酵素である AG および AA の各酵素剤を添加することによって補い、 α -EG 高生産するアミラーゼ系の小仕込み時の酵素バランスを検討し、 α -EG を高生産する小仕込み条件と小仕込みのアミラーゼ系の酵素バランスを決定した。

表 2-4 麹のアミラーゼ系酵素¹³⁾

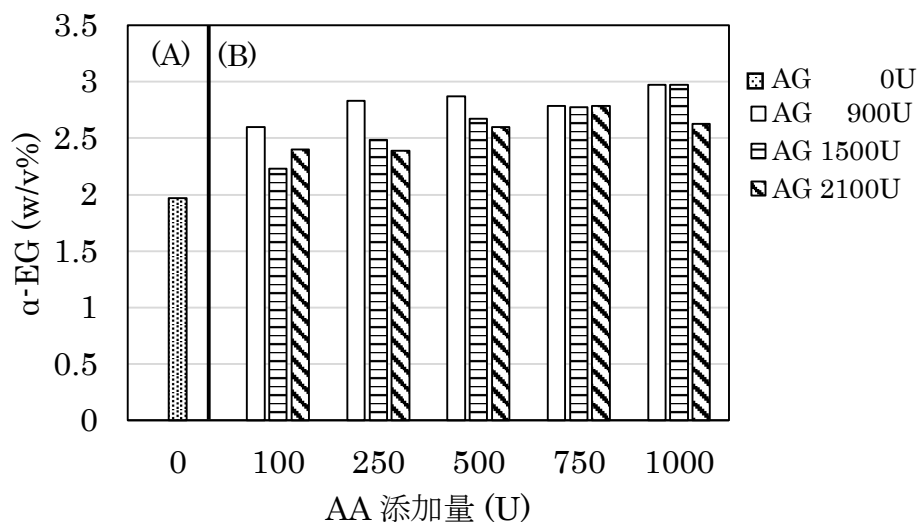
	AA (unit / g 乾燥麹)	GA (unit / g 乾燥麹)	AG (unit / g 乾燥麹)
平均値※	1270	223	182

※昭和 53 酒造年度（昭和 53 年 7 月～昭和 54 年 6 月）114 試料の平均値

醸造した酒中の α -EG 濃度を図 2-5 に、エタノール濃度を図 2-6 に示した。

エタノールは、13・16 v/v% 生産しており、エタノール発酵は十分行われている。 α -EG は 2.2 w/v%以上生産しており、AA 剤 1,000 U、AG 剤 900, 1,500 U で 3.0 w/v%以上の α -EG を生産していた。これは、市販清酒中の約 5-6 倍の α -EG 濃度である¹²⁾。なお、表 2-4 の酵素活性から概算すると AA 剤 1,000 U はもろみ中の AA 活性の 17.5%、AG 剤 900, 1,500 U はもろみ中の AG 活性のそれぞれ 110%、183%に相当する。AA 剤は添加量を増やすに従って α -EG 生産量が多くなる傾向であったが、GA 活性の高い AG 剤の添加量を増やすと α -EG 生産量が減少した。これらの結果から、 α -EG が高含有となる小仕込みを行うためには、AG, AA, GA といったアミラーゼ系の酵素の小仕込み時の酵素バランスが、

重要であると考えた。以上により，目標であった α -EG 生産量が 3 w/v%を超えた小仕込み試験を行うことに成功した。

図 2-5 酒中の α -EG

AA を 100, 250, 500, 750 もしくは 1,000 U もろみに添加し, その 5 つの区分について AG を 900, 1,500, もしくは 2,100 U 添加して仕込み, 上槽後の α -EG 濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。A と B は酵素剤の添加量以外の仕込み条件は同じであるが。実験区分が異なる。

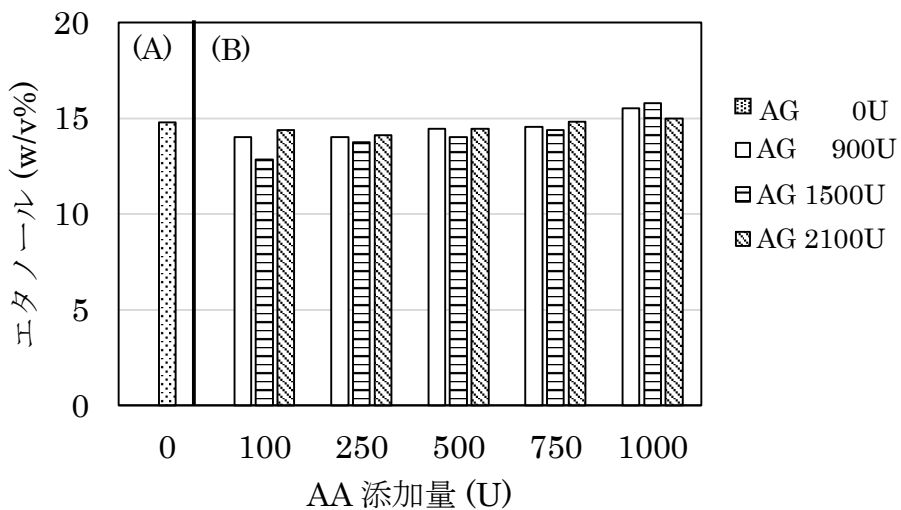


図 2-6 酒中のエタノール

AA を 100, 250, 500, 750 もしくは 1,000 U もろみに添加し, その 5 つの区分について AG を 900, 1,500, もしくは 2,100 U 添加して仕込み, 上槽後のエタノール濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。A と B は酵素剤の添加量以外の仕込み条件は同じであるが。実験区分が異なる。

第4節 小括

実用麹菌 6 株を用いた小仕込みを行った。仕込み温度が α -EG の生産性に及ぼす影響を調べる目的で仕込み温度を 15 °C-30 °C まで 5 °C 刻みで変化させると、25 °C および 30 °C では焼酎麹と清酒麹の α -EG の生産性に大きな差は無かったが、15 °C および 20 °C では焼酎麹が清酒麹よりも α -EG を高生産し、黒麹菌、白麹菌といった焼酎醸造に用いられる焼酎麹菌が、清酒麹と比較して α -EG 生産性が高い傾向を示した。さらに、 α -EG 生産に重要な酵素である α -グルコシダーゼ¹⁾は発酵終了時においても高い酵素活性が保持されており、失活しにくかったことから、焼酎麹菌が α -EG 高生産に適した麹菌であると考えられ、最も α -EG が高生産であった *A. awamori* KBN2012 を選択した。エタノールは α -EG を生成するための基質となる³⁾。そこで、もろみ中でエタノールを生産する酵母の観点から α -EG 生産に適した酵母の検討を行い、エタノールの発酵能が良く α -EG 高生産に適した酵母として焼酎酵母 *S. cerevisiae* NBRC2373 を選択した。麹歩合を下げた小仕込みでは、 α -EG の生産を阻害するグルコアミラーゼが減少すると同時に醸造に必要な酵素も減少してしまう。それを補填するために α -EG 生産に最も重要な酵素である AG 剤と AA 剤を添加したことで、 α -EG 生産量が著しく上昇し、 α -EG を 3 w/v% 含有する α -EG 高含有酒を製造することが可能となった。このことから、 α -EG 高含有酒を醸造するためには小仕込み時のアミラーゼ系酵素のバランスが重要であることが示唆された。以上より、 α -EG 高含有酒を小仕込み条件、小仕込み時の酵素バランスを決定し、 α -EG 高含有酒の醸造法を開発した。

参考文献

1. M. Hirotsune, A. Haratakke, A. Komiya, J. Sugita, T. Tachihara, T. Konami, K. Hizume, K. Ozeki, T. Ikemoto : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 948-952, 2005
2. 広常正人 : 日本醸造協会誌, 第 99 巻, 836-841, 2004
3. H. Izu, K. Hizume, K. Goto, M. Hirotsune : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 951-957, 2007
4. 今安聰, 川戸章嗣: 日本醸造協会誌, 94, 274-280, (1999)
5. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健 : 日本醸造協会誌 : 第 77 巻, 393-397, 1982
6. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎 : 日本農芸化学会誌, 第 50 巻, 463-468, 1976
7. F. Takenaka and H. Uchiyama : *Biosci. Biotechnol. Biochem* , **64**, 1821-1826 , 2000
8. C. Hairong, W. Ben, L. Jiyang, J. Mingguo, L. Shuangjun, D. Zixin, *Microbial Cell Factories*, 10, 1-12, 2011
9. 今井泰彦, 徳武昌一, 山下伸幸, 鈴木勝 : 醸造協会誌, 第 91 巻, 51-57, 1996
10. 千葉誠哉 : 日本農芸化学会誌, 第 69 巻, 1050-1054, 1995
11. 「清酒醸造技術」, 日本醸造協会, 1979
12. 森本良久, 北本勝ひこ, 藤田義人, 五味勝也, 熊谷知栄子 : 生物工学会誌, 第 73 巻, 97-104 , 1996
13. 布川弥太郎, 椎木敏, 岩野君夫, 斉藤和夫 : 日本醸造協会誌 : 第 76 巻, 350-353, 1981

第3章 発酵生産法による α -EG を高含有する焼酎もろみの開発

第1節 緒言

α -EGの生成には、発酵の過程で、基質となるエタノールおよびマルトースやマルトオリゴ糖に加えて反応を触媒する α -グルコシダーゼが共存する必要がある^{1, 2)}。糖化と発酵が同時に進行する並行複発酵である清酒はこの条件が揃っているが、ワインでは糖化の過程が無く、ビールでは糖化の後煮沸するため、 α -グルコシダーゼが失活しており発酵過程で α -EGは生成しない³⁾。ワインに含まれる α -EGはグルコースとエタノールの脱水縮合によって生成すると考えられている⁴⁾。蒸留酒である焼酎には、 α -EGは検出されないが、そのもろみは並行複発酵であることから、 α -EGが生成されていると考えられる。

焼酎蒸留残渣は焼酎を製造する工程で発生する有機物を高濃度に含んだ廃液である。近年の環境問題への高まりの中、海上投棄から産業廃棄物として一部焼却処分されており処理コストが増加した。この焼酎蒸留残渣は多量の水分と、蛋白質、脂肪、糖等の栄養成分が多く含有しており⁵⁾、未利用資源としての有用性を探る研究が行なわれている^{6, 7, 8)}。

本章では焼酎蒸留残渣の有効利用を目的として、焼酎もろみ中に α -EGを高生産し、蒸留残渣に α -EGの保湿効果の付加価値を付与することで、焼酎蒸留残渣から化粧料、サプリメント、ドリンク剤等に使用できる保湿効果のある素材を生産する焼酎の製造方法を検討した。最初に一般的な焼酎製造法で α -EGが生産可能であるか確認し、次に蒸留した焼酎の品質を維持しながら、蒸留残渣の α -EGが高含有となる醸造法を検討した。焼酎粕には癌細胞増殖抑制効果や肝障害抑制効果があることが報告されているが^{6, 7)}、 α -EG高含有焼酎の製造方法を検討することで、さらに荒れ肌改善効果も期待できる機能性食品素材を焼酎蒸留残渣から製造する事が可能となる。

第2節 材料および方法

第1項 材料

菌株

- ・ 麹菌： 焼酎用麹菌 (*Aspergillus awamori* : KBN2012)
- ・ 酵母： 焼酎酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* : NBRC 2373)

仕込みに用いた米，麦および水

- ・ 米： α 化米（国産米，精米歩合 70%，徳島製麹㈱，徳島県阿波市）
- ・ 麦： 丸麦（オーストラリア産ボーデン種，吹上焼酎（㈱），鹿児島県南さつま市）
- ・ 汲み水： Reverse Osmosis 処理水（精製水）

酵素剤

- ・ α -アミラーゼ（AA）剤(以下 AA 剤)： スミチーム L (*Aspergillus oryze* 由来)，12,000 U/粉末 g (新日本化学工業㈱，愛知県安城市)
- ・ α -グルコシダーゼ（AG）剤(以下 AG 剤)： α -グルコシダーゼ「アマノ」SD (*Aspergillus niger* 由来)，60,000 U/粉末 g (天野エンザイム株式会社，愛知県名古屋市)

第2項 方法

麹抽出液の作製

- ① 製麹した麹 5 g を 50 ml 蓋付チューブにいれた。
- ② 25 ml(5 倍量)の抽出 buffer (表 3-1)を入れた。
- ③ 1 時間に 1 回攪拌し，3 時間常温放置した。

- ④ ろ紙（No. 5 A，東洋濾紙株式会社，東京都文京区）でろ過し，麴抽出液とした。

表 3-1 麴抽出液の組成

10 mM 酢酸 buffer (pH 5.0)	40 ml
0.5% NaCl	1 g
滅菌水	160 ml

α -EG，エタノールおよびグルコースの定量

α -EG，エタノールおよびグルコースの定量は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて⁹⁾下記の条件で行った。

- ・ 測定器: Alliance HPLC システム 2695 (Waters, MA, US)
- ・ 検出器: RI 検出器 2414 (Waters, MA, US)
- ・ カラム: Shodex SPO 810, 8 × 30 mm, Pb 2+ cation exchange column （昭和電工(株)，東京都港区）
- ・ 移動相: H₂O
- ・ 流速: 400 μ l / min
- ・ 温度: 65℃
- ・ 分析時間: 35 min
- ・ 標準物質: α -EG （和光純薬工業(株)，大阪府大阪市），エタノール（和光純薬工業(株)，大阪府大阪市），グルコース（和光純薬工業(株)，大阪府大阪市）
- ・ サンプルは 0.45 μ m のフィルターでろ過した後，インジェクションした。

小仕込み

一次もろみの発酵は15℃で5日間, 二次もろみの発酵は15℃で8日間行った。
もろみの α -EG含量と蒸留液(焼酎)に α -EGやグルコースが残っていないかを調べた。通常の仕込み配合を表3-2および表3-3に示した。

表 3-2 米焼酎の仕込み配合*

	一次もろみ	二次もろみ	合計
総米(g)	12	40	52
掛米 (α 化米) (g)	0	40	40
麴米(g)	12	0	12
汲水(ml)	21	96	117

*: もろみに加える原料の添加量を定めたもの。総米は掛米と麴米の合計を示す。

表 3-3 麦焼酎の仕込み配合*

	一次もろみ	二次もろみ	合計
総米(g)	16	40	56
掛米 (α 化米) (g)	0	40	40
麴米(g)	16	0	12
汲水(ml)	28	66	94

*: もろみに加える原料の添加量を定めたもの。総米は掛米と麴米の合計を示す。

麴と酵素剤の添加量の検討

表 3-4 もろみに添加した麴量

	麴量(g)
米 1/3	4.0
米 1/6	2.0
麦 1/5	3.2
麦 1/10	1.6

表 3-5 もろみに添加した酵素量

酵素剤		添加量 (U)
酵素	AA	5,040
1	AG	8,280
酵素	AA	2,520
1/2	AG	4,140

もろみに添加する麴量と二次発酵温度の検討

表 3-6 もろみに添加した麴量

麴量(g)		麴量(g)	
米 1	12	麦 1	16
米 1/2	6.0	麦 1/8	2.0
米 1/3	4.0	麦 1/10	1.6
米 1/4	3.0	麦 1/12	1.3

酵素剤は二次もろみに添加した。添加量は AA 剤が 2,520 U, AG 剤は 4,140 U に固定した。

焼酎の官能評価

官能評価を実施するにあたり、普段の仕込みの 8 倍スケールで仕込み、官能評価用のサンプルを調製した。アルコール度数は 25 度に調整し、利き酒を行った。利き酒に用いたサンプルの仕込み条件を表 3-7 に、仕込み配合を表 3-8 から表 3-11 に示した。

表 3-7 官能評価に用いたサンプルの仕込み条件

		AA 添加 量(U)	AG 添加 量(U)	麴米 (g)	二次もろみ 発酵温度(℃)
米①	通常の仕込	-	-	96	30
米②	α -EG 高含有仕込	2,520	4,140	24	20
麦①	通常の仕込	-	-	128	30
麦②	α -EG 高含有仕込	2,520	4,140	10.4	20

表 3-8 米①の仕込み配合

	一次もろみ	二次もろみ	合計
米原料(g)	0	320	
α 化米(g)	0	0	416
麴米(g)	96	0	
汲水(ml)	168	768	936

表 3-9 米②の仕込み配合

	一次もろみ	二次もろみ	合計
米原料(g)	0	320	
α 化米(g)	72	0	416
麴米(g)	24	0	
汲水(ml)	168	768	936

表 3-10 麦①の仕込み配合

	一次もろみ	二次もろみ	合計
麦原料(g)	0	320	
α 化米(g)	0	0	448
麴米(g)	128	0	
汲水(ml)	224	528	752

表 3-11 麦②の仕込み配合

	一次もろみ	二次もろみ	合計
麦原料(g)	0	320	
α 化米(g)	117.6	0	448
麴米(g)	10.4	0	
汲水(ml)	224	528	752

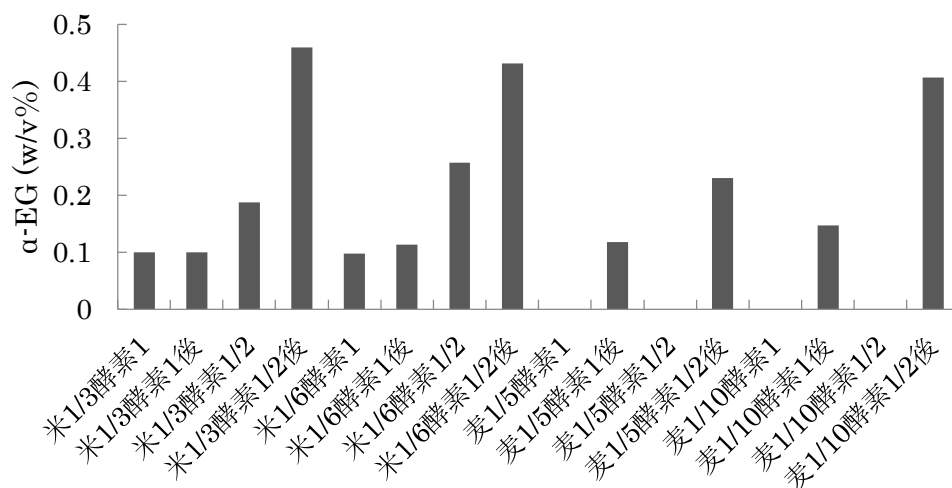
第3節 結果および考察

第1項 麴と酵素剤の添加量の検討

麴米の使用量を減量し、酵素剤を添加した仕込みを行った。酵素剤は一次もろみで添加する場合と二次もろみで添加する場合に分け、酵素剤添加のタイミングが α -EGの生産に与える影響を調べた。なお麴米の減量分は α 化米で補い総米量を一定にした。汲水はあらかじめ乳酸を加えてpH 3.4-3.5付近に調整したものを用いた。発酵温度は一次もろみ、二次もろみ共に30℃で行い、二次もろみの期間は8日間とした。グラフに「後」の表記があるものは、二次もろみで酵素剤を添加したものである。

基本となる米焼酎の仕込み配合を表 3-2、麦焼酎の仕込み配合を表 3-3に示した。本項における仕込みの麴量を表 3-4に、酵素剤添加量を表 3-5に示した。また、図 3-1にもろみ中の α -EGおよび図 3-2にもろみ中の α -EGとエタノールの測定値を示した。

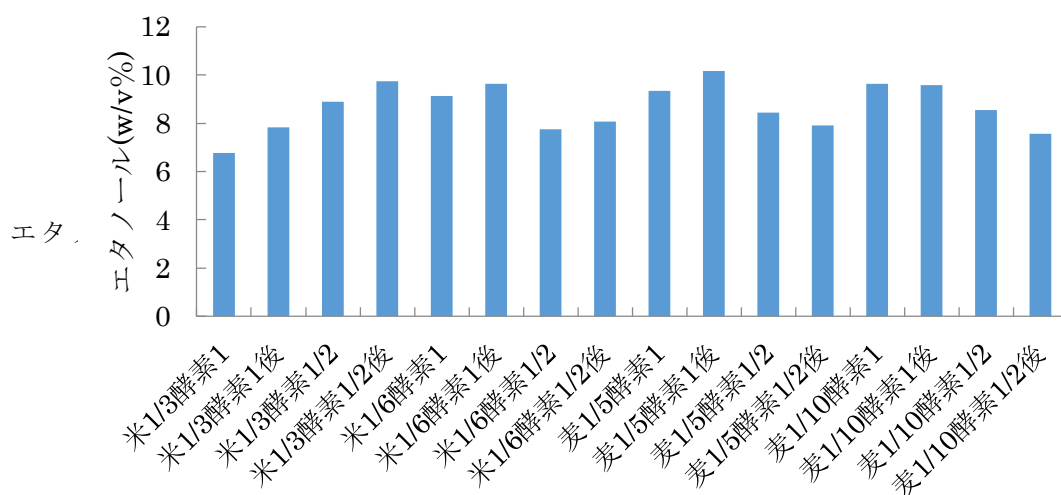
α -EGの濃度は最も高いのは米 1/3、酵素 1/2 後で約 0.45 w/v%であった。米では麴 1/3 条件が、麦では 1/10 条件が α -EG生産性が高かった。米焼酎において酵素剤を一次もろみで添加すると二次もろみに添加した場合と比較して α -EGは約 1/2 から約 1/9 であった。酵素剤(特に AG 剤)は酵母が十分な発酵を行い、 α -EGの基質となるエタノールが十分にある二次もろみでの添加が有効であると考えられた。



供試試料

図 3-1 もろみ中の α -EG

米および麦焼酎について、麴歩合を通常よりも下げ、酵素剤を AA 5,040 U, AG 8,280 U またはその半量もろみに添加した。酵素剤は 1 次もろみまたは 2 次もろみに添加し仕込んだ。発酵終了後のもろみの α -EG 濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。



供試試料

図 3-2 もろみ中のエタノール濃度

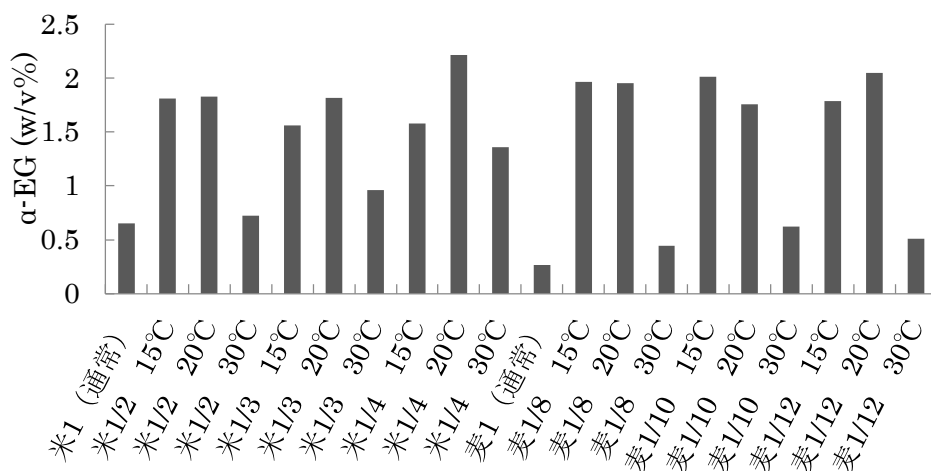
米および麦焼酎について、麴歩合を通常よりも下げ、酵素剤を AA 5,040 U, AG 8,280 U またはその半量もろみに添加した。酵素剤は 1 次もろみまたは 2 次もろみに添加し仕込んだ。発酵終了後のもろみのエタノール濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。

第2項 もろみに添加する麴量と二次発酵温度の検討

二次もろみの仕込み温度が α -EGの生産性に与える影響を検討した。一次もろみは酵母の十分な発酵を促すため30℃に統一し、二次もろみの発酵温度15℃、20℃または30℃で仕込みを行った。発酵期間は8日間とした。

仕込みの麴量を表3-6に示した。また、図3-3および図3-4にもろみ中のエタノールと α -EGのHPLC分析結果を示した。15℃でも α -EGの生産性は高い傾向にあった。しかし20℃発酵よりはやや低い濃度であった。この要因を探るためグルコース濃度に着目した。図3-5にもろみ中のグルコースのHPLC分析結果を示した。大部分のサンプルがエタノールを約12・15 v/v%生産しており、発酵は十分であったと考えられる

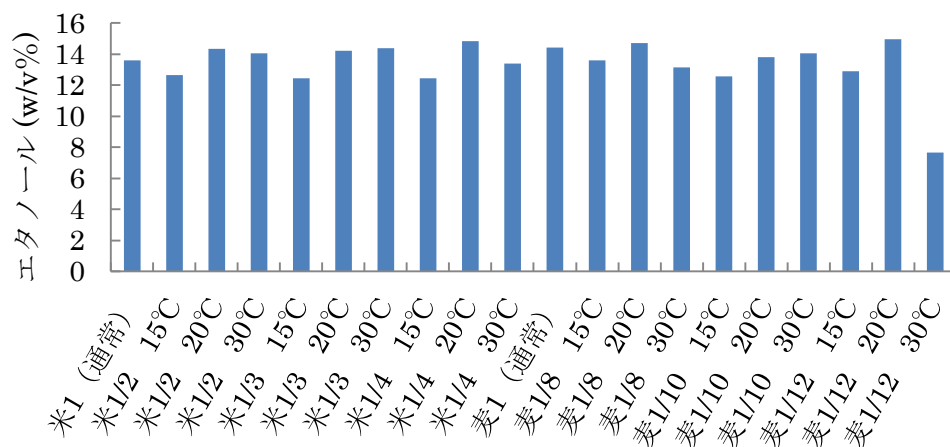
もろみ中のグルコース濃度において、15℃条件のサンプルはほかの条件と比較して非常に高い濃度を示しており酵母による発酵はまだ完了していないことが示唆された。従って発酵期間を8日より長くすることでさらに α -EG濃度が高くなることが期待できる。



供試試料

図 3-3 もろみ中の α -EG

米および麦焼酎について、麴歩合を通常よりも下げ、AA 剤 2,520 U, AG 剤 4,140 U を添加した。酵素剤は 2 次もろみに添加し、もろみ温度を 15, 20, または 30℃ にして仕込んだ。発酵終了後のもろみの α -EG 濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。



供試試料

図 3-4 もろみ中のエタノール

米および麦焼酎について、麴歩合を通常よりも下げ、AA 剤 2,520 U, AG 剤 4,140 U を添加した。酵素剤は 2 次もろみに添加し、もろみ温度を 15, 20, または 30℃ にして仕込んだ。発酵終了後のもろみのエタノール濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。

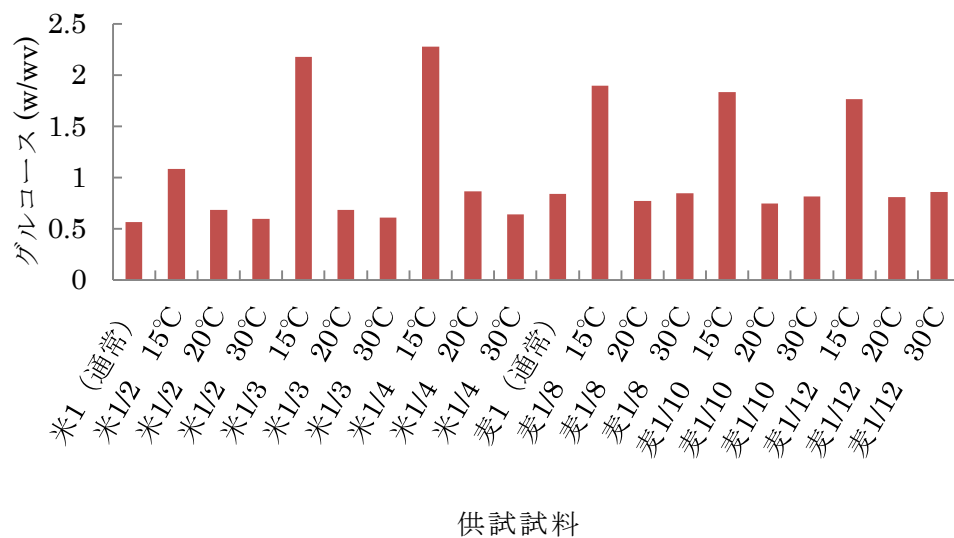


図 3-5 もろみ中のグルコース濃度

米および麦焼酎について、麴歩合を通常よりも下げ、AA 剤 2,520 U, AG 剤 4,140 U を添加した。酵素剤は 2 次もろみに添加し、もろみ温度を 15, 20, または 30°C にして仕込んだ。発酵終了後のもろみのグルコース濃度を定量した。値は 3 つの仕込みの平均値。

第3項 焼酎の官能評価

本研究で開発した α -EG高含有焼酎仕込み法で製造した焼酎が、製品として品質的に問題がないか評価した。評価は大関株式会社において行った。官能評価には α -EG生成試験での仕込み量の8倍にスケールアップし、仕込んだサンプルを用いた。蒸留後、得られた焼酎に加水しアルコールで度数を25度に調整し、利き酒を行った。用いたサンプルの仕込み条件を表3-7に、仕込み配合を表3-8から表3-11に示した。

焼酎の種類を伏せて利き酒を行い、訓練されたパネラー11人で評価した。香り、味、酒質総合について5点法(1 良い - - - 5 悪い)で評価した。評価結果を表3-12に示した。

全体として通常サンプルと α -EG高含有サンプルを比べると、米・麦ともに差が認められなかった。以上の評価結果は、 α -EG高含有仕込みでも焼酎の品質に問題はなく、付加価値のある焼酎残渣の開発が可能であること示す。

表 3-12 焼酎の官能評価

		平均	コメント
米①	香り	3.0	甲類様の香り，香りにクセあり，口当たりやさしい，スッキリ飲みやすい
	味	3.0	
	総合	3.0	
米②	香り	3.0	甲類様の香り，甘味あり，少しくさみあり
	味	2.9	
	総合	2.9	
麦①	香り	2.6	芋の香り良い(2)，香り良い，甘い香り
	味	2.9	
	総合	2.9	
麦②	香り	2.8	香り良い(2)，変わった香り，特徴ない
	味	2.8	
	総合	2.8	

①：通常の仕込み，②： α -EG高含有仕込み $n=11$

米①は図 3-7，米（通常），米②は図 3-7 米 1/4 20℃，麦①は図 3-7 麦（通常），
麦②は図 3-7 麦 1/12 20℃と同条件で 8 倍のスケールで仕込んだ。

第4節 小括

焼酎麴，焼酎酵母を用いて焼酎仕込みにおいて，もろみおよび焼酎蒸留残渣の α -EGが高含有となる焼酎醸造法の開発を行った。

米と麦を原料に仕込みを行い，清酒における α -EG高含有仕込み時の酵素配合を参考に，麴米の量を減らし酵素剤の添加量を変えることで α -EG高生産の検討を行った。 α -EG濃度は麴米を減量した仕込み条件が高い傾向にあった。また二次もろみの発酵温度を変えることで α -EGの生産性に影響があるか調べることを目的に，二次もろみの発酵温度を15℃，20℃，30℃に設定し仕込みを行った。 α -EGは麴量が少なく，20℃発酵の条件が生産性の高い傾向にあった。これは低温発酵により麴中の各酵素活性が抑制され，さらに，酵素剤でAA活性とAG活性を補ったことが要因であると考えられた。15℃ではアルコール濃度はその他の条件よりもわずかに低かったが，発酵期間を延長させることで20℃で発酵させるよりも α -EGが高濃度になる可能性がある。米焼酎や麦焼酎において，2.0 w/v%の高含有仕込みを開発することができた。

α -EG高含有焼酎もろみを蒸留し製造した焼酎の品質を評価するために，通常仕込みと α -EG高含有仕込みで造られた焼酎に差がないか官能試験を行った。通常仕込みのサンプルと α -EG高含有サンプルにおいて米・麦ともに官能評価に差が認められなかったため， α -EG高含有仕込みで試験製造した焼酎の品質に問題はなく，付加価値を付けた焼酎残渣の開発が可能であることが示された。これまで主に廃棄処理されていた米と麦の焼酎蒸留残渣中の α -EG含量を高め α -EG高含有成分として利用することを可能にする醸造法を開発した。

本章で用いた焼酎麴菌 (*Aspergillus awamori*) は， β -グルコシダーゼ生産能を持つ¹²⁾ ため，麦の β -グルカンとエタノールを基質として β -EGがもろみ中に生産されている可能性があり今後検討したい。なお，セラチノサイトの分化を誘導

することで UV-B によって引き起こされた皮膚のバリア機能を回復する作用を持つのは β -EG では無く α -EG であることが報告されている¹³⁾。

これまでも焼酎残渣の有効利用法として、化粧品素材や飲料の開発が行われているが、我々は、今回開発した α -EG を高含有する焼酎残渣を利用した飲用でも塗布でも美容効果のある新たな保湿素材を開発し、食品または化粧品へ応用したいと考えている。

参考文献

1. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎: 日本農芸化学会誌, 第 50 巻, 455-461, 1976
2. 岡智: 日本醸造協会雑誌, 第 72 巻, 631-635, 1977
3. 三嶋智之, 尾関健二: FFI ジャーナル, **219**, 275-280, 2014.
4. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健: 日本醸造協会誌: 第 77 巻, 393-397, 1982
5. 財団法人 日本醸造協会編, 醸造物の成分, 139-141, 1999
6. 廣瀬茂: 化学工学論文集, 28, 621-625, 2002
7. Y. Kadota, S. Hirose, H. Iefuji, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka: *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **38**, 154-157, 2005
8. 藤井力: 日本醸造協会誌, 第 104 巻, 111-118, 2009
9. C. Hairong, W. Ben, L. Jiyang, J. Mingguo, L. Shuangjun, D. Zixin, *Microbial Cell Factories*, 10, 1-12, 2011
10. 三枝継彦, 原田倫夫: 日本醸造協会誌, 第 89 巻, 435-440, 1994
11. 平田みよ, 浦野義崇, 稲葉繁樹, 北谷和之, 岡崎俊朗, 北垣浩志: 日本醸造協会誌, 第 106 巻, 848-853, 2011
12. 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝: 日本醸造協会誌, 第 51 巻, 536-539, 1991
13. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno, T. Horikoshi: *Skin Pharmacol.*, **10**, 153-159, 1997

第4章 清酒醸造副産物を利用した α -EG 高含有酒粕再発酵酒の発酵 生産法の開発

第1節 緒言

飲酒したヒトの尿から検出されたことをきっかけとして清酒に含有される成分として同定された α -EG は¹⁾、清酒にエタノール、グルコースについて水を除く第3成分として含有されている分子量 208.21 の配糖体で²⁾、口に含むと直ぐに感じる甘味と遅れて感じる苦味がある。 α -EG は清酒中には通常 1 w/v%以下の濃度で含有されており、その濃度はビールやワインなどの他の醸造酒と比較して高い^{3, 4)}。伝承的に日本酒を良く飲む蔵人や相撲取りは肌にハリやツヤがあると言われてきたが、ヘアレスマウスに経口投与し皮膚に及ぼす影響を調べた実験で、 α -EG には飲用でも肌質の改善に効果があることが広常らによって報告されている⁵⁾。しかし、清酒中の α -EG の含有量は少なく⁴⁾製造コストの低減に課題がある。そこで本章では、 α -EG を発酵法で安価に製造することを目的に、清酒醸造の副産物である酒粕を用い、 α 化米又は米糠（白ヌカ）をデンプン原料として補填した仕込試験を行い、 α -EG を含有する酒粕再発酵酒の醸造を試みた。次に、ボランティアの肌に酒粕再発酵酒を塗布した後角層水分量の変化を測定し、醸造した酒粕再発酵酒が目的とする保湿機能を有することを検証した。図 4-1 に本研究で検討した仕込方法、図 4-2 に一般的な清酒の仕込方法を示す。

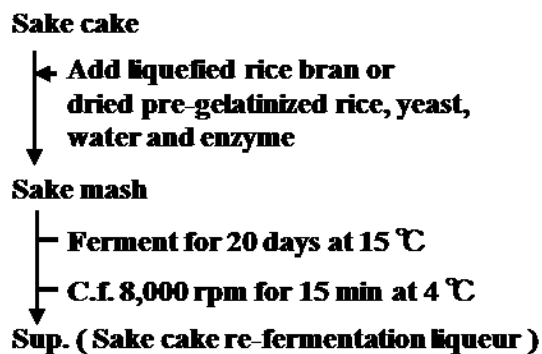


図 4-1 酒粕再発酵酒の仕込み

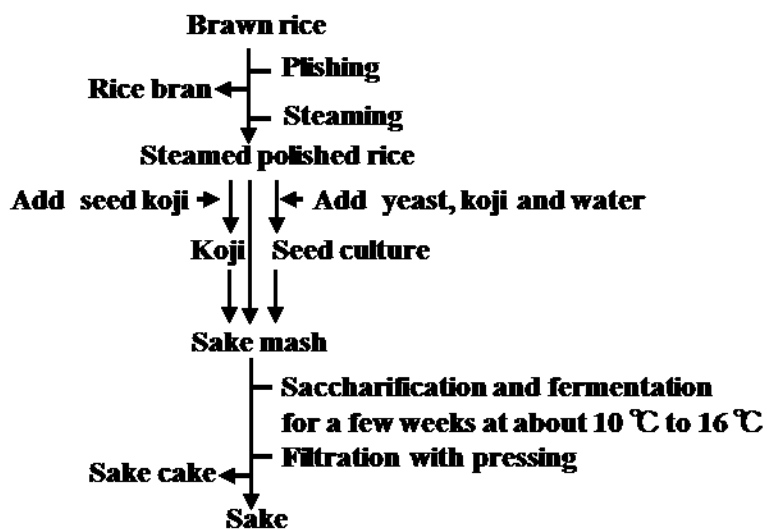


図 4-2 一般的な清酒の仕込み

第2節 材料および方法

第1項 材料

仕込み材料

- ・酒粕：本醸造板粕（国産米，精米歩合 70%以下，以下酒粕，㈱車多酒造，石川県白山市）又は鍊り粕（純米酒酒粕を数ヶ月熟成，㈱福光屋，石川県金沢市）
- ・米： α 化米（国産米，精米歩合 70%，徳島製麹㈱，徳島県阿波市）
- ・米ヌカ：白ヌカ（国産米，精米歩合 85%~75%，㈱車多酒造，石川県白山市）
- ・酵母：清酒酵母 7 号 (*Saccharomyces cerevisiae* K7 NBRC 101557)
- ・汲み水：Reverse Osmosis 処理水（精製水）を乳酸で pH 2.65 に調整
- ・ α -アミラーゼ（AA）剤(以下 AA 剤)： スミチーム L (*Aspergillus oryzae* 由来)，12,000 U/粉末 g (新日本化学工業㈱，愛知県安城市)
- ・ α -グルコシダーゼ（AG）剤(以下 AG 剤)： α -グルコシダーゼ「アマノ」SD (*Aspergillus niger* 由来)，60,000 U/粉末 g (天野エンザイム㈱，愛知県名古屋市)
- ・ α -グルコシダーゼ（TGB）剤(以下 TGB 剤)： 四段用 TG-B (*Aspergillus niger* 由来)，300,000 U/粉末 g (天野エンザイム㈱，愛知県名古屋市)

肌試験材料

- ・ α -EG 高含有酒（ α -EG 濃度：2.5 w/v%，エタノール濃度：15 v/v%）
- ・対照（エタノール濃度：15 v/v%）
- ・ α -EG 試薬（ α -EG 濃度：2.5 w/v%，エタノール濃度：15 w/v%）
- ・水分計（Corneometer CM825，Courage+ Khazaka 社製：㈱インテグラル，東京都品川区）
- ・パッチテスト用テープ（鳥居薬品㈱，東京都中央区）
- ・エタノール， α -EG（和光純薬工業㈱，大阪府大阪市）

第2項 方法

酒粕と α 化米を用いた小仕込み方法

酒粕の種類と α 化米の添加量の検討

酒粕の種類と α 化米の添加量を検討する目的で以下の条件で仕込み試験を行った。

- ① 容器に汲み水と酒粕を加えた。
- ② 容器に AA 剤，AG 剤， α 化米，酵母を添加して混合した。
- ③ インキュベーターを用いて 15°C で 20 days，開放静置発酵させた。
- ④ 発酵物を 4°C，8,000 rpm，10 min で遠心分離した。
- ⑤ 上清を回収し HPLC を用いて α -EG 濃度を分析した。

表 4-1 仕込み条件

材料	1	2	3	4
新鮮な酒粕 (g)	10	10	—	—
熟成酒粕 (g)	—	—	10	10
α 化米 (g)	—	20	—	20
汲水 (ml)	10	50	10	50
AG (mg)	10	10	15	15

汲み水量の検討

汲み水量による α -EG 生産性を検討するため小仕込みを行った。表 4-2 の条件で 15°C で 20 日間開放静置発酵させた。発酵物を遠心分離して上清を回収し，HPLC で α -EG 濃度を分析した。

表 4-2 仕込み条件

材料	1	2	3	4	5	6
酒粕 (g)	10	10	10	10	10	10
α 化米 (g)	10	10	10	10	10	10
精製水 (ml)	20	40	60	20	40	60
TGB (mg)	10	10	10	15	15	15
AA (mg)	50	50	50	50	50	50
酵母 (x 10 ⁶ cells/ml)	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3
pH	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

グルコシダーゼの種類と使用量の検討

表 4-3 に示した酒粕と精製水を混合した後、pH 5.0 に調整し、AA 剤、 α -グルコシダーゼ剤(AG または TGB)、 α 化米、酵母を添加して混合した。その後、15℃で 20 日間、開放静置発酵させた。発酵終了後、もろみを遠心分離して上清を採取し、HPLC で α -EG 濃度を分析した。

表 4-3 仕込み条件

材料	1	2	3	4
酒粕 (g)	10	10	10	10
α 化米 (g)	10	10	10	10
精製水 (ml)	20	20	20	20
AA 剤 (mg)	50	50	50	50
AG 剤 (mg)	10	15	—	—
TGB 剤 (mg)	—	—	10	15
酵母 (cells/ml)	5.3×10^6	5.3×10^6	5.3×10^6	5.3×10^6
pH	5.0	5.0	5.0	5.0

酒粕と白ヌカ液化液を用いた小仕込み

液化液の作製方法

白ヌカ 50 g に対して精製水 200 ml 及び AA 剤 500 mg を加え、40℃ で 24 時間振とうした後、再度白ヌカを 50 g 添加し 40℃ で 1 時間振とうした。液化液は固液分離せずに全量をもろみに添加した。

白ヌカ液化に使用する AA 剤の添加量の検討

液化時に添加する AA 剤を 0.5 g, 1.0 g または 1.5 g として「液化液の作製方法」に記載の方法で液化した。

酒粕と白ヌカ液化液を用いた小仕込み方法

酒粕 10 g に白ヌカ液化液及び酵素剤を加え、酵母を汲み水に対して 5.3×10^6

cells/ml 添加し、15℃一定で20日間発酵した後、遠心分離によって固液分離を行った（表4-4）。試験区によって白ヌカ液化液，仕込水量及び各種酵素剤の添加量を調整した。

表 4-4 基本となる仕込み条件

材料	1	2
白ヌカ液化液 (g)	30	30
酒粕 (g)	10	10
TGB (mg)	10	15
酵母 ($\times 10^6$ cells/ml)	5.03	5.03

酒粕添加の必要性の検証のための小仕込み試験

「酒粕と白ヌカ液化液を用いた小仕込み方法」の仕込み条件で，酒粕を添加しない区分を設けた仕込みを行った。

白ヌカ液化液の液化条件が α -EG 生産に与える影響

「酒粕と白ヌカ液化液を用いた小仕込み方法」において，「白ヌカ液化に使用する AA 剤の添加量の検討」の条件で作製した白ヌカ液化液を用いて仕込みを行った。

白ヌカ液化液の添加量が α -EG 生産に与える影響

「酒粕と白ヌカ液化液を用いた小仕込み方法」において白ヌカ液化液の添加量を 30 g，40 g または 50 g として仕込みを行った。

α -EG の定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 6)以下の条件で定量した。

- ・ 測 定 器: Alliance HPLC システム 2695 (Waters , MA, US)
- ・ 検 出 器: RI 検出器 2414 (Waters , MA, US)
- ・ カ ラ ム: Shodex SPO 810 , 8 × 30 mm, Pb 2+ cation exchange column (昭和電工株, 東京都港区)
- ・ 移 動 相: H₂O
- ・ 流 速: 400 μ l/min
- ・ 温 度: 65°C
- ・ 分析時間: 35 min
- ・ 標準物質: α -EG (和光純薬工業株, 大阪府大阪市)
- ・ サンプルは 0.45 μ m のフィルターでろ過した後, インジェクションした。

角層水分量の定量

α -EG および α -EG 高含有酒がヒト肌へ与える影響を調べるため, 肌へ塗布して角層の水分量を測定した。以下に肌試験の方法を示す。なお, 本試験は自由意志で応募した学生ボランティアを対象に, 学校法人金沢工業大学研究支援機構運営委員会の承認 (承認日平成 26 年 12 月 24 日) を得て行った。

- ① 測定部位を水で洗い, 肌を傷つけないようにタオルで水気をふき取った。
- ② 肌を測定する環境に馴化するために 20 min 放置した。
- ③ サンプル塗布前の角層水分量を測定した。
- ④ パッチシートにサンプルを 0.1 ml 塗布し, 測定部位に貼り付けて 2 min 放置後, パッチシートを剥がした。(1 サンプル 3 ヶ所)
- ⑤ 剥がした時点を 0 min として 120 min 後の角層水分量を測定した。

第3節 結果および考察

第1項 酒粕と α 化米添加量の検討

酒粕を用いて α -EGを生産可能であるか検証する目的で酒粕と α 化米を用いて小仕み込試験を行った。新鮮な酒粕又は鍊り粕 10 g に α 化米無添加又は 20 g を加え精製水をそれぞれ 10 ml 又は 50 ml 加水して仕込み，生成した酒の α -EG濃度を測定したところ，酒粕のみではほとんど α -EGは生産されなかった(表 4-5)。

鍊り粕は酒粕を数ヶ月間熟成させているため，酒粕中の酵素作用によってデンプンが分解され α -EG合成の基質となる多糖やオリゴ糖は，通常の酒粕と比較すると少なくなっている。しかし，鍊り粕を用いて仕込んだ場合(1.7 w/v%)でも，新鮮な酒粕を使用した場合(1.9 w/v%)と比較して， α -EGの生産性は明らかに低いとは言えなかった。また，酒粕のみでは何れの酒粕でも α -EGは0.2 w/v%しか生産されなかった。このことから， α -EG生産に酒粕中の糖類は関与しないと考えられた。この結果から以降の仕込では，熟成期間を必要としない新鮮な酒粕を用いることにした。

表 4-5 異なる仕込み条件で仕込んだ酒の α -EG濃度

材料		添加量			
酒粕	(g)	10	10	-	-
鍊り粕	(g)	-	-	10	10
α 化米	(g)	0	20	0	20
汲み水	(ml)	10	50	10	50
TGB	(mg)	10	10	10	10
α -EG	(w/v%)	0.2	1.9	0.2	1.7

第2項 汲み水量の検討

糖質原料と汲み水の配合を決定するために、酒粕 10 g、 α 化米 10 g、汲み水を 20 ml、30 ml 及び 40 ml にして仕込み試験を行った結果、汲み水が 20 ml、30 ml 及び 40 ml の場合 α -EG 濃度はそれぞれ 2.8 w/v%、1.0 w/v% 及び 0.2 w/v% であり、汲み水を 20 ml の 1.5 倍または 2.0 倍にすると α -EG 濃度はそれぞれ約 3 分の 1 または 14 分の 1 に減少した（図 4-3）。もろみに添加する汲み水を増やすと流動性が高くなり作業性が良くなったが、 α 化米の 4 倍量の汲み水を加えると、 α -EG の濃度は 2 倍量を加えたときの 10 分の 1 以下となった。基質となる糖類が希釈され、さらにエタノール発酵によって生産されるエタノールの濃度が低くなったために α -EG 生成反応が進まなかったことが原因と考えられた。

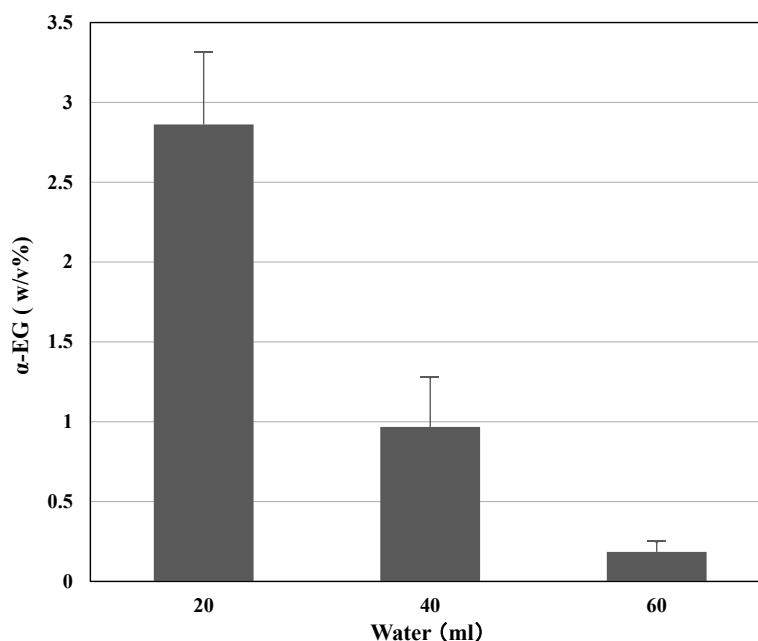


図 4-3 もろみへの汲み水添加量が α -EG 生成に与える影響

10 g の酒粕に 20, 40 または 60 ml の水、AA 剤 50 mg、TGB 10 mg および 10 g の α 化米をもろみに加え 15℃で 20 日間発酵した。値は 3 つの仕込みの平均値±標準偏差。

第3項 α -グルコシダーゼの種類と使用量の検討

α -グルコシダーゼの使用量については、大きな差は認められなかったが、 α -グルコシダーゼとして TGB 剤を用いた場合に AG 剤を用いるよりも α -EG の生産性が高くなる傾向であった(図 4-4)。この結果は、 α -グルコシダーゼ比活性が TGB 剤は AG 剤の 5 倍であることおよび TGB 剤は清酒醸造で甘味を抑えて、「こく味」のある清酒を製造する目的で、米からオリゴ糖を主体とした液化液を作る際に用いる酵素であることと整合する。また、単位重量あたりの TGB 剤の価格は AG 剤の約 2 分の 1 でありコスト面からも TGB 剤の使用が有利である。酒粕 10 g, α 化米 10 g, TGB 15 mg, 汲み水 20 ml の時に α -EG 濃度が 3 w/v% となり試験区分でもっとも高濃度であった。

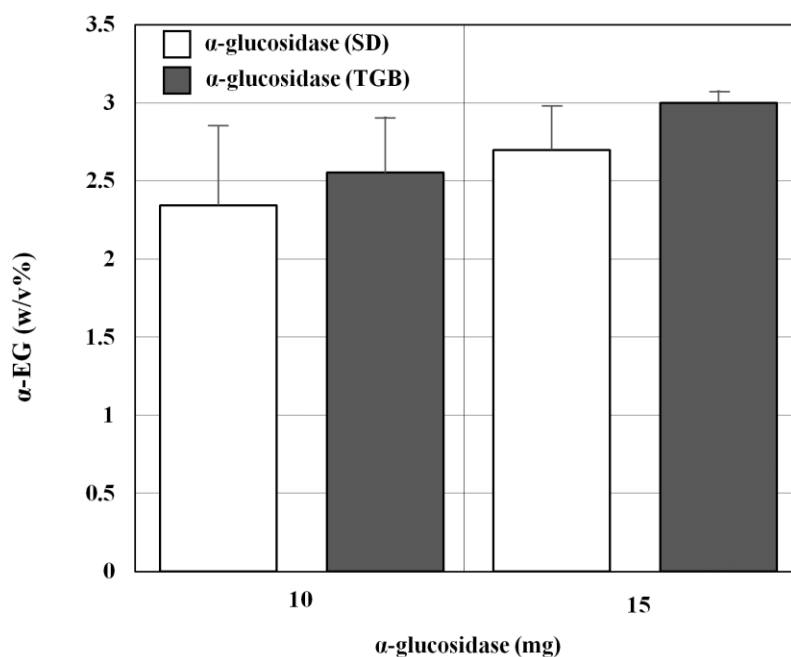


図 4-4 もろみへのデンプン糖化酵素添加量が α -EG 生成に与える影響

10 g の酒粕に 20 ml の水, AA 剤 50 mg, 10 g の α 化米をもろみに加え, 10 または 15 mg の AG 剤または TGB 剤を加え 15°C で 20 日間発酵した。値は 3 つの仕込みの平均値 $\pm$ 標準偏差。

第4項 酒粕添加の必要性の検討

α 化米に代えて安価な原料である白ヌカを原料とした仕込み試験で、デンプン原料として白ヌカ液化液のみを用いた仕込みと、酒粕を添加した仕込みを比較すると酒粕を添加した区分で α -EG が 2 倍以上生産された(図 4-5)。酒粕のみでは α -EG はほとんど生産されなかった(表 4-5)が、液化液に酒粕を添加した区分では酒粕に含まれる窒素源やビタミンなどの成分が酵母による発酵を促進したため 2 倍以上生産されたと考えられ、酒粕の添加効果が確認された^{7, 8, 9)}。TGB 剤の添加量が 15 mg の場合に 10 mg 添加した区分よりも α -EG 濃度が低くなったのは、TGB 剤にはグルコアミラーゼ活性が夾雑しているために、エタノール濃度が低い発酵の初期にデンプンがグルコースまで分解されてしまい基質となるオリゴ糖が減少するためと考えられた。

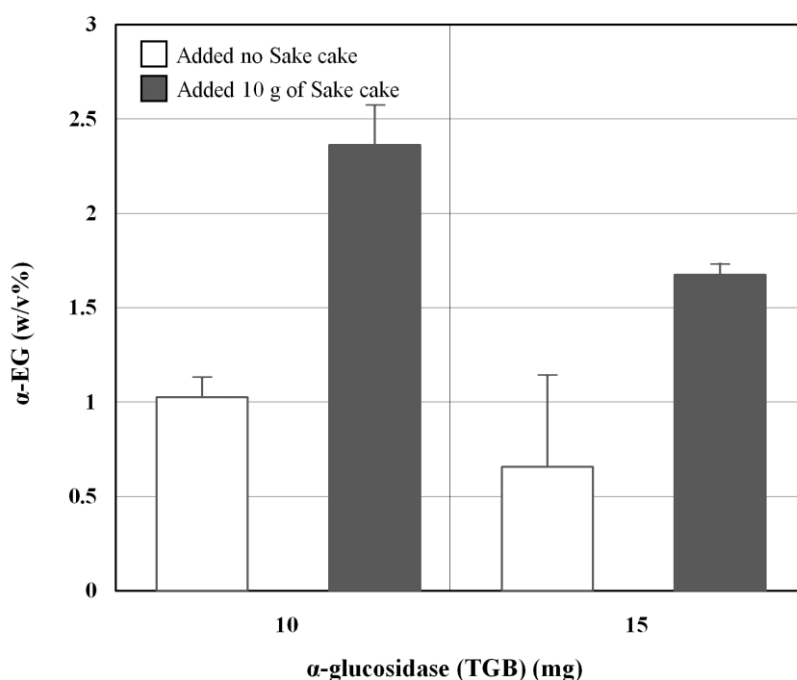


図 4-5 酒粕の添加の有無が α -EG 生産に与える影響

白ヌカ液化液 30 g に TGB 剤を 10 mg または 15 mg, 酒粕を 10 g 添加もしくは無添加で 15℃ で 20 日間発酵した。値は 3 つの仕込みの平均値 $\pm$ 標準偏差。

第5項 白ヌカ液化液の液化条件の検討

液化液を作製する際の α -アミラーゼの添加量を検討することを目的に、白ヌカ 100 g に対して AA 剤を 0.5 g, 1.0 g または 1.5 g 添加して液化液を作製し、またもろみに加える TGB 剤の添加区分を 10 mg と 15 mg として小仕込試験を行った。AA 剤及び TGB 剤の添加量が多いほど α -EG 濃度は低下した (図 4-6)。

この結果はデンプン分解酵素の添加量がデンプンに対して過多になると分解が進みすぎるためと考えられ、 α 化米を用いた場合と逆の結果であった。

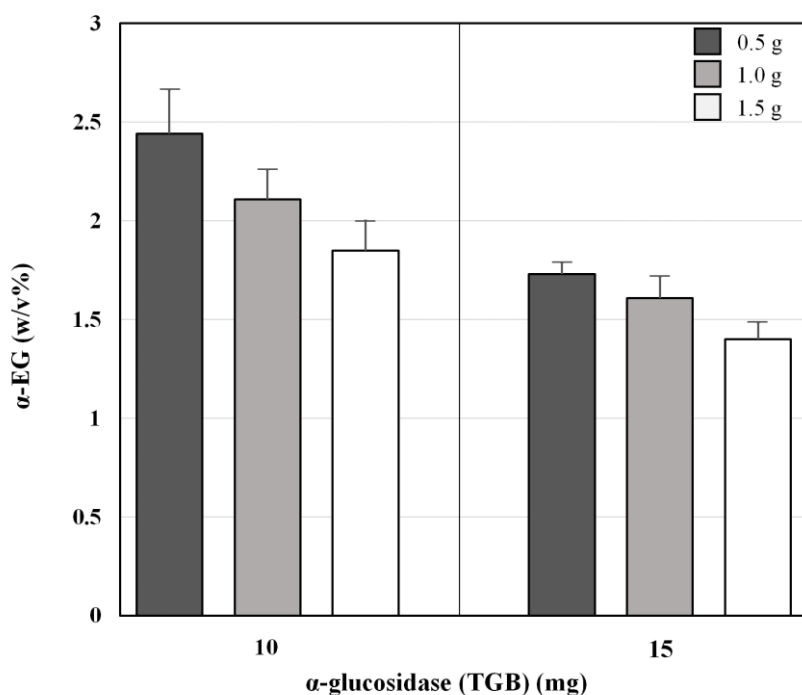


図 4-6 白ヌカ液化時の α -アミラーゼ添加量が

α -EG 生産に与える影響

白ヌカ 100 g を 0.5 g, 1.0 g または 1.5 g の AA 剤で液化した。10 g の酒粕にそれぞれの白ヌカ液化液 30 g と 10 または 15 mg の TGB 剤を加えて 15℃で 20 日間発酵した。値は 3 つの仕込みの平均値 + 標準偏差。

第6項 白ヌカ液化液添加量の検討

α -EG が高生産となる酒粕と白ヌカ液化液のもろみへの添加量を求める目的で、酒粕 10 g に対して異なる量の液化液を添加して仕込を行った。TGB 剤の添加量が 10 mg のとき、液化液の添加量が増加するに従って α -EG 濃度が低くなった（図 4-7）。このとき α -EG の総量は液化液の添加量に比例して増加したが、液化液の添加量を増すとデンプン原料 1 g に対する α -EG 収量は減少した。TGB 剤を 15 mg 及び液化液 50 g を添加した場合 α -EG 濃度が約 2.1 w/v% となり、 α -EG の総量は最も多くなったが、デンプン原料 1 g に対する α -EG 収量（15.8 mg/g）は、TGB 剤 10 mg、液化液 30 ml の仕込条件の収量（17 mg/g）には及ばなかった。

酒粕 10 g に対して液化液を 30 g、40 g または 50 g 添加すると TGB 剤の添加量が 10 mg の場合は添加量が増えるに従って α -EG 濃度が減少した。原因としては反応を触媒する TGB 剤が不足する、もしくは基質であるエタノールが不足している可能性が考えられた。しかし、添加する液化液が 30 g および 40 g の場合は TGB 剤を 15 mg に増やした試験区ではさらに α -EG 濃度が低くなっていたことから、TGB 剤の不足は原因ではないと考えられた。白ヌカ液化液を糖原料とする場合は、酒粕 10 g に対して、液化液 30 g、TGB 剤 10 mg を用いた場合の α -EG 濃度 2.44 w/v% が最大値であった。

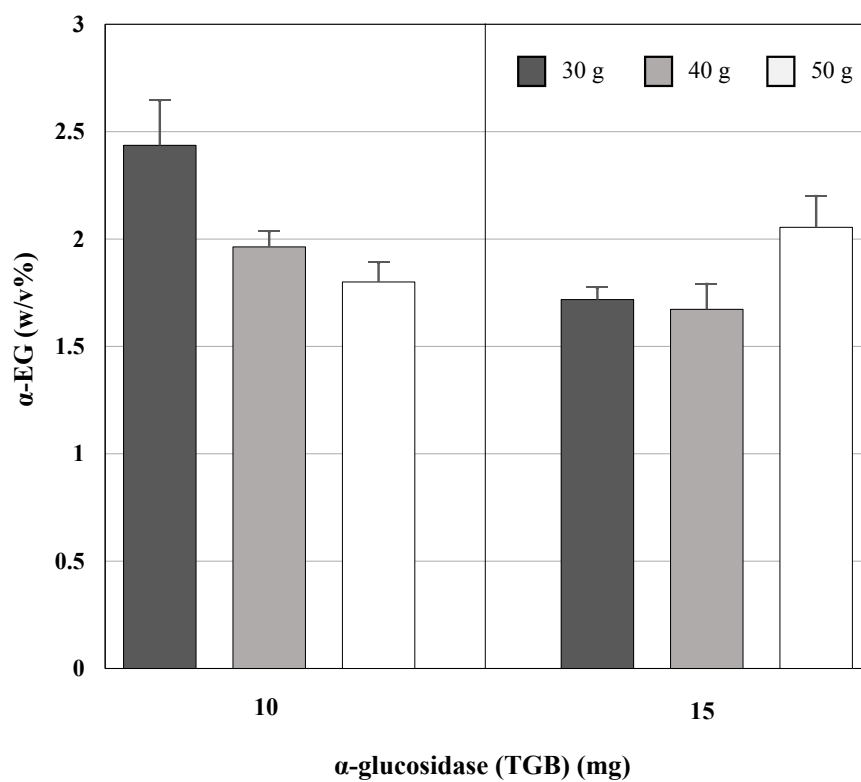


図 4-7 白ヌカ液化液と α -グルコシダーゼの添加量が

α -EG 生産に与える影響

10 g の酒粕に 30 g, 40 g または 50 g の液化液, 10 または 15 mg の TGB 剤を加えて 15℃で 20 日間発酵した。値は 3 つの仕込みの平均値 + 標準偏差。

第7項 異なるデンプン原料を用いた小仕込み試験における α -EGの生産量

酒粕と α 化米または白ヌカ液化液2種のデンプン原料を用いた仕込条件で、最も α -EGの生産性が高くなった仕込配合を表4-6にまとめた。デンプン原料1gあたりの α -EGの収率は、 α 化米22 mg、無蒸きょう白ヌカ17 mgとなり α 化米の方が高い収率であった。

α -EGの濃度は、デンプン原料として α 化米、白ヌカを用いた場合にそれぞれ3.0 w/v%, 2.4 w/v%, デンプン原料に対する α -EGの収量はそれぞれ22 mg/ml, 17 mg/mlとなった。 α 化米を用いた場合に濃度、収量共に高い値であったが、原料コストを考慮すると白ヌカが有利であると考えられた。以上の結果から醸造副産物である酒粕と白ヌカを用いることで α -EGを高含有する酒粕再発酵酒を製造できた。米と比較して非常に安価な酒粕と白ヌカを用い、さらに麴に換えて酵素剤を用いることで α -EGを高含有する酒粕再発酵酒を安価に製造することが可能であった。

エタノールと糖類を基質として酵素剤を用いて工業的に α -EGを大量に生産する方法が開発されているが¹⁰⁾、本研究で作製した酒粕再発酵酒は、清酒の醸造副産物である酒粕と米を原料として発酵法により製造したものであり、発酵によって生産されるアミノ酸や有機酸などとの相加効果が期待される。また、清酒の醸造法を参考にした発酵法で製造している点も消費者の自然志向に対して訴求できるものと考えている。さらに、清酒にはエタノールの刺激を緩和させる糖質や皮膚の弾力を上げる α -グルコシルグリセロール、天然保湿因子のアミノ酸など化粧品に含まれている成分が複数存在することが知られており、清酒醸造法を踏襲して製造した酒粕再発酵酒にも同様の成分が含まれていると考えられる^{11, 12, 13)}。

表 4-6 異なるデンプン原料における α -EG の生産量

材料	添加量	
酒粕 (g)	10	10
α 化米 (g)	10	-
白ヌカ液化液 (g)	-	10
汲み水 (ml)	20	20
AA 剤 (mg)	50	50
AG 剤 (TGB) (mg)	15	10
	生産量	
α -EG (w/v%)	3.0	2.4
α -EG yield (mg/g starch source)	22	17

第8項 保湿効果の検証

本章で開発した方法で製造した酒粕再発酵酒が期待される機能性を有しているか確認するために肌の保湿試験を実施した。15 v/v% エタノールと 2.5 w/v% α -EG を含有する酒粕再発酵酒から、 α -EG とエタノールをそれぞれ、0.16 w/v%, 0.9 v/v% 及び 0.03 w/v%, 0.19 v/v% 含有する希釈サンプルを調製した。なお、各サンプルと同濃度のエタノール（以下、基剤）を対照とした。これらの試料を塗布した場合の 120 分後の水分量を測定した結果を図 4-8 に示した。酒粕再発酵酒は α -EG 濃度が 0.16 w/v% のとき、水分量が基剤を塗布した場合の 119.6% となり、基剤（100.0%）及び試薬の α -EG（111.0%）に対して共に有意に水分量が高かった。

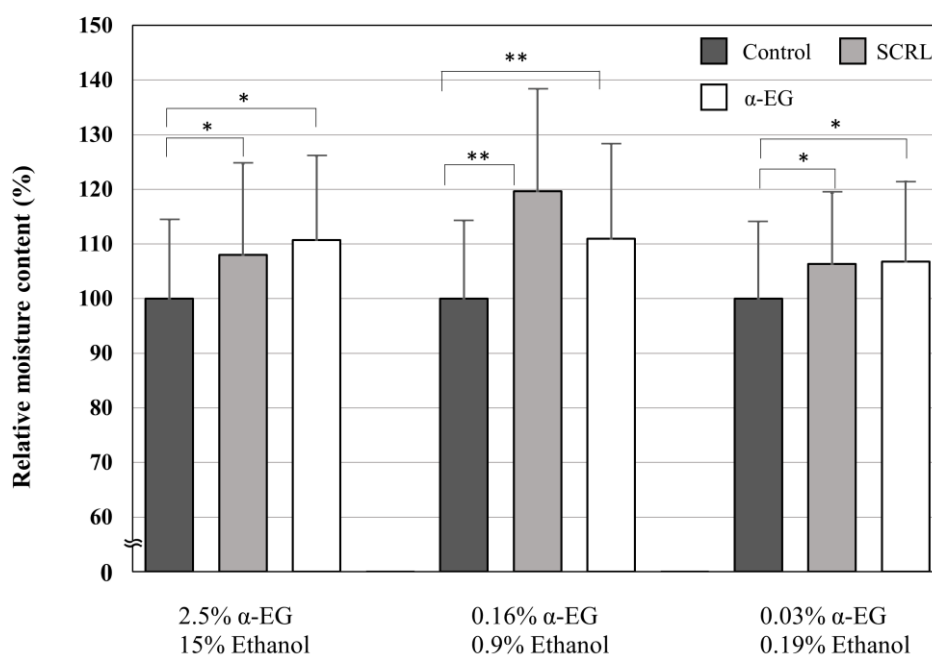


図 4-8 試料塗布 120 分後の角質層の水分量

各試料を塗布した皮膚の水分量をエタノールを塗布した皮膚の水分量に対する相対値で示した。Control：エタノールを塗布，SCRL：酒粕再発酵酒を塗布， α -EG： α -EG のエタノール溶液を塗布。値は 8 人の平均値＋標準偏差，* p <0.05，** p <0.01 vs. 対照（t 検定）。

酒粕再発酵酒， α -EG 試薬共に 2.5 w/v%から 0.03 w/v%の低濃度でも保湿効果を示し， α -EG 濃度 0.16 w/v%のサンプルでは，他の濃度のサンプルと比較して，酒粕再発酵酒は α -EG 試薬よりも保湿効果が高い傾向を示した。酒粕再発酵酒には天然保湿成分として知られているアミノ酸や有機酸が含まれており，0.16 w/v% α -EG のサンプルは天然保湿成分と α -EG およびエタノールの含有量のバランスが保湿に適していると考えられた。2.5 w/v% α -EG のサンプルは 15 v/v%エタノールを含有するためにエタノールの影響が強く，0.03 w/v% α -EG のサンプルでは濃度が低いために両者の保湿効果に差が現れ難いと考えられた。既知の α -EG の効果として α -EG が肌から表皮層に浸透し，表皮細胞の角化を促進させて荒れ肌を抑制する機能が報告されているが¹⁴⁾，週単位の試験であり，本研究の時間単位の保湿効果は異なるメカニズムによるものと考えられる。また，今回は皮膚の保湿機能が高い 20 歳代を対象に皮膚保湿試験を行ったが，今後中高年を対象とした場合の効果についても検討したい。

第4節 α -EG 発酵生産の原料コスト試算

第3章で製造した焼酎蒸留残渣抽出液および本章で製造した酒粕再発酵酒と清酒および既報の発酵法で生産した α -EGの原料コストを比較した。原料使用量および α -EGの生産量を表4-7に原料価格と α -EGの単価を表4-8に示した。表中の発酵法(*S.pombe*)はシゾサッカロミセス・ポンベを用いた既報¹⁵⁾から概算した。酒粕再発酵酒は清酒、発酵法(*S.pombe*)と比較してそれぞれ約7分の2、約2分の1の原料コストであった。焼酎蒸留残渣抽出液は清酒、発酵法(*S.pombe*)と比較してそれぞれ約20分の1、約11分の1の原料コストであった。焼酎蒸留残渣抽出液の焼酎もろみは肥料や飼料として販売する場合もあるが1 tonあたり数千円の処理費用が掛かる場合もある為0円として計算した。原料価格の比較では本研究で開発した発酵法による α -EG生産は従来法と比較して大幅なコスト削減となる。今後エネルギーコストについても検討する必要がある。

表 4-7 原料使用量

	麹 (kg)	米 (kg)	白ヌカ液化液 (kg)	酒粕 (kg)	焼酎もろみ (L)	マルトース (kg)	エタノール (L)	AG (kg)	AA (kg)	計 (L)	α -EG (w/v%)	収量 (L)
清酒	83	333								1,000	0.7	830
酒粕再発酵酒			750	250				0.25	1.25	1,000	2.4	500
米焼酎蒸留残渣抽出液					1,000			0.51	0.16	1,000	2.1	400
発酵法(<i>S.pombe</i>)						100	100			1,000	1.7	1,000

表 4-8 原料価格と α -EGの単価

	麹 (円)	米 (円)	白ヌカ液化液 (円)	酒粕 (円)	焼酎もろみ (円)	マルトース (円)	エタノール (円)	AG (円)	AA (円)	合計 (円)	α -EG (kg)	α -EG (円/kg)
清酒	49,980	66,660	0	0	0	0	0	0	0	116,640	5.81	20,080
酒粕再発酵酒	0	0	30,000	25,000	0	0	0	3,500	8,750	67,250	12	5,600
焼酎蒸留残渣抽出液	0	0	0	0	0	0	0	7,140	1,090	8,230	8.4	980
発酵法(<i>S.pombe</i>)	0	0	0	0	0	35,000	150,000	0	0	185,000	17	10,880

第5節 小括

醸造副産物である酒粕および白ヌカを原料として α -EG を高含有する酒粕再発酵酒を製造する醸造方法を開発した。

酒粕と α 化米を原料に小仕込み試験をした結果、酒粕のみでは殆ど α -EG は生産されなかったことから、酒粕のみでは糖質原料が不足していると考えられた。新鮮粕と熟成した粕では α -EG の生産性に差はなかった。汲み水は酒粕と α 化米の合計と等量を使用した場合に生産性が高かった。酒粕を添加する効果を検証する目的で、酒粕を添加もしくは無添加で仕込を行った結果、酒粕を添加した区分は無添加の 2 倍以上の α -EG を生産しており、酒粕の添加効果が確認できた。

白ヌカ液化液を調製する際に添加する AA 剤についても、もろみに添加する TGB 剤についても添加量が少ない場合に α -EG 濃度が高くなった。この結果はデンプン分解酵素の添加量がデンプンに対して過多になると分解が進みすぎるためと考えられた。

本醸造酒粕と白ヌカ糖化液を原料として、TGB 剤をもろみに添加し醸造した場合 α -EG 濃度 2.4 w/v% となり、一般的な市販酒の 2 倍以上の α -EG 濃度になった。

製造した酒粕再発酵酒を希釈し皮膚に塗布してその保湿効果を検討した結果、 α -EG 濃度 0.16 w/v%、エタノール 0.9 v/v% のとき、同濃度のエタノールを塗布した対照と比較して角層の水分量が約 20% 増加した。また、同濃度の試薬の α -EG を塗布した場合と比較して有意に水分量が増加しており、酒粕再発酵酒に含まれるアミノ酸などの天然保湿成分の相加的な影響が考えられた。2.5 w/v% α -EG のサンプルは 15 v/v% エタノールを含有するためにエタノールの影響が強く、0.03 w/v% α -EG のサンプルでは濃度が低いために保湿効果に差が現れ難いと考えられた。今回は皮膚の保湿機能が高い 20 歳代を対象に保湿試験を行ったが、今後皮膚の保湿機能が低くなっている中高年を対象とした保湿試験を検討したい。

第3章で製造した焼酎蒸留残渣抽出液および本章で製造した酒粕再発酵酒の原料コストは、酒粕再発酵酒は清酒、発酵法 (*S.pombe*) と比較してそれぞれ約7分の2, 約2分の1の原料コストであり、焼酎蒸留残渣抽出液は清酒、発酵法 (*S.pombe*) と比較してそれぞれ約20分の1, 約11分の1の原料コストであった。特に焼酎蒸留残渣を原料とした場合の原料コストは10分の1の1以下であり大幅なコスト削減である。焼酎蒸留残渣から調製した α -EGを化粧品原料等に利用すれば、産業廃棄物の処理費用を低減するだけではなく、産業廃棄物の有価物への変換が可能となる。従って今後は利用方法の開発を進める必要がある。

本研究で、麴及び酵素剤のAA, AGおよびGA活性のバランスが重要であることが示された。本研究でもろみに添加したAAは *Aspergillus oryzae* 由来, AG剤は *Aspergillus niger* 由来, GA剤は *Aspergillus niger* 由来であるが、酵素剤はその由来によって酵素バランスが異なっている。従って、実用化に際しては、今回用いた酵素剤と由来の異なる酵素剤についてもさらに検討する必要がある。また、麴由来酵素および酵素剤として添加した酵素のもろみ中におけるカイネテイクス解析を行い、もろみへの酵素剤の添加時期などについても検討する必要がある。

参考文献

1. T. Imanari and Z. Tamaru : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 321-324, 1971
2. 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎 : 日本農芸化学会誌, **50**: 463-468, 1976.
3. 岡智 : 日本醸造協会誌, 第 72 巻, 631-635, 1977
4. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健 : 日本醸造協会誌 : 第 77 巻, 393-397, 1982
5. 野村佳司, 水野昭博, 上田護国, 飯村穰, 斎藤和夫, 伊藤康 : 日本醸造協会誌, 第 86 巻, 378-381, 1991
6. C. Hairong, W. Ben, L. Jiyang, J. Mingguo, L. Shuangjun, D. Zixin, *Microbial Cell Factories*, 10, 1-12, 2011
7. 家村芳次, 片岡浩平, 原昌道 : 日本醸造協会誌, 第 91 巻, 130-135, 1996
8. 千田吉利, 小月輝雄, 吉沢淑, 田村學造 : 日本醸造協会誌, 第 88 巻, 397-401, 1993
9. 芳川憲司, 池田潔昭, 谷川弘晃, 山本一也, 宮本博文, 岡田茂孝 : 日本食品工業会誌, **41**, 878-885, 1994
10. 春見隆文, 佐々木堯, 滝有裕, 中山邦夫, 小田恒郎, 若生勝男 : 応用糖質科学, **47**, 117-124, 2000
11. F. Takenaka and H. Uchiyama : *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **64**, 1821-1826, 2000
12. 岩野君夫, 中沢伸重, 伊藤俊彦, 高橋仁, 上原泰樹, 松永隆司 : 日本醸造協会誌, 第 97 巻, 522-528, 2002
13. 広常正人 : 日本醸造協会誌, 第 99 巻, 836-841, 2004
14. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno, T. Horikoshi : *Skin Pharmacol.*, **10**, 153-159, 1997
15. 岡田茂孝, 芳川憲司, 神原積 : 特開平 2-291293

第 5 章 α -EG の保湿機能

第1節 緒言

清酒は日本の伝統的なアルコール飲料であり、古くから多くの人に飲み親しまれている。伝承的に杜氏や蔵人、相撲取りのように清酒をよく飲む人々の肌は艶や張りがあると言われている。このような背景から、清酒には美肌効果があるとされ、昔から清酒は飲用だけでなく、酒風呂や化粧水などにも使用されてきた¹⁾。200 L の湯量に対して日本酒 1 L を入れた酒風呂に 5 分間入浴し、入浴後経時的に皮膚角質層の水分量を測定した結果、酒風呂に入浴した場合の方が新湯に入浴した場合に比べて有意に保湿性が高いことが報告されている²⁾。そして、これまでの研究により、清酒の保湿効果にはエチル- α -D-グルコシド(α -EG)が関与していることが明らかにされている^{3, 4)}。

α -EG には様々な機能性が確認されており、その一つに荒れ肌改善効果がある⁵⁾。ヘアレスマウスの皮膚に清酒濃縮物の希釈液を 5 日間塗布し紫外線(UV-B)を照射した後、さらに 3 日間清酒濃縮物を塗布した実験では未塗布と比較して、経皮水分蒸散量(transepidermal water loss, 以下, TEWL)が有意に低下した⁵⁾。この時、0.05 w/v% α -EG 試薬を塗布した場合でも同様の効果が認められたため、 α -EG に UV-B 照射後の肌荒れを抑え TEWL の増加を抑制する機能があることが示唆されている⁵⁾。 α -EG の荒れ肌改善効果については、清酒濃縮物の希釈液または α -EG 含有飲料水を UV-B 照射ヘアレスマウスに飲用摂取させた実験でも同様に TEWL の増加が抑制されたと報告されており⁶⁾、 α -EG の荒れ肌改善効果については肌への塗布、経口摂取、共に効果があるとする報告がある^{5, 6)}。

上記のように、従来 α -EG の保湿効果についての検証にはマウスやラットが使用されていた^{1, 5, 6)}。しかし近年、ヒトに対する実験も行われており、我々はヒト肌に 100 μ l の 2.5 w/v% α -EG 試薬サンプルを含むパッチを 2 分間貼り、その後 15 分毎に 120 分まで皮膚表面の角質層に含まれる水分量を測定した結果、120 分

後の皮膚の水分保持量が対照に対して有意に増加したことを報告している³⁾。さらに、同様のヒト肌試験を α -EG 高含有酒で行った結果、120 分後の水分保持量が有意に増加し、 α -EG 試薬サンプルよりも保水能が高かったことを報告している⁴⁾。マウスにおいて α -EG の保湿効果が確認された実験は、UV-B 照射、前 5 日間、後 3 日後 α -EG を塗布した結果であった⁵⁾が、ヒト肌における実験では 120 分という短時間の測定で保湿効果が認められた^{3, 4)}。従って、このとき認められた保湿効果は、これまで考えられていた表皮細胞の増殖と角化のバランス回復⁵⁾とは異なるメカニズムによるものであると考えられている³⁾。

そこで、本章では α -EG 試薬を用いてヒト肌試験を行い、 α -EG 単独による効果を評価する。 α -EG が機能性成分として認知され、入浴剤や日用品、化粧水などに広く利用されるよう、産業利用範囲の拡大を目指す。

第2節 材料および方法

第1項 材料および機器

- ・ α -EG (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ Reverse Osmosis 処理水 (精製水)
- ・ エタノール (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ 試作シャンプー (株MOYU, 石川県金沢市)
- ・ 炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ クエン酸 (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ パッチテストター「トリイ」 (鳥居薬品(株), 東京都中央区)

第2項 方法

角層水分量の測定

α -EG を肌に塗布した場合の水分保持効果を評価するために、 α -EG 含有サンプルをヒト肌に塗布し、その後の角層の水分量を測定した。なお、本研究では被験者として、金沢工業大学バイオ・化学部・応用バイオ学科の学生（20代前半）の男女29名に協力していただいた。また、測定は本研究室の学生室で行い、空調や加湿器を使用して測定環境を調節した。測定環境は5月から7月では室温を22℃、湿度を60%に、10月から1月では室温を24℃、湿度を60%に設定した。

サンプル塗布後15分または30分ごとに120分または270分まで肌水分量を測定し、測定結果をもとに角質水分量変化率を求めた。なお、本試験は自由意志で応募した学生ボランティアを対象に、学校法人金沢工業大学研究支援機構運営委員会の承認（承認日平成26年12月24日）を得て行った。

- ① 測定部位を水で洗い、肌を傷つけないようにタオルで水気をふき取った。
- ② 肌を測定する環境に馴染ませるために20 min 放置した。

- ③ サンプル塗布前の肌水分量を測定した。
- ④ パッチシートにサンプルを 0.1 ml 塗布し，測定部位に貼り付けて 2 min 放置した。(1 サンプル 3 ヶ所)
- ⑤ パッチシートを剥がした。
- ⑥ パッチシートを剥がした時間を 0 min として 15 min ごとに 120 min まで肌水分量を水分計 (Corneometer CM825, Courage+Khazaka 社, ㈱インテグラル, 東京都品川区) を用いて測定した。

下記式から肌水分量変化率を算出した。

$$\text{角質水分量変化率(\%)} = \frac{\text{サンプル塗布後(15 - 270 min 後)の肌水分量}}{\text{サンプル塗布前の肌水分量}}$$

α-EG 配合シャンプーの調製

焼酎蒸留残渣抽出液の α-EG 濃度を 0.01, 0.02, 0.06, 0.12, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4 w/v% になるよう精製水で調整した。調製した α-EG 水溶液と試作シャンプーを 1 対 1 で混合しサンプルを調製した。

炭酸水（入浴剤）の作製

- ① 水 50 ml に，クエン酸 0.375 g, NaHCO_3 0.75 g を加え，混合した
- ② 混合したものを精製水で 100 倍希釈し，クエン酸 0.0075%，炭酸水素ナトリウム 0.015% とした。

第3節 結果および考察

第1項 α -EG 試薬の保湿効果

精製水を塗布した場合と α -EG 水溶液を塗布した場合の角質水分量変化率を比較した。 α -EG 濃度 0.06 w/v%, 0.08 w/v%, 0.1 w/v%, 0.2 w/v%, 0.3 w/v% の α -EG 試薬+精製水サンプルにおける塗布 120 分後の角質水分量変化率を図 5-1 に示した。なお、各濃度皮膚への塗布後 15 分から有意差が表れ、120 分まで持続した。 α -EG 濃度 0.3 w/v% では 5% 水準で有意差が認められ、 α -EG 濃度 0.2 w/v% から 0.06 w/v% では 1% 水準で有意差が認められた。この結果から、基剤が精製水の場合、 α -EG 濃度 0.06 w/v% 以上で α -EG の水分保持効果が確認された。また、各サンプルの角質水分量変化率の値を比較すると、 α -EG 濃度 0.1 w/v% で最大値となり、対照との差が最も大きくなった。

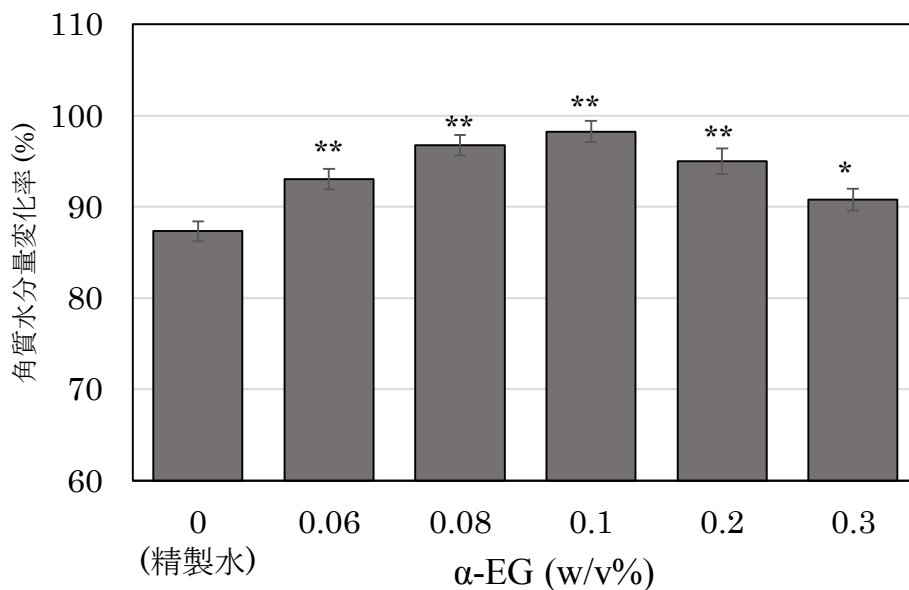


図 5-1 α -EG 塗布後 120 分の角質水分変化率

精製水または精製水に溶解した各濃度の α -EG を塗布した 120 分後の角質の水分量を試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値 $\pm$ 標準偏差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 精製水 (t 検定)。

第2項 0.01%エタノールを基剤とした α -EG 試薬の保湿効果

0.01 v/v% エタノール（基剤）を塗布した場合と α -EG 含有 0.01%エタノールを塗布した場合の角質水分量変化率を比較した。 α -EG 濃度 0.06 w/v%, 0.08 w/v%, 0.1 w/v%, 0.2 w/v%, 0.3 w/v% の α -EG 試薬+基剤サンプルにおける塗布 120 分後の角質水分量変化率を図 5-2 に示した。 α -EG 濃度 0.06 w/v% および 0.2 w/v% では 5%水準で有意差が認められ、 α -EG 濃度 0.08 w/v% および 0.1 w/v% のサンプルでは 1%水準で有意差が認められた。 α -EG 濃度 0.3 w/v% では基剤との有意差がなかった。この結果から、基剤が 0.01 v/v% エタノールの場合も、精製水の場合と同様に α -EG の水分保持効果は 0.06 w/v% 以上で現れたが、0.3 w/v% では効果は観察されなかった。各サンプルの角質水分量変化率の値を比較すると、 α -EG 濃度 0.08 w/v% のサンプルで最大値となり、基剤との差が最も大きくなった。

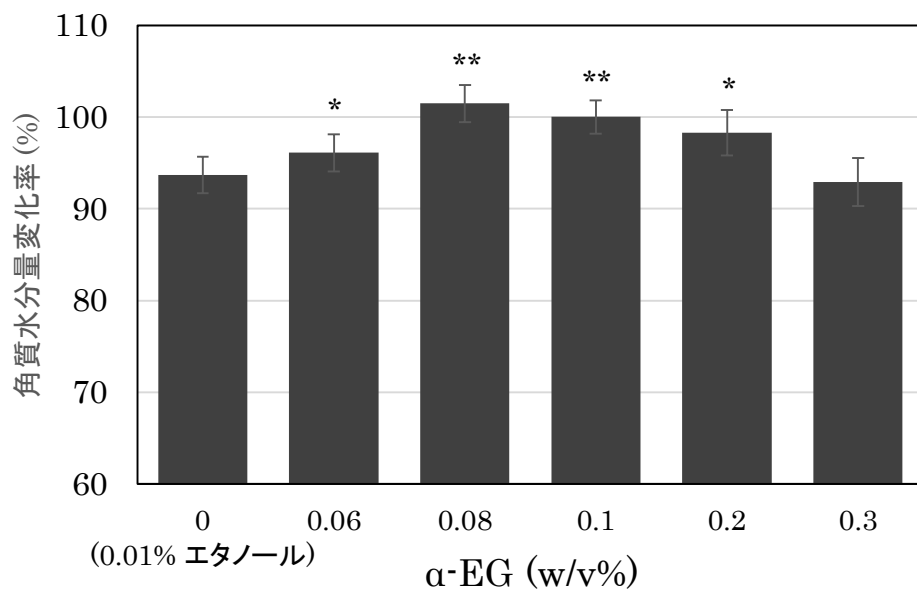


図 5-2 0.01 v/v% エタノールに溶解した α -EG 塗布後 120 分の
角質水分変化率

0.01v/v% エタノールまたは 0.01v/v% エタノールに溶解した各濃度の α -EG を塗布した 120 分後の角質の水分量を試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値±標準偏差, * p <0.05, ** p <0.01 vs. 対照 (t 検定)。

第3項 0.1%エタノールを基剤とした α -EG 試薬の保湿効果

0.1 v/v%エタノール（基剤）を塗布した場合と α -EG 含有 0.1%エタノールを塗布した場合の角質水分量変化率を比較した。 α -EG 濃度 0.01 w/v% - 0.3 w/v%の α -EG 試薬+基剤サンプルにおける塗布 120 分後の角質水分量変化率を図 5-3 に示した。

α -EG 濃度 0.3 w/v% - 0.01 w/v%まで 1%水準で有意差が認められた。基剤が精製水の場合よりも低い濃度まで効果が現れていることから、エタノール存在下ではより強い水分保持効果が現れると考えられる。また、各サンプルの角質水分量変化率の値を比較すると、 α -EG 濃度 0.1 w/v%で最大値となり、対照との差が最も大きくなった。

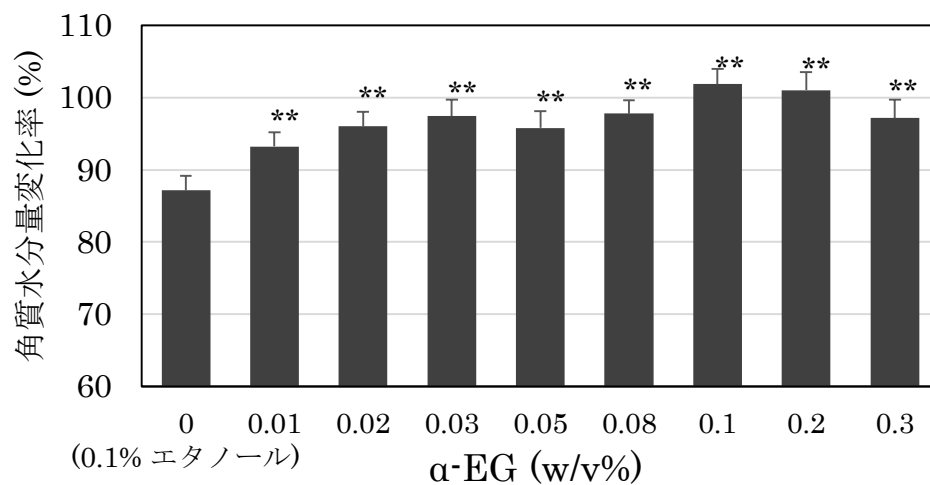


図 5-3 0.1v/v%エタノールに溶解した α -EG を塗布後 120 分の角質水分量変化率

0.1v/v% エタノールまたは 0.1v/v% エタノールに溶解した各濃度の α -EG を塗布した 120 分後の角質の水分量を試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値+標準偏差，** $p<0.01$ vs. 対照 (t 検定)。

第4項 α -EG による保湿効果の持続性の検討

α -EGの水分保持効果の持続性を評価するために、ヒト肌試験を行った。本項の肌試験では、サンプル塗布後30分ごとに最長270分まで肌水分量を測定し、測定結果をもとに角質水分量変化率を求めた。サンプルは、第1項から第3項の結果をもとに、最も効果が出やすかった α -EG試薬+0.1 v/v% エタノールサンプルを使用し、0.1 v/v% エタノールを塗布した場合と α -EGを塗布した場合の角質水分量変化率を比較した。 α -EG濃度0.06 w/v%, 0.08 w/v%, 0.1 w/v%における角質水分量変化率の経時変化をそれぞれ図 5-4, 図 5-5, 図 5-6に示した。

供試したすべてのサンプルで塗布30分後から270分後まで有意差が認められた。また、各サンプルの角質水分量変化率の値を比較すると、サンプル塗布30分後から270分後まですべての測定時間において、 α -EG濃度0.1 w/v%を塗布した場合に对照との差が最も大きくなった。 α -EG濃度0.1 w/v% で水分保持効果が現れやすく、その効果は270分持続した。

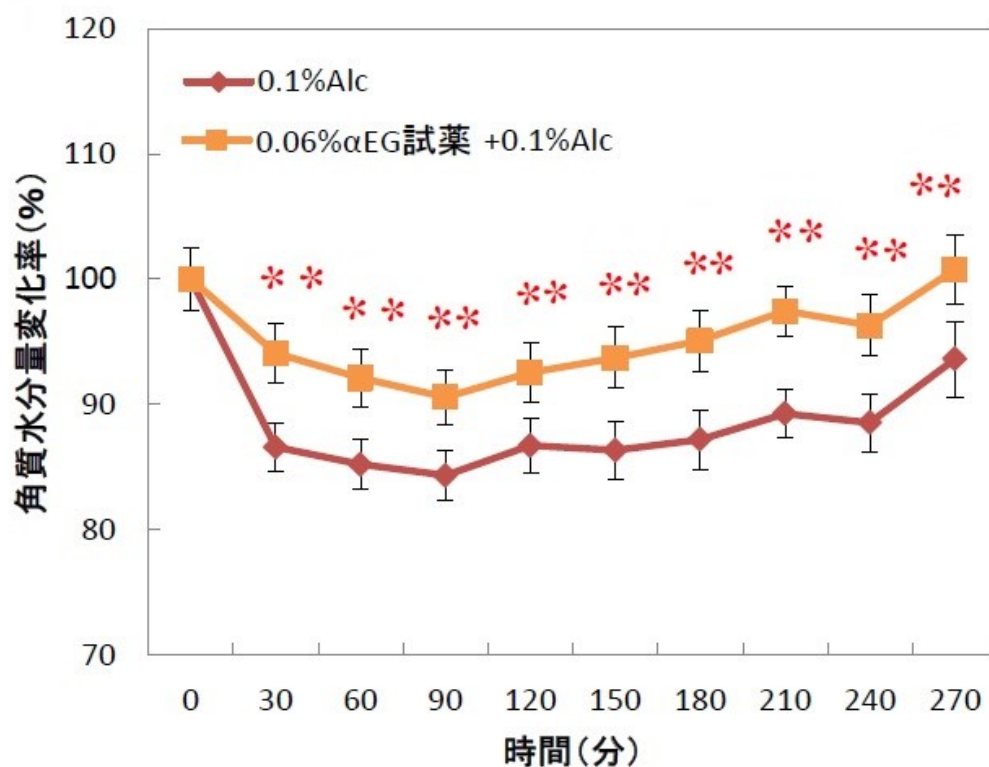


図 5-4 α-EG 濃度 0.06 v/v%における角質水分変化率の経時変化

0.1 v/v% エタノールまたは 0.06 w/v% α-EG 含有 0.1 v/v% エタノール溶液を塗布し、30 分毎に角質の水分量を測定し、試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値±標準偏差、** $p<0.01$ vs. 試料塗布前の水分量(t 検定)。

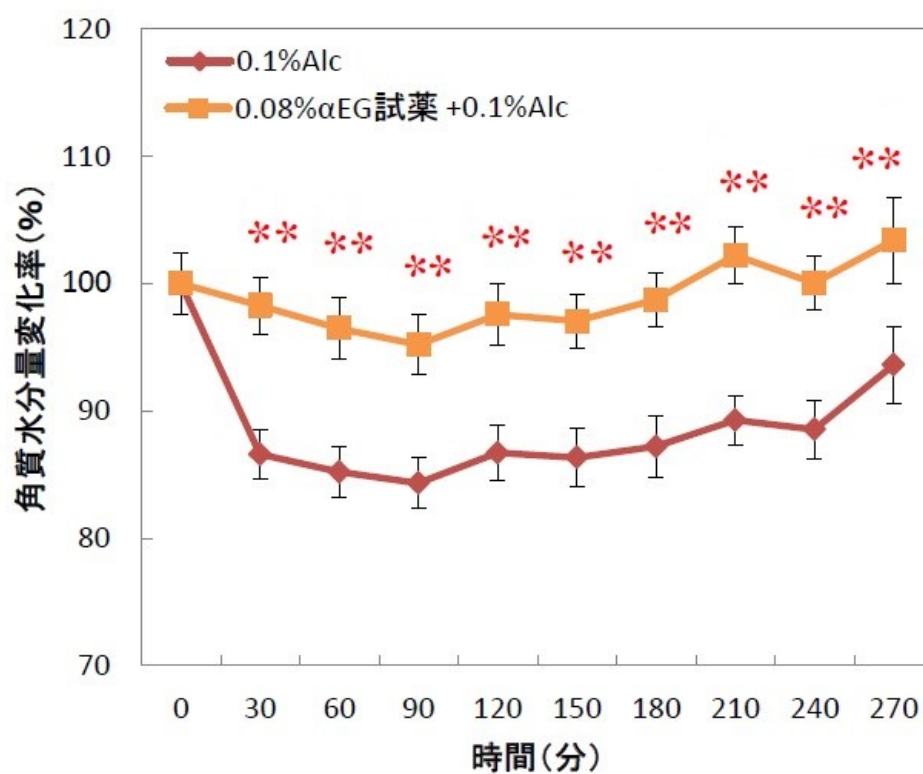


図 5-5 α-EG 濃度 0.08 v/v%における角質水分変化率の経時変化

0.1 v/v% エタノールまたは 0.08 w/v%α-EG 含有 0.1 v/v% エタノール溶液を塗布し、30 分毎に角質の水分量を測定し、試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値±標準偏差，** $p<0.01$ vs. 試料塗布前の水分量(t 検定)。

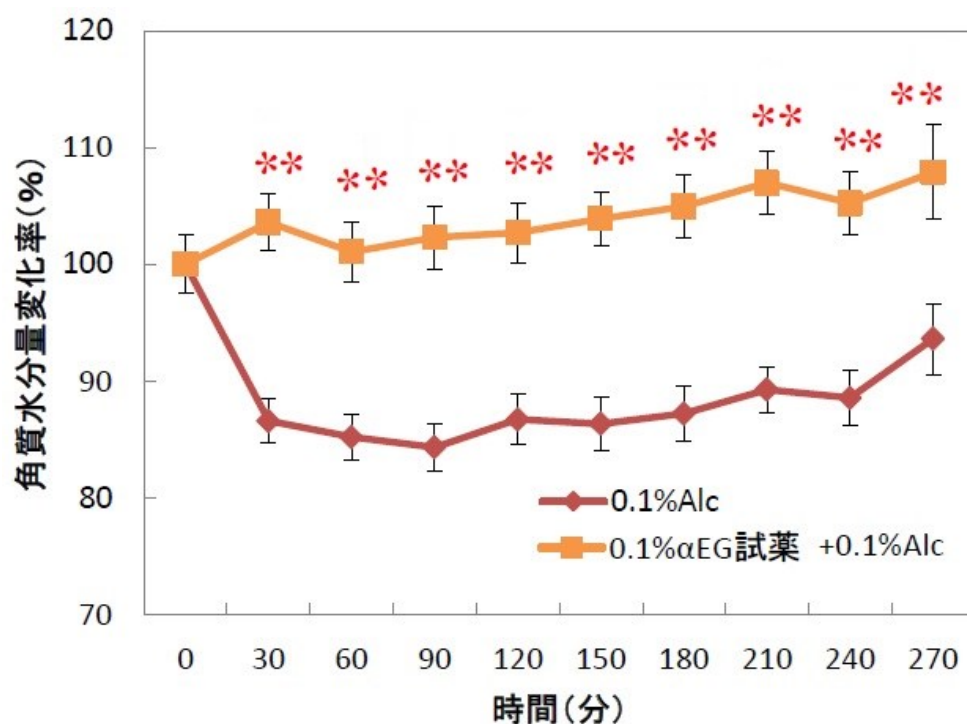


図 5-6 α-EG 濃度 0.1 v/v%における角質水分変化率の経時変化

0.1 v/v% エタノールまたは 0.1 w/v%α-EG 含有 0.1 v/v% エタノール溶液を塗布し、30 分毎に角質の水分量を測定し、試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値±標準偏差，** $p<0.01$ vs. 試料塗布前の水分量(t 検定)。

第5項 α -EG を配合したシャンプーの保湿効果

試作シャンプーと焼酎蒸留残渣抽出液を用いて調製したサンプルを用いてパッチ試験を行い保湿効果を試験した結果を図 5-7 に示した。

シャンプーに α -EG 0.01 w/v% になるように焼酎蒸留残渣抽出液を配合した条件で α -EG 無配合のシャンプーと保湿効果に有意差があった。エタノールが α -EG の保湿効果を促進した結果を考慮するとシャンプーには界面活性剤が含まれているために、 α -EG の皮膚への浸透が促進され、0.01 w/v% の低濃度で有意差が現れた可能性がある。この結果は α -EG を配合することで頭皮に対する保湿効果を高めたシャンプーを商品化する可能性を示すものであった。

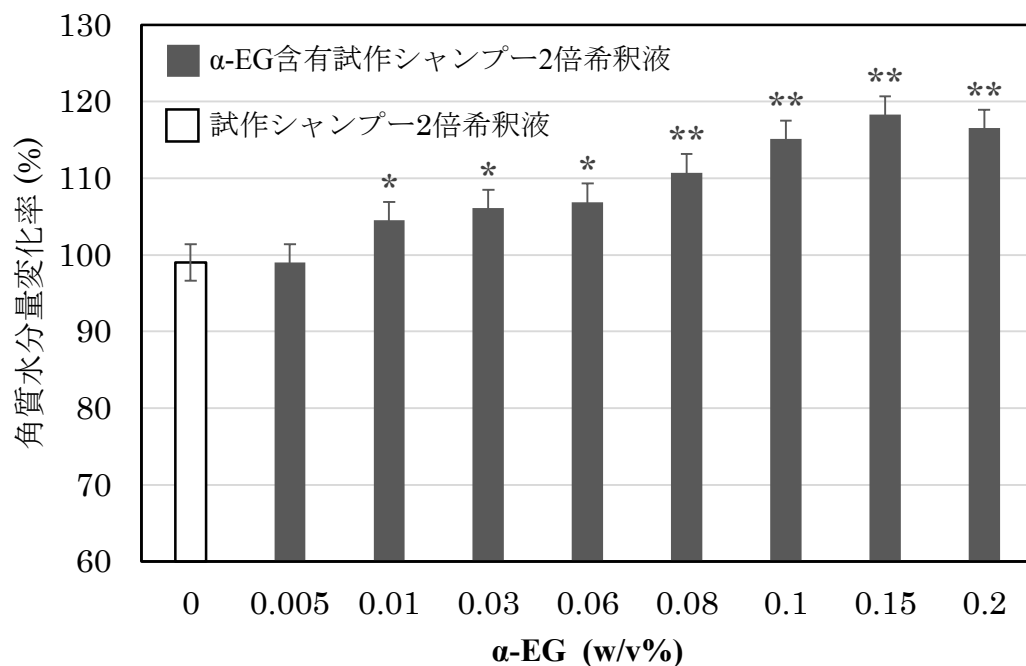


図 5-7 α -EG 含有シャンプーの保湿効果

各 α -EG 濃度になる量の焼酎蒸留残渣抽出液を含有する試作シャンプーの2倍希釈液を調製し皮膚に塗布した。対照には焼酎蒸留残渣を含まない試作シャンプーの2倍希釈液を塗布した。値は24-49の平均値±標準偏差、* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. 対照 (t検定)。

第6項 炭酸水に溶解した α -EG の保湿効果

本研究では α -EG の産業利用の拡大を目指しており，そのうちのひとつとして入浴剤への利用がある。炭酸水風呂では炭酸ガスが発生しており，保温作用や血行促進作用が期待でき，さらに，炭酸の清浄作用によって肌の老廃物を除去されることで美肌効果も期待できる^{7, 8)}。そこで， α -EG を入浴剤に利用することを目指し，炭酸水風呂に α -EG を添加することを想定して，炭酸水に α -EG を添加したサンプルを用いて肌試験を行った。炭酸水を塗布した場合と α -EG を塗布した場合の角質水分量変化率を比較した。 α -EG 濃度 0.001 w/v%，0.005 w/v%，0.01 w/v%，0.1 w/v%の α -EG 試薬+炭酸水サンプルにおける塗布 120 分後の角質水分量変化率を図 5-8 に示した。

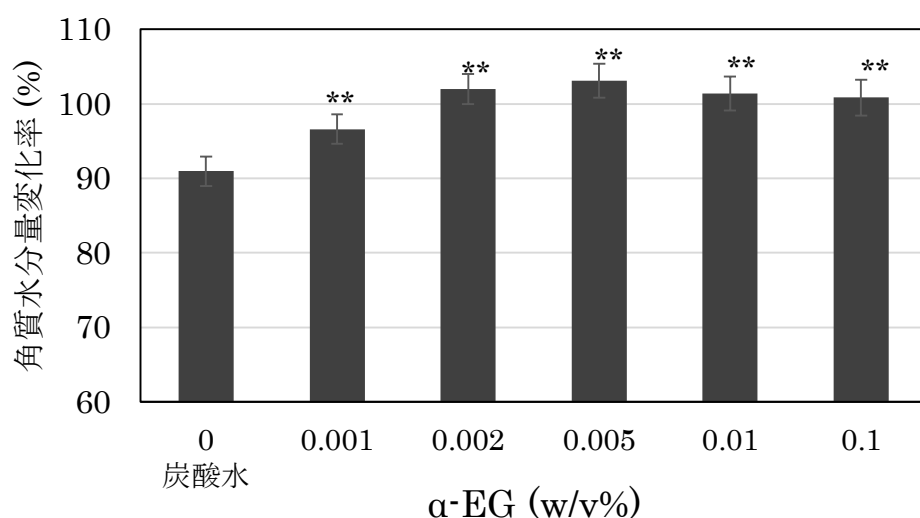


図 5-8 炭酸水に溶解した α -EG 塗布後 120 分の角質水分量変化率

炭酸水または炭酸水に溶解した各濃度の α -EG を塗布した 120 分後の角質の水分量を試料塗布前の水分量に対する相対値で示した。値は 13 人の平均値+標準偏差，** $p<0.01$ vs. 対照 (t 検定)。

α -EG 濃度 0.001 w/v% から 0.1 w/v% で 1% 水準で有意差があった。この結果から，基剤を炭酸水とした場合では， α -EG 濃度 0.001 w/v% の低濃度まで水分保持

効果が期待できると考えられる。本実験結果を第1項から第3項に示した精製水を基剤としたサンプルやエタノールを基剤としたサンプルにおける結果(図 5-1, 図 5-2, 図 5-3)と比較すると, 精製水またはエタノールを基剤とした場合よりも炭酸水を基剤とした場合の方が, 非常に低い濃度でも有意差が認められた。このことから, α -EG は炭酸水中の方が肌に浸透しやすく, 水分保持効果が現れやすいと考えられた。また, 0.001 w/v%の低濃度でも保湿効果が得られており, 本研究で開発した仕込み方法で製造した α -EG 高含有発酵物(α -EG 高含有酒, 焼酎蒸留残渣抽出液, 酒粕再発酵酒)であれば湯量 200 L の浴槽に対してコップに 1/2 杯程度添加する事で効果が期待できる。

第4節 小括

精製水，0.01 v/v% エタノールまたは 0.1 v/v%エタノールを基剤としたサンプルを比較すると（図 5-1，図 5-2 および図 5-3）0.01 v/v% および 0.1 v/v% エタノール含有サンプルを基剤とした各サンプルの角質水分量変化率の値は，精製水を基剤とした場合よりも測定した全ての時間で高い値となった。このことからエタノールは α -EG の保湿効果を促進すると考えられた。

これまで報告されている荒れ肌改善のための保湿効果のメカニズムは，「 α -EG が表皮細胞の角化を促進することで，正常な角質層が形成され，皮膚中の水分が蒸散するのを抑制する⁵⁾」というものである。しかし，本研究で検討した実験条件は最大で 270 分間の効果を検証したものであり，上述したものとは異なるメカニズムであると考えられる。水分子との親和性が高い保湿剤は，それ自体あるいは皮膚成分との相互作用による水分を保持する機能に優れ，閉塞性は低く，角層に浸透して機能する場合が多い⁹⁾。また α -EG は水溶性が極めて高い¹⁰⁾。従って， α -EG の水分保持効果の速効性は， α -EG を肌に塗布することで α -EG が皮膚（角層）に浸透し，皮膚成分と相まって水分を保持することで，皮膚中の水分が蒸散するのを抑制する機構である可能性があると考えており，今後の検討課題である（図 5-9，図 5-10）。

上述のとおり α -EG はエタノール存在下で肌に浸透しやすく，水分保持効果が現れやすいと考えられる。エタノールは浸透促進剤として化粧品などに用いられている。浸透促進剤とは，肌に塗られた薬効成分の効果発現を高めることを目的とした，薬効成分の皮膚浸透性を改善する物質，基剤のことである¹¹⁾。そのため， α -EG 試薬+エタノールサンプルではエタノールが浸透促進剤としての役割を果たし， α -EG が皮膚に浸透されやすくなったと考えられる。 α -EG が皮膚に浸透されやすくなったために精製水を基剤としたサンプルよりも，エタノールを基剤と

したサンプルの場合の方が、より強い水分保持効果が現れたと考えられる。

本章で行った肌試験においても、 α -EG濃度0.1 w/v%付近で角質水分量変化率の値が最も大きくなった。この結果から、 α -EG濃度0.1 w/v%前後が最も強く水分保持効果が現れる濃度であると考えられる。

ヒト肌への塗布において、 α -EG 単独（ α -EG 試薬）による水分保持効果は、 α -EG 濃度 0.01 w/v% 以上で現れ、その中でも特に α -EG 濃度 0.1 w/v%で強い効果が期待できる。また、これまで行われてきた肌試験の約 2 倍の時間まで肌水分量

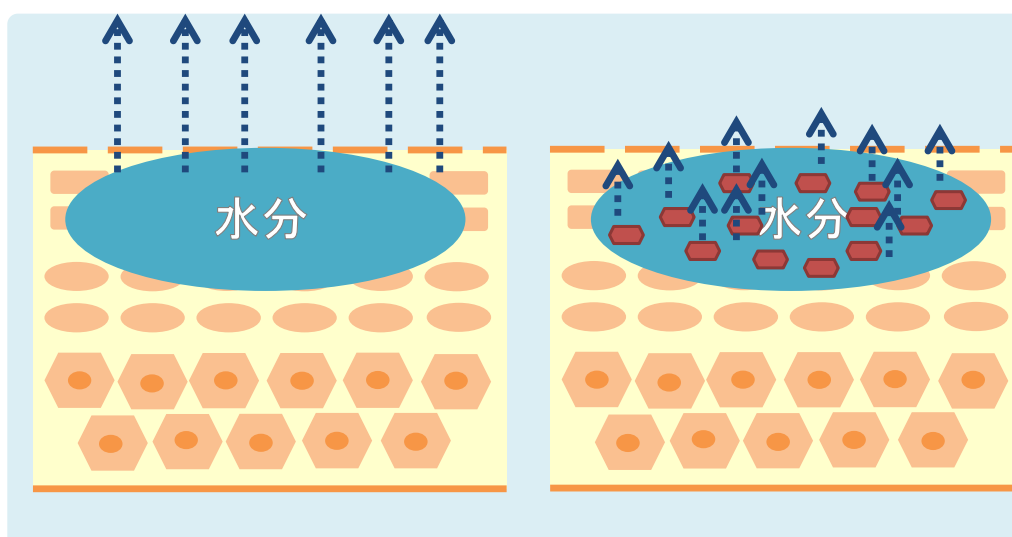


図 5-9 α -EG の水分蒸散抑制効果

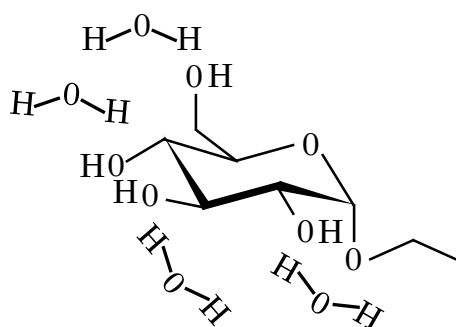


図 5-10 α -EG と水分子の水素結合

測定を行ったことにより、 α -EG の水分保持効果は長時間（270 分）持続することが示された。しかし、女性 1500 人に対するアンケートで化粧水は約 80%，乳液は約 50%が、毎日朝タ一回使用していた¹²⁾。そのため、 α -EG を化粧水や乳液に添加することを想定すると、 α -EG の水分保持効果がサンプル塗布 270 分後まで継続しても時間的に十分な長さであるとは言えない。従って、 α -EG 含有サンプルを長期間使用して水分保持効果を検証するような実践的な実験を行う必要がある。さらに、美肌効果が期待した入浴法に使用されている炭酸水^{7, 8)}を基剤とした場合、 α -EG 濃度 0.001 w/v%という非常に低い濃度まで水分保持効果が認められた。また、シャンプーに配合した試験でも保湿効果が認められ、 α -EG の用途が化粧品だけではなくサニタリー用品などに広がる可能性を示すことができた。

参考文献

1. 広常正人：日本醸造協会誌，第99巻，836-841，2004
2. 今安聰，川戸章嗣：日本醸造協会誌，第94巻，274-280，1999
3. T. Bogaki and K. Ozeki: *J. Biol. Macromol.*, **15**, 41-50, 2015
4. 坊垣隆之,相良純一,尾関健二：食品・臨床栄養, e2015, 10-16, 2015
5. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno and T. Horikoshi: *Skin Pharmacol.*, **10**, 153-159, (1997).
6. M. Hirotsune, A. Haratake, A. Komiya, J. Sugita, T. Tachihara, T. Komai, K. Hizume, K. Ozeki and T. Ikemoto: *J. Agric. Food. Chem.*, **53**, 948-952, 2005
7. 白倉卓夫, 田村耕成, 藤原敏雄, 秋山喜彦: 日温気物医誌, **59**, 230-235, 1996
8. 川崎義巳: *Chemical education*, **38**, 640-643, (1990).
9. 平尾哲二: 日本香粧品学会誌, **37**, 95-100, (2013).
10. 岡智：日本醸造協会誌，第72巻，631-635，1977
11. 化粧品事典，日本化粧品技術会編，丸善出版，2003
12. 女性の化粧行動・意識に関する実態調査～スキンケア・メイク篇 2010～基本編，ポーク文化研究所，2010

第 6 章 α -EG が線維芽細胞に与える影響

第1節 緒言

Kitamura らによって紫外線を照射したマウスを用いた荒れ肌改善効果が報告され^{1, 2)}, α -EG が清酒の化粧品としての有効成分である可能性が示された。また, 飲用でも皮膚への作用がある事が報告されている³⁾。広常らは α -EG を含有する清酒濃縮物や α -EG を含む水を飲料水として 1 週間投与したヘアレスマウスに UV-B を照射する実験で, UV-B 照射後 3 日目の経皮水分蒸散量の上昇抑制効果が見られたと報告している³⁾。マウスを用いた実験で α -EG は小腸から Na 依存型グルコーストランスポーター1 を介して小腸上皮細胞内に吸収されることが報告されている⁴⁾。また, ヒトボランティア試験で摂取後 24 時間までに約 80% が尿中に速やかに排出されることが示されている⁵⁾。これらの結果から, 小腸から吸収された後, α -EG は血液中に移行し角層まで運ばれていると考えられる。さらに経口摂取した α -EG が角層に作用するのであれば, 肌の中で最も血管が密集している場所は真皮であるため, α -EG は真皮にも作用する可能性が高いと考えられる。真皮の約 90% はコラーゲンで占められており, そのコラーゲンを生産しているのは線維芽細胞である⁶⁾。線維芽細胞は全身の結合部位に散在し, 組織が傷つくとコラーゲンを生産し, 修復を助ける働きがある⁶⁾。しかし, 年を重ねると線維芽細胞の増殖能が低下し, それに伴って生産されるコラーゲン量も減少する。コラーゲン量が減少すると表皮に凹凸が生じ, シワやタルミといった老化現象の原因となる⁷⁾。 α -EG が線維芽細胞に作用し, 線維芽細胞の増殖率やコラーゲン生産率を促進する働きを示すことができれば, 肌への老化抑制効果が期待できる。 α -EG は低分子の物質であり, 同じく糖アルコールである α -GG の肌への塗布における線維芽細胞への作用が確認されている⁸⁾ことから, α -EG も肌を透過できると考えられる。これまでの α -EG の皮膚に対する影響に関する研究は主に α -EG が角層に与える影響について報告されたものであった^{1, 2)}。そこで, 本研究では

これまで調べられていなかった真皮の結合組織を構成する細胞の一部である線維芽細胞について、 α -EG が細胞にどのような影響を与えるか検討した。

第2節 材料および方法

第1項 材料

細胞培養

- ・ 正常ヒト成人皮膚繊維芽細胞 (NHDF(AD)) : 倉敷紡績(株), 大阪府大阪市)
- ・ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose : シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京都目黒区)
- ・ Kurabo FibroLife S2 Comp Kit (倉敷紡績(株), 大阪府大阪市)
- ・ NaHCO_3 (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ ウシ胎児血清 (Fetal Bovin Serum, FBS : サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株), 神奈川県横浜市)
- ・ PBS (Phosphate Buffered Saline) Tablets (タカラバイオ(株), 滋賀県草津市)
- ・ Trypan Blue (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京都目黒区)
- ・ MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide : (株)同仁化学研究所, 熊本県上益城郡)
- ・ トリプシン-EDTA (サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株), 神奈川県横浜市)
- ・ ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ エタノール (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ I 型コラーゲン検出キット ; ヒトコラーゲン タイプ 1 ELISA (株)エーセル, 神奈川県相模原市)
- ・ α -EG 試薬 (和光純薬工業(株), 大阪府大阪市)
- ・ Reverse Osmosis 処理水 (精製水)

定量 PCR

RNAiso Plus (タカラバイオ㈱, 滋賀県草津市)

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ㈱, 滋賀県草津市)

SYBR Premix EX Taq(Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ㈱, 滋賀県草津市)

第2項 方法

DMEM の作製

DMEM の作製は以下の手順で行った。

- ① FBS を 56°C で 30 分間処理し, 非働化した。
- ② ビーカーに精製水 400 ml, DMEM 5 g, NaHCO₃ 1.83 g を加え溶解した。
- ③ メスシリンダーに移して 450 ml にメスアップした。
- ④ 転倒混和した。
- ⑤ DMEM と FBS を混和し, メディウム瓶にボトルトップフィルターを取り付けクリーンベンチ内でろ過除菌した。
- ⑥ 作製した DMEM を T-フラスコに 10 ml 移し, 1 週間インキュベートしてコンタミネーションチェックをした。

PBS(Phosphate Buffered Saline)の作製

PBS の作製は以下の手順で行った。

- ① 精製水 400 ml に PBS Tablets 5 粒を溶解し, 500 ml にメスアップした。
- ② メディウム瓶に移し, オートクレーブで滅菌 (121°C, 20 min) した。
- ③ 常温まで冷却し冷蔵保存した。

細胞の起こし方

凍結保存の線維芽細胞を DMEM 中に起こす手順を以下に示す。

- ① 恒温槽を 37°C に設定し、使用する DMEM を加温した。
- ② T-フラスコに DMEM を 5.0 ml 分注し、インキュベート (37°C, CO₂ 濃度 5%) した。
- ③ ディープフリーザーから凍結細胞を取り出し、37°C の水浴で融解した。
- ④ T-フラスコに細胞浮遊液 500 μ l を播種した。
- ⑤ 細胞を均等に分散させた後、インキュベート (37°C, CO₂ 濃度 5%) した。

細胞の継代培養

細胞の継代培養は以下の手順で行った。

- ① DMEM と PBS, トリプシンを 37°C に加温した。
- ② 古い DMEM を除去した。
- ③ PBS で 2 回洗浄した。
- ④ 10 倍希釈したトリプシンを 1.0 ml 添加し、細胞をはがした。
- ⑤ DMEM を加え、トリプシンの活性を停止した。
- ⑥ ピペッティングし、細胞懸濁液を遠心管に移した。
- ⑦ 1,200 rpm, 10 min, 15°C で遠心分離し、DMEM を除去した。
- ⑧ PBS を添加し、ピペッティングして細胞を懸濁した。
- ⑨ 1,200 rpm, 10 min, 15°C で遠心分離し、PBS を除去した。
- ⑩ DMEM を入れて懸濁し、新しい T-フラスコに播種した。
- ⑪ 細胞を均等に分散した。
- ⑫ インキュベート (37°C, CO₂ 濃度 5%) した。

MTT 溶液の作製

MTT 溶液の作製は以下の手順で行った。

- ① MTT 25 mg に 5.0 ml の PBS を加え，溶解
- ② メンブランフィルター（0.22 μ m）でろ過滅菌
- ③ 冷蔵庫で遮光保存

MTT アッセイ（細胞増殖率／生育阻害）

MTT は細胞内に取り込まれると，ミトコンドリアの脱水素酵素により，ホルマザンに変化する。生細胞ではこの酵素活性が高く，呈色が認められる。このホルマザンを DMSO で溶解し，530 nm における吸光度から細胞増殖率を算出した⁸⁾。

- ① 24 well plate に細胞を 1.0×10^4 cells/ml の濃度で播種し，24 時間インキュベート（37 °C，CO₂ 濃度 5%）した。
- ② DMEM を除去しサンプル添加した新しい DMEM を加え，48 時間インキュベート（37 °C，CO₂ 濃度 5%）した。
- ③ DMEM を除去し，新しい DMEM を加えた。
- ④ MTT 溶液を加え，3 時間インキュベートし呈色反応を行った（37 °C，CO₂ 濃度 5%）。
- ⑤ DMEM を除去し，PBS で 2 回洗浄した。
- ⑥ DMSO を添加し，沈殿したホルマザンを溶解した。
- ⑦ マイクロプレートリーダーで 530 nm の吸光度を測定した。

コラーゲンの定量

線維芽細胞が培地中に生産する I 型コラーゲンを以下の方法で定量した。

測定手順

培地中の I 型コラーゲンを定量するために、I 型コラーゲン検出キットを用いて ELISA 法でコラーゲン測定を行った。なお、標準液、試薬等の作製および方法はメーカー（株エーセル）のプロトコールに従った。

- ① NHDF 細胞（第 2 世代）を 24 穴プレートに 5.0×10^4 cells/ 1 ml medium/ well で播種し、24 時間ブレインキュベートした。
- ② 2% FBS, 2×DMEM とサンプル（終濃度の 2 倍に調整したもの）を等量混合したサンプル入り 1% FBS, 1×DMEM を作製した。
- ③ 培地を吸引除去し、②の培地を各ウェルに 0.5 ml ずつ添加した。
- ④ 72 時間インキュベートした。
- ⑤ 培地を回収し-20℃で保存した。
- ⑥ 測定用プレートに Wash buffer を 200 μ l/ウェル加え、全てのウェルを 3 回洗浄した。
- ⑦ 調製した標準液および測定試料とビオチン標識コラーゲン抗体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ添加した。
- ⑧ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて緩やかに振とうしながら室温（20～28℃）で 1 時間反応した。
- ⑨ Wash buffer を 200 μ l/ウェルで加え、全てのウェルを 3 回洗浄した。
- ⑩ HRP（西洋わさびペルオキシダーゼ）標識アビジン溶液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ添加した。
- ⑪ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて緩やかに振とうしながら室温（20～28℃）で 1 時間反応した。
- ⑫ Wash buffer で全てのウェルを 3 回洗浄した。
- ⑬ 全てのウェルに 50 μ l の TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate を添加した。

- ⑭ 室温(20～28℃)で正確に 15 分間静置した。
- ⑮ 全てのウェルに 50 μ l の Stop solution (1 N 硫酸) を添加した。
- ⑯ プレートをプレート振とう器を用いて緩やかに振とうしながら室温 (20～28℃) で 1 分間攪拌した。
- ⑰ 10 分以内に 450 nm の吸光度を測定した。

計算方法

- ① Blank, 標準液, サンプルの平均値を算出した。
- ② それぞれの平均値から Blank の値を引いた。
- ③ 標準液の OD 値とコラーゲン濃度から検量線を 4 parameter logistic model にて作製した。

$$Y = ((A - D) / (1 + (X/C)^B)) + D$$

X: サンプル中のコラーゲン濃度

Y: サンプルの吸光度(OD₄₅₀)

A: X 軸最小値の漸近線に対する Y 軸値

B: 曲線中心部の漸近線からの変化の大きさを表す値

C: A と D の中点に対応する X 軸値

D: X 軸最大値の漸近線に対する Y 軸値

- ④ サンプルの測定値を変形した回帰式に代入して得られる濃度に, 希釈倍率を掛け合わせて, 試料中のコラーゲン濃度を算出した。

$$\text{変形した回帰式: } X = C \times ((A - Y) / (Y - D))^{(1/B)}$$

総 mRNA と c DNA の調製

培養細胞から以下の手順で mRNA を調製した。

- ① 正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を 6 穴プレートに 5×10^5 cells/4 ml medium / well で播種した。
- ② 24 時間 インキュベート (37°C, CO₂ 濃度 5%) した。
- ③ 培地を吸引除去し, 各サンプル+1% FBS 含有 DMEM を 4 ml 添加した。
- ④ 48 時間インキュベート (37°C, CO₂ 濃度 5%) した。
- ⑤ 培地を吸引除去し, PBS で 2 回洗浄した。
- ⑥ 細胞を回収し, 総 mRNA を抽出(RNAiso Plus)した。
- ⑦ 総 mRNA をテンプレートとして, 逆転写(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time))を行い cDNA を調製した。

mRNA の定量 (RT-qPCR)

総 RNA から合成した cDNA をテンプレートとして PCR 法により, *FGF1*, *FGF7*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* および GAPDH (内部標準) の mRNA 発現量を測定した。RT-PCR には SYBR Premix EX Taq を用いた。使用したプライマーを表 6-1 に, 反応液組成を * グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素

表 6-2 に示した。95°C 2 min の初期変性を行った後, PCR 反応として 95°C 15 sec., 60°C 30 sec. を 1 cycle として 40 cycle 行った。それぞれの遺伝子の発現量を内部標準である GAPDH mRNA 量に対する割合として求めた。なお, ゲノムからの目的遺伝子の増殖を防ぐためにプライマーはイントロンの両外側に設計した。

表 6-1 プライマー配列⁹⁾

Gene	Protein	bp	F Primer	R Primer
<i>GAPDH</i> *	ハウスキーピング	131	GTCTCCTCTGAC TTCAACAGCG	ACCACCCTGTTG TGTAGCCAA
<i>FGF1</i>	線維芽細胞増殖因子	137	ATGGCACAGGTG GATGGGACAAG	TAAAAGCCCGTC GGTGTCCATG
<i>FGF7</i>	線維芽細胞増殖因子	108	CTGTCGAACACA GTGGTACCTG	CCAACTGCCACT GTCCTGATTTC
<i>COL1A1</i>	コラーゲン I $\alpha 1$ 鎖 ($\alpha 1(I)$)	107	AGCCTCTCCATC TTTGCCAGCA	GATTCCCTGGAC CTAAAGGTGC
<i>COL1A2</i>	コラーゲン I $\alpha 2$ 鎖 ($\alpha 2(I)$)	135	CCTGGTGCTAAA GGAGAAAGAGG	ATCACCACGACT TCCAGCAGGA
<i>COL3A1</i>	コラーゲン III $\alpha 1$ 鎖 ($\alpha 1(III)$)	108	TGGTCTGGAAGG AATGCCTGGA	TCTTCCCTGGGA CACCATCAG

* グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素

表 6-2 PCR 反応液組成

SYBR Premix EX Taq(Tli RNaseH Plus)	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ l
Rivers Primer (10 μ M)	0.8 μ l
ROX Reference Dye	0.4 μ l
Template DNA	1 μ l
dH ₂ O	7 μ l
Total	20 μ l

第3節 結果および考察

第1項 α -EG の細胞生育阻害試験

α -EG 試薬を用いた培養細胞試験に際し、 α -EG の細胞生育阻害濃度を調べた結果を図 6-1 に示した。 α -EG 濃度 2.5 w/v% で細胞の増殖が約 10% 阻害されたが、1 w/v% までは細胞の増殖に影響は無かった。マウスを用いた実験で α -EG は Na 依存型グルコーストランスポーター1 を介して小腸上皮細胞内に吸収されることが報告されており³⁾、細胞のグルコースの取り込みを拮抗阻害することで増殖を阻害している可能性がある。また、浸透圧による生育阻害の可能性も考えられる。高濃度では生育に対する影響があったが、1 w/v% から 0.01 w/v% の濃度では α -EG には顕著な細胞の生育阻害は認められなかった。

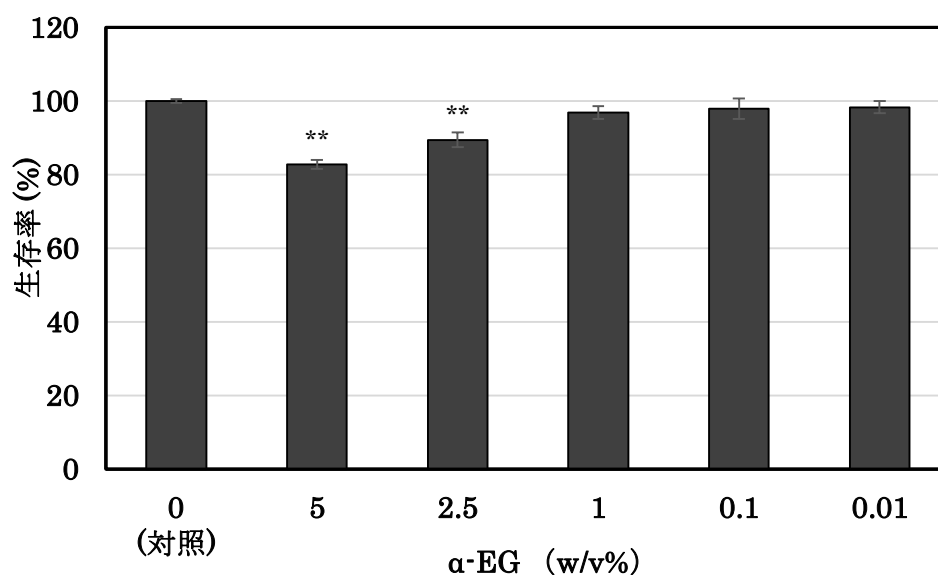


図 6-1 α -EG が細胞の生育に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で細胞を 48 時間培養し、細胞の生存率を対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $**p < 0.01$ vs. 対照 (t 検定)。値は 3 well の平均値 $\pm$ 標準偏差。

第2項 細胞増殖に与える影響

4 well plate を用いて、線維芽細胞を培養した。DMEM に α -EG 濃度が $0 - 1 \times 10^{-3}$ w/v% になるように加えて実験を行った。培養終了後、MTT 溶液を用いて 530 nm の吸光度から細胞増殖率を測定した。 α -EG 濃度 0% を対照とし、対照の細胞増殖率を 100% とした。結果を図 6-2 に示した。試験したすべての α -EG 濃度で対照に対して有意差が認められた。 α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% の場合に最大値となり約 20% 増殖が賦活化された。

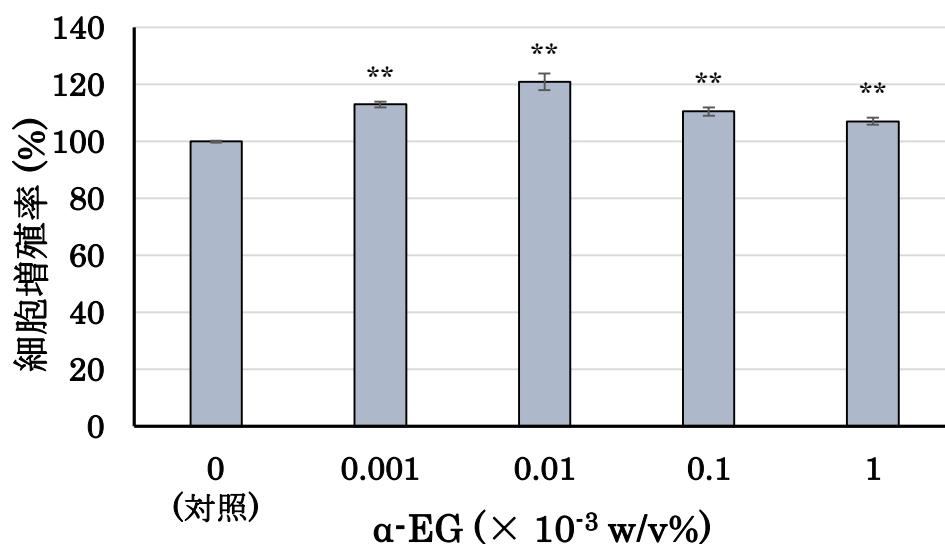


図 6-2 線維芽細胞の増殖率

各濃度の α -EG を含有する DMEM で細胞を 48 時間培養し、MTT 法により細胞数を求め、対照に対する相対値を示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $**p < 0.01$ vs. 対照 (t 検定)。値は 3 well の平均値 $\pm$ 標準偏差。

表 6-3 α -EG の%濃度とモル濃度の対応表

%	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}
μ M	0.048	0.48	4.8	48

第3項 コラーゲン生成に与える影響

細胞培養液の I 型コラーゲンの定量

24 well plate を用いて線維芽細胞を培養し、I 型コラーゲン定量キットを用いて、培地中のコラーゲン生産量を測定した。 α -EG 濃度 0%を対照とし、対照のコラーゲン生産率を基準として 100%とした。その結果を図 6-3 に示した。培地中のコラーゲンは α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% で 20%強、 1×10^{-4} w/v%では 20%弱増加した。しかし、 1×10^{-3} w/v%では約 20%減少した。 α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% および 1×10^{-4} w/v% では、細胞増殖に伴いコラーゲン量が増加したが、 α -EG 濃度 1×10^{-3} w/v% では細胞が減少していないにもかかわらずコラーゲン量が 80% になっており今後検証する必要がある。

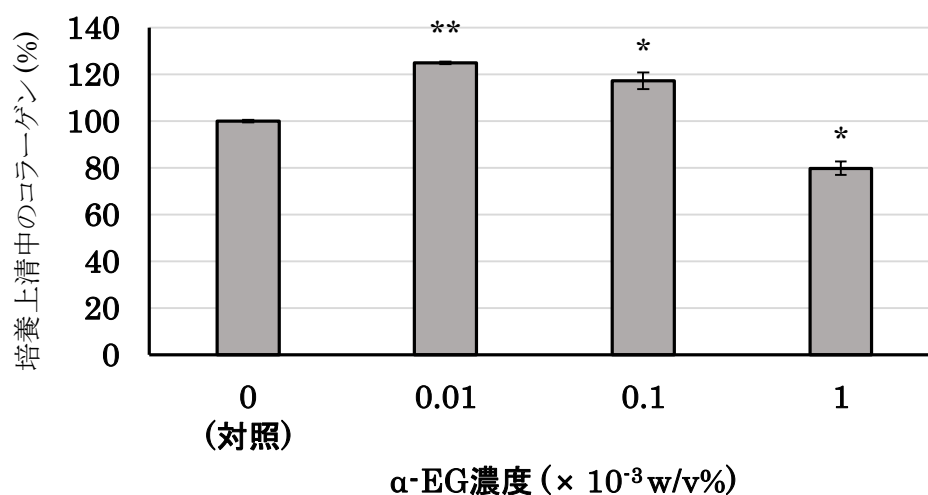


図 6-3 線維芽細胞の I 型コラーゲンの生産

各濃度の α -EG を含有する DMEM で細胞を 72 時間培養し、コラーゲンの濃度を測定し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. 対照 (t 検定), 値は 3 well の平均値 $\pm$ 標準偏差。

第4項 保湿関連遺伝子の発現に与える影響

α -EG に細胞増殖賦活化作用とコラーゲン生産亢進作用が観察された。そこでこれらの作用に関連する遺伝子の mRNA を定量することで、細胞増殖賦活やコラーゲン生産の亢進が遺伝子の発現に起因するものであるか検証した。

α -EG が線維芽細胞の増殖を賦活化したことから、線維芽細胞増殖因子である *FGF1* の発現に変化があるか検討した。また、上皮細胞の増殖に関与する *FGF7* についても検討した。

真皮の細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンの mRNA を定量した。I 型コラーゲンにおいて、mRNA から翻訳された $\alpha 1(I)$ 鎖 (*COL1A1*) と $\alpha 2(I)$ 鎖 (*COL1A2*) は、2 本の $\alpha 1(I)$ 鎖と 1 本の $\alpha 2(I)$ 鎖がより合わされて三重螺旋構造を持つプロコラーゲンになる⁶⁾。プロコラーゲンは細胞外に放出された後、両端が切断されてコラーゲン分子となり、凝集、架橋されてコラーゲン線維となる¹¹⁾。そこで、I 型コラーゲンについて *COL1A1* と *COL1A2* の mRNA を定量した。また、I 型コラーゲンの存在する組織には III 型コラーゲンも共存する場合が多い¹²⁾。そこで、胎児皮膚、血管などの結合組織に見られる III 型コラーゲンの遺伝子 *COL3A1* についても mRNA を定量した (表 6-4)。

表 6-4 多量に存在するコラーゲンの型¹³⁾

型	鎖組成	所在
I	$[\alpha 1(I)]_2, \alpha 2(I)$	皮膚, 骨, 腱, 血管, 角膜
II	$[\alpha 1(II)]_3$	軟骨, 椎間板
III	$[\alpha 1(III)]_3$	血管, 胎児皮膚

コラーゲンは 3 本のタンパク質鎖がより合わされて三重螺旋構造を持つプロコラーゲンになる⁶⁾

FGF1 は α -EG 濃度が 1×10^{-4} w/v% および 1×10^{-5} w/v% の場合に mRNA が 120% 増加しており，細胞増殖の結果と一致していた（表 6-5，図 6-4）。*FGF7* についても 1×10^{-5} w/v% の場合に対照と比較して 120% になっていた（図 6-5）。これらの結果から， α -EG が皮膚の細胞増殖に関与する遺伝子の発現を亢進している可能性が示唆された。

表 6-5 qPCR 定量データ例 (*FGF1*)

Sample		Ct		Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	RQ平均	標準偏差
		<i>FGF1</i>	<i>GAPDH</i>					
Control (D.W.)		28.68	18.05	10.63	-0.04	1.03	1.01	0.101
		28.99	18.43	10.56	-0.11	1.08		
		29.78	18.85	10.93	0.26	0.83		
		29.87	19.30	10.56	-0.11	1.08		
α -EG ($\times 10^{-3}$ w/v%)	0.001	29.07	18.73	10.34	-0.33	1.26	1.11	0.097
		29.14	18.61	10.53	-0.14	1.10		
		29.07	18.39	10.68	0.01	0.99		
		28.87	18.29	10.58	-0.09	1.07		
	0.01	28.94	18.49	10.45	-0.23	1.17	1.21	0.108
		28.93	18.55	10.38	-0.29	1.22		
		29.18	18.61	10.56	-0.11	1.08		
		28.91	18.70	10.21	-0.46	1.37		
	0.1	29.40	18.94	10.46	-0.21	1.15	1.20	0.077
		29.37	18.85	10.52	-0.15	1.11		
		29.03	18.65	10.38	-0.29	1.22		
		28.99	18.72	10.28	-0.40	1.32		
	1	28.97	18.27	10.70	0.03	0.98	1.00	0.082
		28.89	18.39	10.50	-0.17	1.12		
		29.05	18.40	10.65	-0.02	1.02		
		29.33	18.50	10.83	0.16	0.89		

Ct : PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数

Δ Ct = ターゲット遺伝子 $\div$ 内在性対照遺伝子（乗数の割り算は引き算）

$\therefore \Delta$ Ct = ターゲット遺伝子 Ct - 内在性対照遺伝子 Ct

$\Delta\Delta$ Ct = 各サンプル $\div$ キャリブレーションサンプル（乗数の割り算は引き算）

$\therefore \Delta\Delta$ Ct = 各サンプル Δ Ct - キャリブレーションサンプル Δ Ct

$RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$

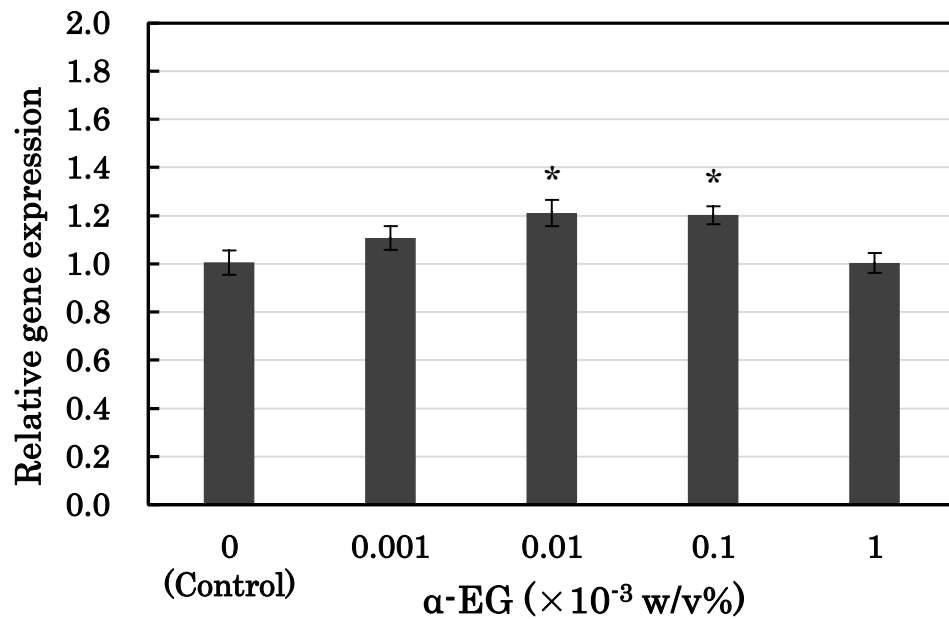


図 6-4 α -EG 濃度が *FGF1* mRNA 量に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で 48 時間培養した細胞から cDNA を調製した。qPCR によって *FGF1* の mRNA を定量し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。

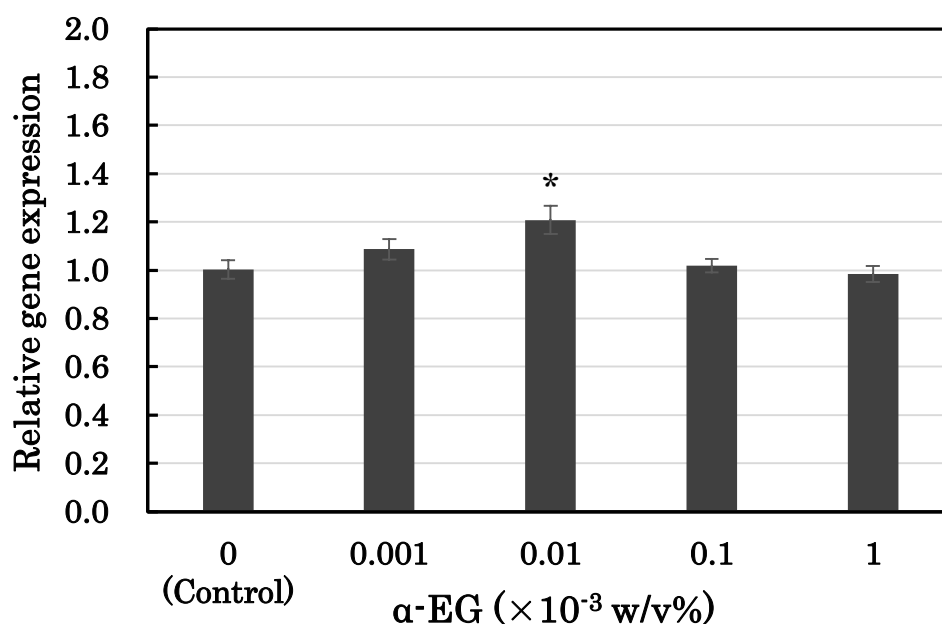


図 6-5 α -EG 濃度が *FGF7* mRNA 量に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で 48 時間培養した細胞から cDNA を調製した。qPCR によって *FGF7* の mRNA を定量し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM 培地での培養を対照とした。 $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。DMEM での培養を対照とした。 $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。

COL1A1 の mRNA 量は α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% の時対照と比較して 160%と大きく増加した (図 6-6)。また *COL1A2* についても α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% の時対照と比較して 140% に増加した (図 6-7)。*COL1A1* は 17 番染色体, *COL1A2* は 7 番染色体にコードされている^{14, 15)}。I 型コラーゲンは $\alpha 1$ (I) と $\alpha 2$ (I) 両方が無ければ形成されない⁶⁾が, 両遺伝子の mRNA 量の増加が確認できたことは, 培地に α -EG を添加したときのコラーゲンの増加に α -EG が遺伝子レベルで影響を与えている可能性を示唆するものでり, 2 つの遺伝子に共通する転写調節因子に働きかけている, もしくは両者の異なる転写調節因子に同時に影響している可能性が考えられ今後の研究課題である。*COL3A1* についても α -EG 濃

度 1×10^{-5} w/v% で約 135% に増加しており (図 6-8), α -EG が線維芽細胞の I 型コラーゲン生産に影響を与える可能性を支持する結果であった。

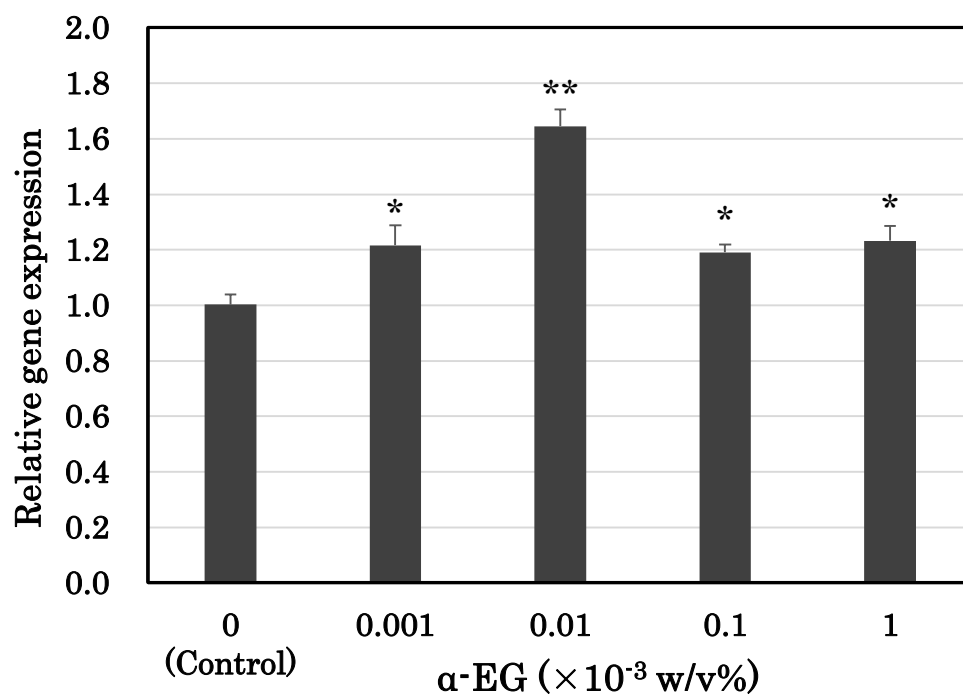


図 6-6 α -EG 濃度が *COL1A1* mRNA 量に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で 48 時間培養した細胞から cDNA を調製した。qPCR によって *COL1A1* の mRNA を定量し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。

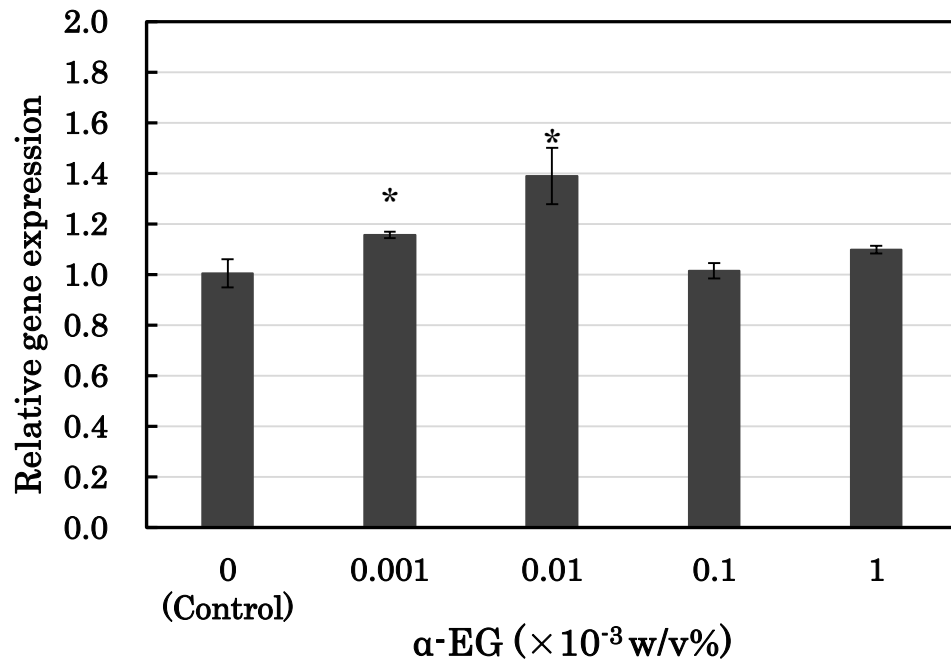


図 6-7 α -EG 濃度が *COL1A2* mRNA 量に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で 48 時間培養した細胞から cDNA を調製した。qPCR によって *COL1A2* の mRNA を定量し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。

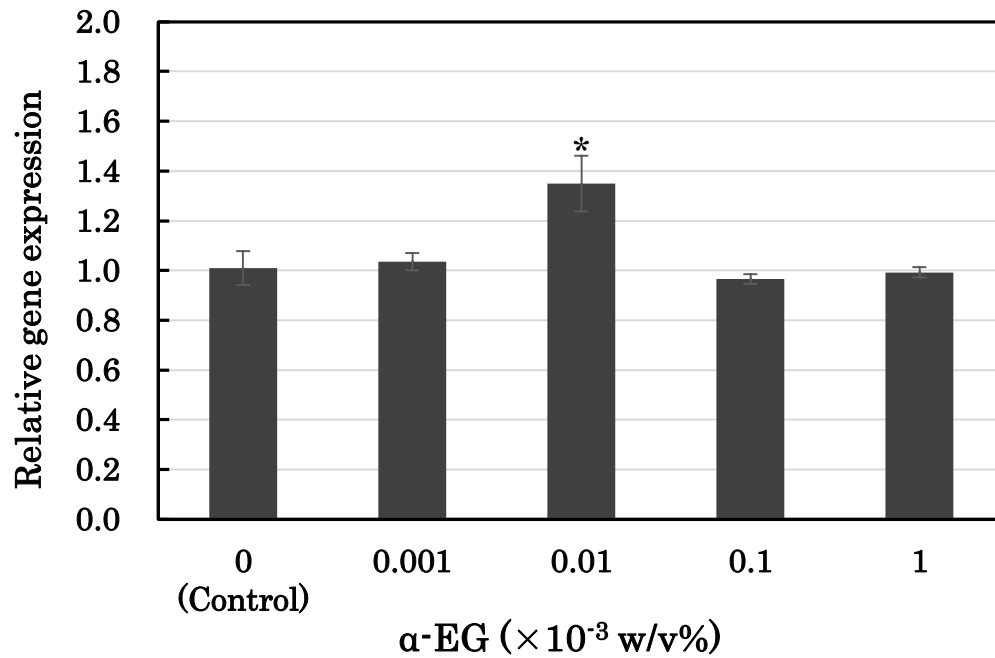


図 6-8 α -EG 濃度が *COL3A1* mRNA 量に与える影響

各濃度の α -EG を含有する DMEM で 48 時間培養した細胞から cDNA を調製した。qPCR によって *COL3A1* の mRNA を定量し、対照に対する相対値として示した。 α -EG を含まない DMEM での培養を対照とした。 $*p < 0.05$ vs. Control (t 検定), 値は 4 サンプルの平均値 $\pm$ 標準偏差。

第4節 小括

本研究で新たに真皮の線維芽細胞の増殖を賦活化し、コラーゲンが増加する効果が確認されたことから、皮膚の老化による皺や弾力の喪失の改善に対する効果が期待される。この効果は、経口摂取による内用でも効果が期待されることから、 α -EG は化粧品素材として利用できるだけでなく、肌質改善に効果のあるサプリメントの素材として利用できる可能性がある。

線維芽細胞増殖因子である *FGF1*, *FGF7* 遺伝子の mRNA の転写促進作用が確認され、細胞の増殖作用が遺伝子レベルで裏付けられた。コラーゲンについても I 型コラーゲンの構成タンパク質である *COL1A1*, *COL1A2* 遺伝子の転写が促進されていることが確認され、培養細胞でのコラーゲン生産量の増加を遺伝子レベルでも確認する事ができた。

非常に低濃度でこれらの効果が得られることから、これまでの研究で得られている飲用や皮膚へ塗布した場合の効果^{1,2,3)}が、線維芽細胞の増殖やコラーゲン生産量の増加によって生み出された効果である可能性があり今後明らかにしたい。一方、図 6-2-8 において、 α -EG 濃度 1×10^{-5} w/v% (0.48 μ M) で最も効果が高くなっている原因について今後明らかにする必要がある。 α -EG 濃度が 1×10^{-5} w/v% よりも高くなると遺伝子発現量 (図 6-3-8) が低下する原因として、細胞の増殖賦活 (図 6-2) と関連している可能性が考えられる。 α -EG は 1 w/v% まで細胞の増殖を阻害しないが細胞に対して抑制的な影響を与えており、 1×10^{-5} w/v% ではその抑制力よりも賦活化の影響が強くなる。さらに 10 倍希釈すると濃度が薄くなり過ぎるため賦活作用が弱くなるのではないかと考えられる。しかし、 α -EG が細胞に対してどのような抑制的な効果を持つのか不明であり今後検討が必要な課題である。今後の実験として α -EG の細胞内への取り込みに関与するトランスポーターや細胞内の情報伝達に係わる遺伝子の網羅的発現解析などが考えられ

る。

FGF ファミリーは 1-23 まで計 23 種類が同定されているがヒトでは FGF-15 が欠損している¹⁶⁾。FGF ファミリーは、さらに 7 つのサブファミリーに分類され、FGF-1 サブファミリーには FGF-1 と FGF-2 が含まれ、FGF-7 は FGF-3, FGF-10, FGF-22 と共に FGF-7 ファミリーに分類されている¹⁷⁾。FGF-1, FGF-2 および FGF-7 は創傷治癒を促進させることが知られている^{18, 19)}。FGF7 は表皮細胞の増殖を促進して再上皮化に関与する¹⁹⁾事が知られている。従って UV-B 照射によって引き起こされた皮膚バリア損傷の α -EG による回復¹⁾に *FGF-7* の発現が関与している可能性がある。また、創傷治癒過程で FGF-1²⁰⁾は線維芽細胞の増殖を促進して肉芽組織の形成に関与する¹⁹⁾。本章において線維芽細胞の増殖と *FGF-1* mRNA の発現の亢進が確認されたことから α -EG は線維芽細胞の増殖に影響を与えている事が示唆された。

マウスの *COL1A2* の一番目のイントロンにはエンハンサーエレメントがあり、このエンハンサーは *COL1A2* のプロモーターを活性化する²¹⁾。マウスの *COL1A1* の一番目のイントロンに白血病レトロウイルスの遺伝子を挿入すると遺伝子の転写活性が抑制され、相同な両遺伝子への挿入は致死となる²²⁾。ヒトでも *COL1A1* の一番目のイントロンにエンハンサーエレメントが存在する²³⁾。*COL1A1*, *COL1A2* および *COL3A1* の一番目のエキソンの翻訳開始点から 50 bp の位置に、ニワトリからヒトまで高度に保存された逆向き反転配列が存在している^{24, 25)}。この配列はⅡ型コラーゲンには無く、全てのコラーゲンに保存されている訳ではない。しかし、異なる種で保存されていること、転写開始点の近傍にあることから、転写の調節に関与している可能性がある²⁴⁾と考えられていた。しかし、関与するとする報告²⁶⁾と関与しないとする報告がある²⁷⁾。マウスの *COL1A2* の-84--80 に位置する CCAAT モチーフと *COL1A1* の-96--100 に位置する CCAAT モチーフに

は CCAAT 結合蛋白質に分類される同一のヘテロダイマーが結合する。*COL1A1*, *COL1A2* の CCAAT モチーフの変異は両プロモーターのプロモーター活性を著しく阻害する²⁷⁾。ベータ型変異増殖因子 (TGF- β), インターロイキン I (IL-1), 腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) などのサイトカインが細胞表面の特異的なレセプターに結合することで *COL1A1*, *COL1A2* の発現に影響する²⁹⁻³²⁾。TGF- β によって誘導される NF- κ B は *COL1A2* プロモーターの CCAA モチーフに結合し, 活性化する³³⁾。さらに, TGF- β は *COL1A1* の mRNA の安定性を増すことで I 型コラーゲン遺伝子の発現量を増加させている^{34, 35)}。肺の線維芽細胞において, インターロイキン IV (IL-4) によって発現誘導される転写活性化因子 STAT6 が *COL1A1*, *COL1A2* のプロモーターに結合し活性化する³⁶⁾。このように, I 型コラーゲンおよび III 型コラーゲンの発現制御には, プロモーター, エキソン, インtron に存在する種々のモチーフ配列とそれに結合する DNA 因子, さらにその DNA 結合因子の発現を制御するサイトカンインなどが存在している。 α -EG によって誘導される I 型コラーゲンおよび III 型コラーゲンの遺伝子発現がどのようなメカニズムによるものか解明する事が今後の課題である。

本研究では NHDF を α -EG を含有する培地で 48 時間培養した後, mRNA を調整した。しかし, マウスを用いた実験では経口投与され腸管から吸収された α -EG は 6 時間後には 80% が速やかに排出されたとする報告がある³⁷⁾。従って, 本研究における 48 時間の処理時間は実用化を想定すると長すぎる可能性がある。そこで NHDF と α -EG との接触時間を数時間に制限した細胞から mRNA を調製し, 発現解析を行い短時間の接触で本研究で観察された効果が得られるか検証する必要がある。また, 本研究で効果が確認された濃度は 0.48uM と非常に低い濃度であったことから, 経口投与された α -EG の体内動態をより詳細に検討する必要がある。

線維芽細胞の増殖賦活化，それに伴う I 型コラーゲンの増加，各遺伝子発現の亢進が認められた成果は，応用面で既に進められている外用における洗顔石鹸，シャンプー，入浴剤やスキンケア製品などサニタリー用品への展開（http://www.kanazawa-it.ac.jp/kitnews/2015/20150701_ozeki.html）を更に推進する成果である。

参考文献

1. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno, T. Horikoshi : *Skin Pharmacol.*, **10**, 153-159, 1997
2. T. Horikoshi, A. Haratake, T. Ikemoto, Y. Ohta, O. Tanno, N. Kitamura : *J. Soc. Cosmet. Jpn.* 1998; **32**, 10-16. (in Japanese)
3. M. Hirotsune, A. Haratake, A. Komiya, J. Sugita, T. Tachihara, T. Konami, K. Hizume, K. Ozeki, T. Ikemoto : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 948-952, 2005
4. T. Mishima, K. Tanaka, H. Tsuge, J. Nakahara, T. Hayakawa : *J. Agric. Food chem.*, **53**, 7257-7261, 2005
5. F. Takenaka, H. Uchiyama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1458-1463, 2001.
6. 富永直樹 : 繊維学会誌, **42**, 237-242, 1986
7. 藤木大三郎, 日本皮膚科学会雑誌, **89**, 51-59, 1979
8. N. Harada et al., : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 759-765, 2010
9. T. Mosmann, *J Immunol Methods*, **65**, 55-63, 1983
10. W. Cui, D. D. Taub, K. Gardner: *Nucleic Acids Res.*, **35**, 805-809, 2007
11. D. J. Prockop, K. I. Kivirikko, L. Tuderman, N. A. Guzman : *New Engl. J. Med.*, **301**, 16, 1979
12. 深井和吉, 石井正光, 小林裕美, 茶之木美也子, 濱田稔夫, 村垣泰光, 大島章 : 西日本皮膚科, **48**, 915-919, 1986
13. D. R. Eyre : *Science*, **207**, 1316, 1980
14. *COL1A1* gene - Genetics Home Reference:
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL1A1>

15. *COL1A2* gene - Genetics Home Reference:
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL1A2>
16. DM. Orniz, N. Itoh: *Genome Biol.*, **2**, REVIEWS3005, 2001
17. X. Zhang, OA. Ibrahimi, SK. Olsen, H. Umemori, M. Mohammadi, DM. Ornitz: *J. Biol. Chem.*, **281**, 15694-15700, 2006
18. W. Wang, S. Lin, Y. Xiao, Y. Huang, Y. Tan, L. Cai, X. Li: *Life Sci.*, **82**, 190-204, 2007
19. S. Werner, H. Smola, X. Liao, MT. Longaker, T. Krieg PH. Hofschneider, LT. Williams: *Science*, **266**, 819-822, 1994
20. RE. Friczel, T. Maciag: *FASEB J.*, **7**, 919-925, 1995
21. P. Rossi, B. Crombrughe: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5590-5594, 1987
22. R. Jaenisch, K. Harbers, M. Breindl: *Cell*, **32**, 209-216, 1983
23. C. M. S. Rossouw, W. P. Vergeer, S. J. duPlooy, M. P. Bernard, F. Ramirez: *J. Biol. Chem.*, **262**, 15151-15157, 1987
24. Y. Yamada, M. Mudryj, B. Crombrughe: *J. Biol. Chem.*, **258**, 14914-14919, 1983
25. B. de Chrombrughe, A. Schmidt, A. Liau, G. C. Setoyama, M. Mudryj: *Ann. NY Acad. Sci.*, **460**, 154-162, 1985
26. P. Bomstein, J. McKay, S. Devarayalu, S. C. Cook: *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9721-9736, 1988
27. E. Vuorio, B. de Crombrughe: *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 837-872, 1990
28. R. Ignotz, J. A. Massague: *J. Biol. Chem.*, **261**, 4337-4345, 1986

29. A. B. Roberts, M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, L. M. Roche:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4167-4171, 1986
30. J. Varga, S. A. Jimenez: *Biochem. Biophys. Res.*, **138**, 974-980, 1986
31. M. B. Goldring, S. M. Krane: *J. Biol. Chem.*, **262**, 16724-16729, 1987
32. J. A. Soliz-Herruzo, D. A. Brenner, M. Chojkier: *J. Biol. Chem.*, **263**,
5841-5845, 1988
33. J. Oikarinen, A. Hatamochi, B. deCrombrughe: *J. Biol. Chem.*, **262**,
11064-11070, 1987
34. R. P. Penttinen, S. Kobayashi, P. Bornstein: *Proc. Natl. Acad. USA*, **85**,
1105-1108, 1988
35. R. Raghow, A. E. Postlethwaite, J. Keski-Oja, H. L. Moses, A. H. Kang:
J. Clin. Invest., **79**, 1285-1288, 1987
36. C. Buttner, A. Skupin, E. P. Rieber: *J. Cell. Physiol.*, **198**, 248-258, 2004
37. T. Mishima, S. Harino, J. Sugita, M. Nakahara, T. Suzuki, T. Hayakawa,
Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 393-397(2008)

第 7 章 総括

清酒に含有されているエチル α -D-グルコシド(α -EG)は、清酒の風味に影響を与えるだけではなく、荒れ肌改善効果^{1, 2, 3)}、肝障害抑制効果^{4, 5)}等多くの機能性を持つ化合物である。この機能性に着目した化粧品が市販されており、その用途はさらに拡大する可能性がある。しかし、清酒中に α -EG は通常 1 w/v% 未満しか含有されていない^{6, 7)}ため高価であり、コストの低減に課題があった。また、これまでの α -EG が持つ機能性についての研究では、遺伝子レベルで α -EG の効果を検証した例は無かった。そこで醸造副産物を利用して α -EG を含有する素材を発酵法で生産する技術開発を行った（第2章，第3章，第4章）。さらに製造した α -EG 含有素材，酒粕再発酵酒および焼酎蒸留残渣抽出液の機能性を評価した（第5章）。さらに α -EG 試薬を用いて細胞レベルおよび遺伝子レベルでの機能性を評価した（第6章）。

第2章では、実用麹菌6株を用いた小仕込みを行い、*A. awamori* KBN2012 を選択した。次に酵母の観点から α -EG 生産に適した酵母の検討を行い、エタノールの発酵能が良く α -EG 高生産に適した焼酎酵母 *S. cerevisiae* NBRC2373 を選択した。麹歩合を下げ α -グルコシダーゼ剤と α -アミラーゼ剤の添加量を検討することで、 α -EG 生産量が著しく上昇し、 α -EG を 3 w/v%含有する α -EG 高含有酒の醸造法を確立した。

第3章では、焼酎麹，焼酎酵母を用いて焼酎仕込みでの α -EG 高含有焼酎の開発を行った。米と麦を原料に仕込みを行い，麴米の使用量と酵素剤の添加量を検討した結果， α -EG 濃度 2.0 w/v%の高含有仕込みを開発した。 α -EG 高含有焼酎もろみから調製した焼酎の官能評価では，通常サンプルと α -EG 高含有サンプルにおいて米・麦ともに差は認められず，開発した仕込み方法で製造した焼酎は市販可能な品質であった。

第4章では、醸造副産物であり安価な原料である酒粕および白ヌカを原料として α -EG を高含有する酒粕再発酵酒を製造する醸造方法を開発した。本醸造酒粕と白ヌカ糖化液を原料として、 α -グルコシダーゼ剤をもろみに添加し醸造した場合、 α -EG 濃度 2.4 w/v% となり、一般的な市販酒の 2 倍以上の α -EG 濃度であった。製造した酒粕再発酵酒を希釈し皮膚に塗布してその保湿効果を検討した結果、 α -EG 濃度 0.16 w/v%、エタノール 0.9 v/v% のとき、同濃度のエタノールを塗布した対照と比較して角層の水分量が約 20% 増加した。また、同濃度の試薬の α -EG を塗布した場合と比較して有意に水分量が増加しており、酒粕再発酵酒に含まれるアミノ酸などの天然保湿成分の相加的な影響が考えられた。

第2章、第3章および第4章の結果から、酒粕再発酵酒は清酒、発酵法 (*S.pombe*) と比較してそれぞれ約 7 分の 2、約 2 分の 1 の原料コストであった。焼酎蒸留残渣抽出液は清酒、発酵法 (*S.pombe*) と比較してそれぞれ約 20 分の 1、約 11 分の 1 の原料コストであった。

第5章では、異なる基剤に溶解した α -EG の保湿効果を検討した。精製水、0.01 v/v% エタノールおよび 0.1 v/v% エタノールを基剤としたサンプルの試験結果から、 α -EG はエタノール存在下の方が、効果がより強く現れると考えられた。ヒト肌への塗布において、 α -EG 試薬による水分保持効果は、 α -EG 濃度 0.01 w/v% 以上で現れ、その中でも特に α -EG 濃度 0.1 w/v% で強い効果が期待できる。また、 α -EG の水分保持効果は 270 分持続することが示された。炭酸水を基剤とした場合、 α -EG 濃度 0.001 w/v% という非常に低い濃度まで水分保持効果が認められた。また、シャンプーに配合した試験でも保湿効果が認められ、 α -EG の用途が化粧品だけではなくサニタリー用品などに広がる可能性を示すことができた。

第6章では、 α -EG が線維芽細胞に及ぼす影響について検討した。本研究で新たに真皮の線維芽細胞の増殖を賦活化し、コラーゲンが増加する効果が確認され

た。コラーゲンの増加は繊維芽細胞の増加の結果であると考えられた。線維芽細胞増殖因子である *FGF-1*, *FGF-7* 遺伝子^{8,9)} の mRNA の転写促進作用が確認され、細胞の増殖作用が遺伝子レベルでも示唆された。コラーゲンについても I 型コラーゲンの構成タンパク質である $\alpha 1(I)$ および $\alpha 2(I)$ ¹⁰⁾ をコードする *COL1A1* および *COL1A2* 両遺伝子の転写が促進されていることが確認され、培養細胞でのコラーゲン生産量の増加を遺伝子レベルでも確認する事ができた。

今後の展開として、実験室レベルで確立した発酵生産法を、実製造レベルでの醸造試験で検証する必要がある。また、本研究で認めた α -EG の効果は、非常に低濃度で観察されることから、これまでの研究で得られている飲用や皮膚へ塗布した場合の効果が、線維芽細胞の増殖やコラーゲン生産量の増加によって生み出された効果である可能性があり（図 7-1）、皮膚 3 次元モデルを用いた試験やヒト肌試験でコラーゲンが増殖するか明らかにしたい。これらの効果は、経口摂取による内用でも効果が期待されることから、 α -EG は化粧品素材として利用できるだけでなく、肌質改善に効果のあるサプリメントの素材として利用できる可能性があり、今後検証し商品化に繋げたい。また、*FGF1*, *FGF7*, *COL1A1*, *COL1A2* および *COL3A1* 各遺伝子に対する α -EG の発現制御機構も明らかにしたい（図 7-2）。

応用面では線維芽細胞増殖賦活化作用が認められたことから、長年の飲用経験がある安全¹¹⁾・安心な線維芽細胞増殖作用を持つ天然物として創傷治療や再生医療への応用についても検討したいと考えている。

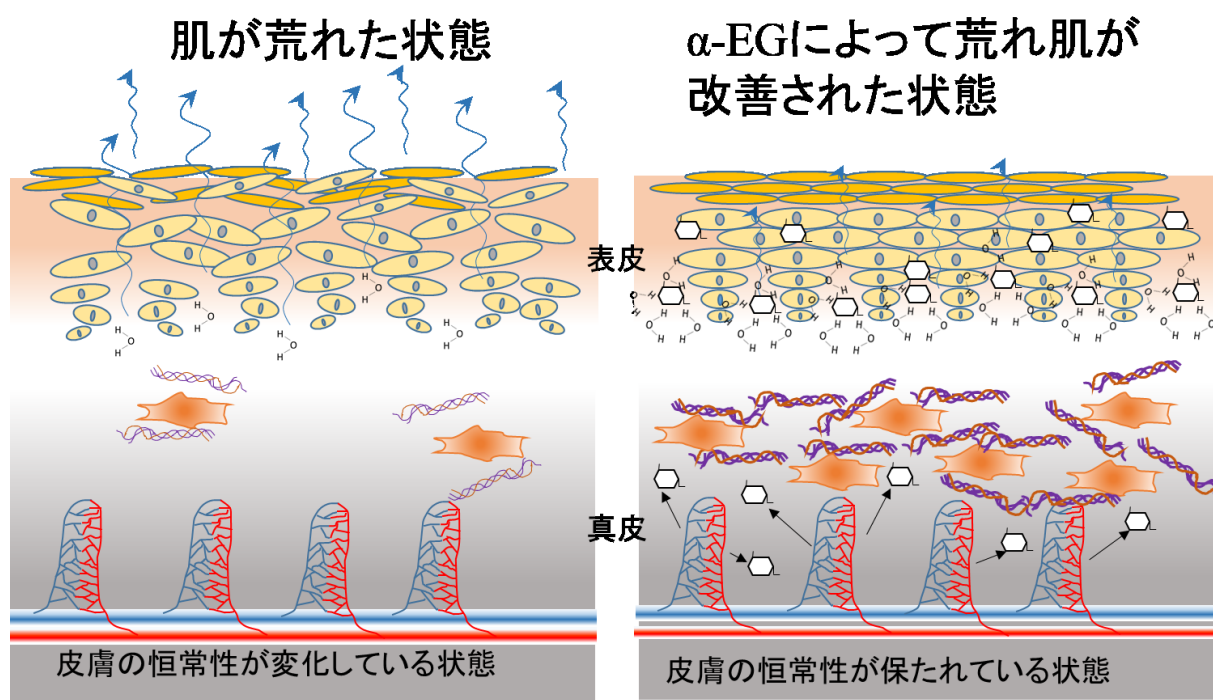


図 7-1 期待される皮膚への効果

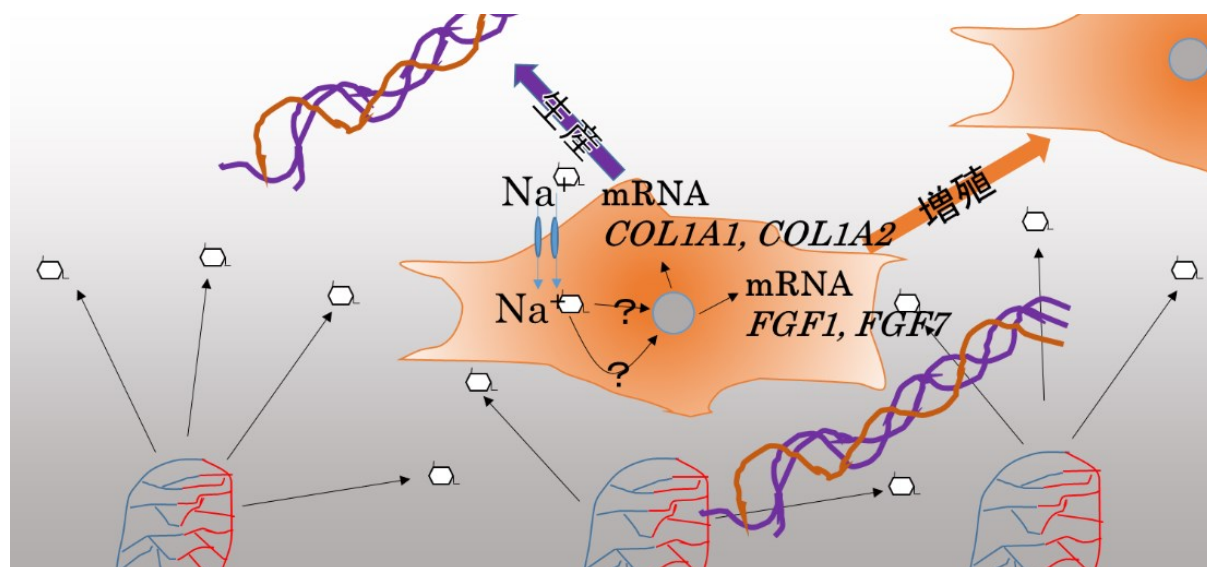


図 7-2 細胞レベルでの今後の課題

参考文献

1. N. Kitamura, Y. Ota, A. Haratake, T. Ikemoto, O. Tanno, T. Horikoshi :
Skin Pharmacol., **10**, 153-159, 1997
2. 堀越俊雄, 原武昭憲, 池本毅, 大田裕紀子, 丹野修, 北村伸夫 : 日本化粧品
技術者会誌, **32**, 10-16, 1998
3. M. Hirotsune, A. Haratake, A. Komiya, J. Sugita, T. Tachihara, T.
Komai, K. Hizume, K. Ozeki and T. Ikemoto: *J. Agric. Food. Chem.*,
53, 948-952, 2005
4. H. Izu, K. Hizume, K. Goto, M. Hirotsune : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,
71, 951-957, 2007
5. 伊豆英恵, 樋詰和久, 後藤邦康, 広常正人 : 日本醸造協会誌, 第 103 卷,
646-652, 2008
6. 岡智 : 日本醸造協会誌, 第 72 卷, 631-635, 1977
7. 佐藤信, 大場俊輝, 小林健 : 日本醸造協会誌 : 第 77 卷, 393-397, 1982
8. DM. Orniz, N. Itoh: *Genome Biol.*, **2**. REVIEWS3005, 2001
9. X. Zhang, OA. Ibrahimi, SK. Olsen, H. Umemori, M. Mohammadi, DM.
Ornitz: *J. Biol. Chem.*, **281**, 15694-15700, 2006
10. D. R. Eyre : *Science*, **207**, 1316, 1980
11. 芳川憲司, 池田潔昭, 谷川弘晃, 山本一也, 宮本博文, 岡田茂孝 : 日本食
品工業科学会誌, 第 41 卷, 878-885, 1994

査読付発表論文

1. α -エチル-D-グルコシド高含有清酒の製造法の開発とその保湿効果, 坊垣 隆之, 相良 純一, 尾関 健二, 食品・臨床栄養, e2015_10-16, 2015
2. High-yield production of ethyl α -D-glucoside in shochu brewing and evaluation of its functionality., Takayuki Bogaki, Kenji Ozeki, *J. Biol. Macromol.*, **15**(1), 41-50 (2015)
3. 保湿機能を有するエチル α -D-グルコシド高含有酒粕再発酵酒の製造, 坊垣 隆之, 尾関 健二, 日本生物工学会誌, 第 94 巻, 第 10 号, 594-600, 2016
4. 原料米の違いが発酵法によるエチル- α -D-グルコシドの生成効率に与える影響, 坊垣 隆之, 相良 純一, 尾関 健二, 食品・臨床栄養 (e2016_13-20, 2016)
5. Studies on the development of ethyl- α -D-glucoside production by fermentation, and its new moisturizing function and effects on fibroblasts, Takayuki Bogaki, Keiichi Mitani, Yuki Oura, Kenji Ozeki (査読中)

学会発表

1. 宮西史則，佐藤敦，若林美芳，打越仁子，坊垣隆之，尾関健二，大箸信一
酒粕再発酵によるエチル- α -D-グルコシド高含有酒の開発
(2014 年度第 66 回日本生物工学会大会)
2. 坊垣隆之，宮西史則，佐藤敦，打越仁子，若林美芳，園部政和，尾関健二
 α -エチルグルコシドの保湿効果に關与する新規機能性
(2015 年度日本農芸化学会大会)
3. 坊垣隆之，尾関健二
 α -エチルグルコシドの新規保湿機能
(2015 年度日本香粧品学会第 40 回香粧品学会大会)
4. 坊垣隆之，中田有紀，丸山貴弘，尾関健二
エチル- α -D-グルコシドの保湿効果
(2015 年度第 67 回日本生物工学会大会)
5. 坊垣隆之，中川賢哉，澤飯大夢，尾関健二
原料米の違いによるエチル- α -グルコシド (α -EG) の発酵製造効率の検討
(2016 年度日本農芸化学会大会)

その他の業績

査読付論文

1. 麹菌によるタンパク質大量生産システムの開発, 幸田 明生, 坪井 宏和, 峰 時 俊貴, 坊垣 隆之, 蛋白質科学会アーカイブ, 9, e084 (2016)
2. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B., Adachi D, Hama S, Nakashima K, Bogaki T, Ogino C, Kondo A., Bioresour Technol., 2013 May;135:410-6.
3. Highly efficient biodiesel production by a whole-cell biocatalyst employing a system with high lipase expression in *Aspergillus oryzae*., Takaya T, Koda R, Adachi D, Nakashima K, Wada J, Bogaki T, Ogino C, Kondo A., Appl Microbiol Biotechnol. 2011 May;90(3):1171-7.
4. High expression of a synthetic gene encoding potato alpha-glucan phosphorylase in *Aspergillus niger*., Koda A, Bogaki T, Minetoki T, Hirotsune M., J Biosci Bioeng., 2005 Nov;100(5):531-7.
5. 5' Untranslated region of the Hsp12 gene contributes to efficient translation in *Aspergillus oryzae*., Koda A, Bogaki T, Minetoki T, Hirotsune M., Appl Microbiol Biotechnol. 2006 Apr;70(3):333-6.
6. Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene

(ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7., Nagasawa N, Bogaki T, Iwamatsu A, Hamachi M, Kumagai C., Biosci Biotechnol Biochem., 1998 Oct;62(10):1852-7.

7. Nucleotide sequences of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*., Fujii T, Yoshimoto H, Nagasawa N, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M., Yeast. 1996 May;12(6):593-8.
8. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene., Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M., Appl Environ Microbiol. 1994 Aug;60(8):2786-92.
9. The purification, properties and internal peptide sequences of alcohol acetyltransferase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7., Minetoki T, Bogaki T, Iwamatsu A, Fujii T, Hamachi M., Biosci Biotechnol Biochem., 1993 Dec;57(12):2094-8.

共著書

1. 発酵・醸造食品の最前線，シーエムシー出版，206-217，2015
2. 改訂版分子麹菌学，日本醸造協会，80-90，2012
3. 発酵・醸造食品の最新技術と機能性 II，シーエムシー出版，257-265，2011

受賞歴

平成 2 5 年 7 月 糸状菌遺伝子研究会技術賞

謝辞

本研究の遂行，本論文の作成にあたり，終始ご指導と御高配を賜りました金沢工業大学教授 尾関健二博士，本論文を作成するにあたり副査として御指導頂いた金沢工業大学教授 大箸信一博士，小田忍博士，袴田佳宏博士，金沢大学准教授 坂本敏夫博士，専攻主任として御指導頂いた金沢工業大学教授 露本伊佐男博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行において，御理解と御高配を賜りました大関株式会社 長部文治郎監査役，西川良定代表取締役社長，長部訓子専務取締役，矢野善嗣常務取締役に謹んでお礼申し上げます。大関株式会社より試料を提供頂いたことを併せてお礼申し上げます。

更にご助言，ご協力を頂きました金沢工業大学講師 相良純一博士，本研究を支援して頂いた金沢工業大学大学院工学研究科バイオ・化学専攻 綱達也氏，宮西史則氏および金沢工業大学バイオ・化学部応用バイオ学科 関澤今日子氏，打越仁子氏，佐藤敦氏，園部政和氏，若林美芳氏，中田有紀氏，山本ゆかり氏，大関株式会社総合研究所 三谷恵一氏，大浦友紀氏に深く感謝致します。また，大関株式会社総合研究所の方々にご助言を頂きましたことに感謝致します。ボランティアとしてヒト肌保湿試験に参加頂いた金沢工業大学バイオ・化学部応用バイオ学科尾関研究室の皆様に感謝致します。

最後に本研究遂行の間，また本論文作成の間，常に支えとなってくれた家族に心から感謝致します。