

(2) 中課題名「微生物機能を活用したバイオマテリアル開発」

小課題名「*Rhodotorula* 属酵母が菌体外に産出するマンナンの利用技術開発」

【研究者名】

河東田茂義（山形大学農学部）

森井直也・滝田 潤（(財)山形県企業振興公社：日東ベスト株式会社からの派遣）

研究の背景とねらい

新規構造の酵母産生マンナン等を取得し、機能性を利用した食品開発や医療素材の開発を行う。

共同研究の体制と役割分担

（フェーズ 段階：平成 10 年 9 月～平成 13 年 3 月）

この期間は、滝田潤（日東ベスト株式会社派遣研究員）と河東田茂義（山形大学農学部）の 2 人体制で、山形大学農学部において研究を実行した。

役割分担は以下の通りであるが、双方の協力のもとに遂行された。

滝田：*Rhodotorula* 属酵母が菌体外に産出するマンナンの利用技術の開発

河東田：菌体外マンナン生産菌の検索と大量培養系の確立

（フェーズ 段階：平成 13 年 4 月～平成 15 年 9 月）

この期間は、滝田潤・森井直也（日東ベスト株式会社派遣研究員）と河東田茂義（山形大学農学部）の 3 人体制で、山形大学農学部において研究を実行した。

役割分担は以下の通りであるが、双方の協力のもとに遂行されると共に、日東ベスト株式会社独自のマンナン研究開発チームからの援助を得て実行した。

滝田：菌体外マンナンの生理活性および機能性の利用技術の開発

森井：マンナン分解酵素の開発とマンノオリゴ糖の利用技術の開発

河東田：菌体外マンナンの生産効率および赤色色素の抽出方法の確立

研究の経過

（フェーズ 段階）

Rhodotorula 属酵母の野生株から菌体外マンナン生産能の高い YR-2 株を検索し、産生された -1,3:1,4-マンナンから YR-2 株が菌体外に分泌するマンナーゼを用いて -1,4-マンノピオースを生産する方法を確立した。

（中間年次における外部評価の概要）

「新規多糖類としてマンナンを用いている点については着眼点が良く、積極的

に取り組んでいる。しかし、新規多糖類については、機能性に対してより一層綿密な解析・評価を行う必要がある。」との外部評価を得ている

(フェーズ 段階)

得られたマンナンなどの多糖の構造解析を行い、その機能性を検討した。さらに、山形県からの補助金により、安全性、生理活性および機能性に関する委託試験を行うことが出来、多くの成果を得ている。

新規マンナンの酵素分解（特許申請2件）によるオリゴ糖生産とその有効利用が拡大した。さらに、マンナン分解酵素の生産系を確立し、その市場性を検討している。現在、新たな生理活性および機能性について、マンナンおよびマンノオリゴ糖の機能性食品や医薬品への開発について日東ベスト株式会社と共同で生理活性、機能性を生かした食材や医薬品開発の可能性を検討中である。

Rhodotorula YR-2 株が細胞壁中に有する赤色色素の効率よい抽出方法を開発し、その色素の化学構造を解析中である。新規の色素の可能性がある。

他属の酵母による新規多糖の構造を解析中であり、その有効利用も視野にいれることが出来た。

成果とその意義

(フェーズ)

- i. *Rhodotorula* YR-2 株が生産する α -1,3:1,4-マンナンの生産方法およびこの菌によりマンナーゼを生産する方法を確立した（それぞれ「 α -1,3:1,4-マンナンの製法」および「新規なエンド- α -1,3-マンナーゼとその製法」として、特許が公開されている）。

(フェーズ)

- i. *Rhodotorula* 属酵母の菌体外マンナンの多収量生産条件をより安価な窒素源の導入によって確立し、ベンチスケールにおける生産体系を確立した。
- ii. 菌体外マンナンの構造解析、物性試験、安全性、生理活性、機能性の結果、次の特性が明らかになった。
 - i) 本成果で得られたマンナンは、マンノースの直鎖構造であり、従来知られている増粘多糖類では見られない新規な構造である。
 - ii) 冷水に可溶であり、水溶液の物性は非常に低粘度（1%水溶液・常温で10mPas）である。よって、食品等に利用した場合、添加量によるテクスチャーへの影響が少ない。また各種使用条件に対しても耐性が高く、酸、塩、酵素、加熱、凍結に対して安定である。
 - iii) 安全性に関しては、日東ベスト製の酵母産生マンナンを用いた試験の結果、急

性毒性では2000mg/kgでもラット個体への影響は見られなかった。ラットへの90日間の強制経口投与による亜慢性毒性試験では1000mg/kgでも毒性影響は認められなかった。また変異原性も陰性、アナフィラキシーショックも認められなかった。皮膚感作試験については陽性であったが、食品添加物としての認可に影響しないほど弱陽性であった。以上のように安全性については、ほぼ問題は無いと言えるが、非GLP試験であるため、食品添加物の認可を行う場合は、さらに試験が必要となる。

- iv) 免疫賦活活性については、市販の免疫賦活剤の1.5倍の効果を示した(特許申請中)
- iii. この酵母菌体から赤色色素を抽出する方法を確立し、新たな構造の赤色色素を分離精製した。現在、その化学構造を解析中であり、新たな構造の色素として特許取得を検討中である。
- iv. マンナン分解酵素に関しては、新規の細菌による特許を申請し、加えて、これと異なる属の細菌の酵素生産に関しても特許申請を予定しており、効率よく難のオリゴ糖を生産することが可能となり、計画を越える成果を得た。
- v. さらに -マンナンを菌体外多糖として生産する新たな酵母の菌株を同定し、構造解析を継続中であり、新たな構造の可能性がある結果を得ている。

今後の研究展開

マンナンに新たな機能が確認されたことから、その特許申請と事業化に取り組む。さらに、赤色色素、新たなマンナン分解酵素、新規構造のマンナンに関しては、この事業終了までに特許申請を目指す。

日東ベスト株式会社は生理活性、機能性を生かした食材や医薬品開発について他社との共同研究の可能性を追求し、事業化に向けて多面的に取り組む。

マンナンの生産に関しては、タンク培養による培養条件の改良、新規酵母の検索、幅広い生理活性、機能性を解明する。

新規マンナン分解酵素の開発については、マンノオリゴ糖の大量精製系を確立し、生理活性、機能性を解明する。さらに、これらの糖については、他の多糖類との相乗効果による利用開発を目指す。

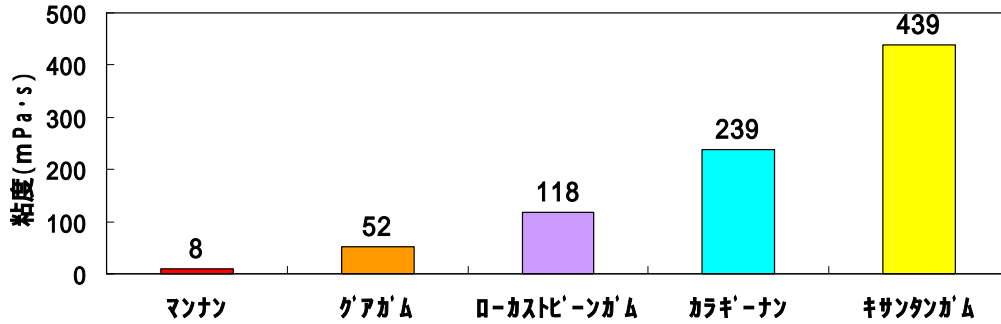
赤色色素については、天然色素としての利活用を図るとともに、その予測される構造から、抗酸化剤や活性酸素消去剤などへの応用面を追求する。

新たな酵母の菌株の菌体外多糖 -マンナンについては、これまで報告されていない新規構造を有する可能性があり、その構造を決定するとともに、生理活性、機能性を解明する。

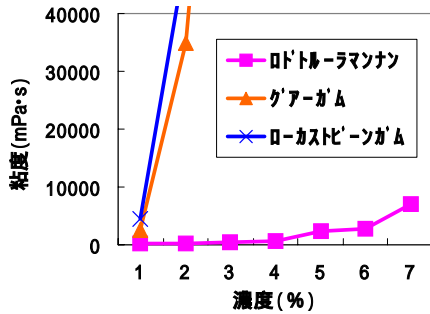
以上の一連の課題は、日東ベスト株式会社と共同で生理活性、機能性を生かした食材や医薬品開発の可能性のために継続して検討していく。

【成果を表す具体的な図表】

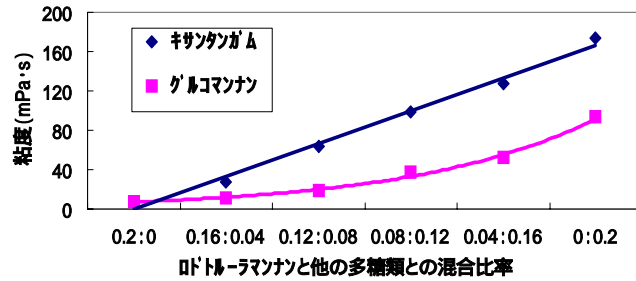
マンナンの物理的特性



【各多糖類1%水溶液の粘度比較】



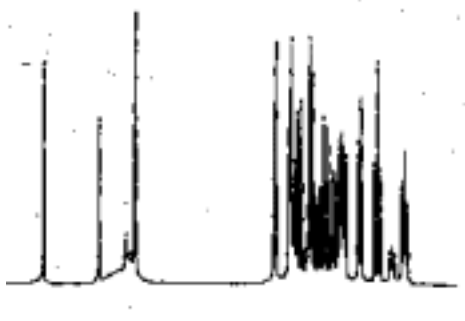
【濃度に伴う粘度変化】



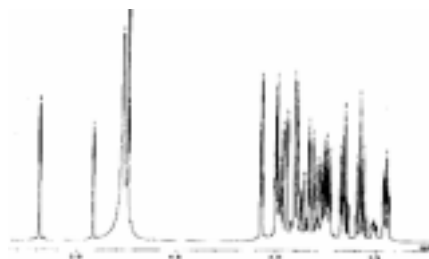
【他の多糖類との混合作用】

マンナーゼの特徴

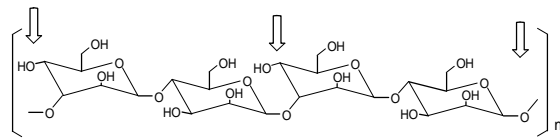
-1,4-マンノピオースの¹H NMR スペクトル



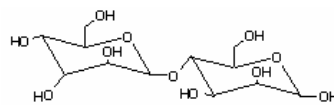
酵素分解によって得られたマンノピオースの¹H NMR スペクトル



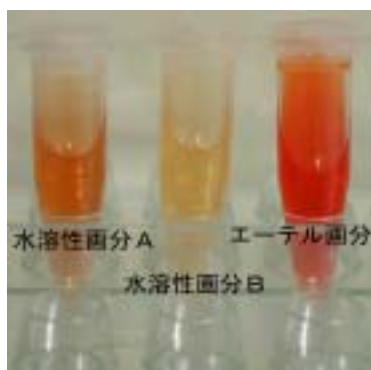
ロドトルーラマンナン



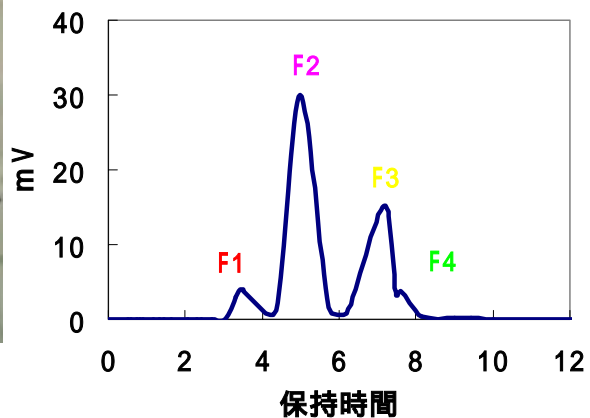
-1,4-マンノピオース



ロドトルーラ属酵母の赤色色素

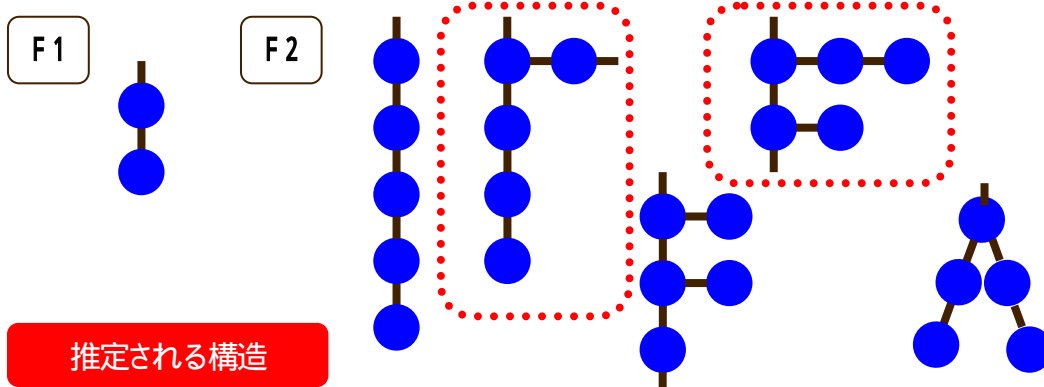


粗カロチノイドのHPLCクロマトグラム



F1: トルラロジン F2: トルレン
F3: カロテン F4: カロテン

ピキア酵母マンナン



1,6結合(,)

