

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6449156号
(P6449156)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 P 19/12 (2006.01)	C 1 2 P 19/12
A 2 3 L 29/10 (2016.01)	A 2 3 L 29/10
A 2 1 D 13/80 (2017.01)	A 2 1 D 13/80
A 2 3 L 2/00 (2006.01)	A 2 3 L 2/00
A 2 1 D 2/14 (2006.01)	A 2 1 D 2/14

B

請求項の数 7 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-530934 (P2015-530934)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月6日(2014.8.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/070788
 (87) 国際公開番号 W02015/020114
 (87) 国際公開日 平成27年2月12日(2015.2.12)
 審査請求日 平成29年8月7日(2017.8.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-167171 (P2013-167171)
 (32) 優先日 平成25年8月9日(2013.8.9)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000106106
 サラヤ株式会社
 大阪府大阪市東住吉区湯里2丁目2番8号
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 荒木 道陽
 大阪府柏原市玉手町24-12 サラヤ株
 式会社バイオケミカル研究所内
 (72) 発明者 平田 善彦
 大阪府柏原市玉手町24-12 サラヤ株
 式会社バイオケミカル研究所内

審査官 山本 匡子

最終頁に続く

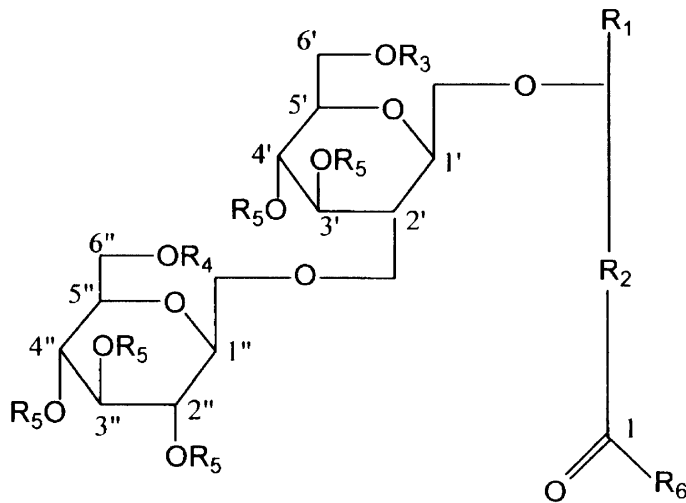
(54) 【発明の名称】 新型ソホロリピッド化合物及びそれを含有する組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(I)で示されるソホロリピッド化合物:

【化1】



(I)

〔式(I)中、R₁は水素原子またはメチル基を示す；

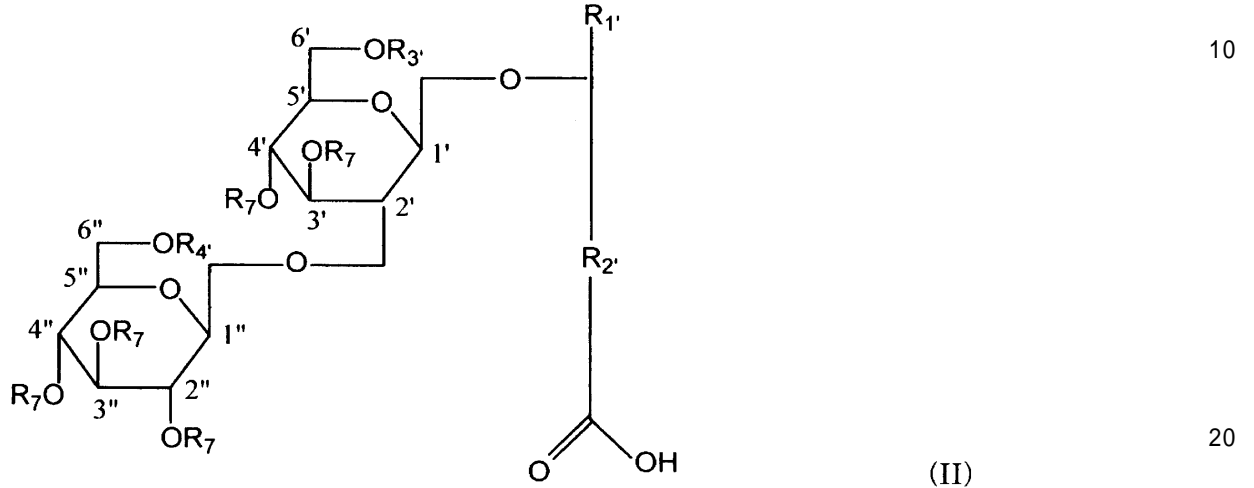
R₃及びR₄は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す；

R_5 は、5つのうち、1つはヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12～20の直鎖飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有するかまたは有しない二重結合を1～3つ有する炭素数12～20の直鎖脂肪酸残基であり、残りの4つは水素原子である；

R_2 は、炭素数9～18のアルキレン基または1～3の二重結合を有する炭素数9～18のアルケニレン基を示す；

R_6 は水酸基を示す。あるいは、 R_6 は下式(II)で示す化合物の5つある R_7 のいずれか1つと合一して単結合を形成していてもよい；

【化2】



(式(II)中、 R_1 は水素原子またはメチル基を示す；

R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す；

R_2 は、炭素数9～18のアルキレン基または1～3の二重結合を有する炭素数9～18のアルケニレン基を示す；

R_7 のうち一つは式(I)で示す化合物の R_6 と合一して単結合を形成しており、残りの4つは水素原子である。)]。

【請求項2】

上記ソホロリピッド化合物が、下記(1)または(2)で示す化合物である請求項1に記載するソホロリピッド化合物：

(1)一般式(I)中、 R_6 は水酸基； R_1 はメチル基； R_2 は炭素数9～17のアルキレン基または二重結合を1～3つ有する炭素数13～17のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の4''位に結合する R_5O -基の R_5 がヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12～20の脂肪酸残基であり、残りの R_5 は水素原子である化合物、

(2)一般式(I)中、 R_6 が一般式(II)で示されるソホロース環の4''位に結合する R_7O -基の R_7 と合一して単結合を形成しており； R_1 はメチル基； R_2 は炭素数9～17のアルキレン基または二重結合を1～3つ有する炭素数13～17のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の4''位に結合する R_5O -基の R_5 がヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12～20の脂肪酸残基であり、残りの R_5 は水素原子；

一般式(II)中、 R_1 はメチル基； R_2 は炭素数9～17のアルキレン基または二重結合を1～3つ有する炭素数13～17のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基である化合物。

【請求項3】

上記ソホロリピッド化合物が、下記(1)または(2)で示す化合物である請求項1または2に記載するソホロリピッド化合物：

(1)一般式(I)中、 R_6 は水酸基； R_1 はメチル基； R_2 は二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の4''位に結合する R_5O -基の R_5 がヒドロキシ基を有するオレ

イン酸残基であり、残りの R_5 は水素原子である化合物、

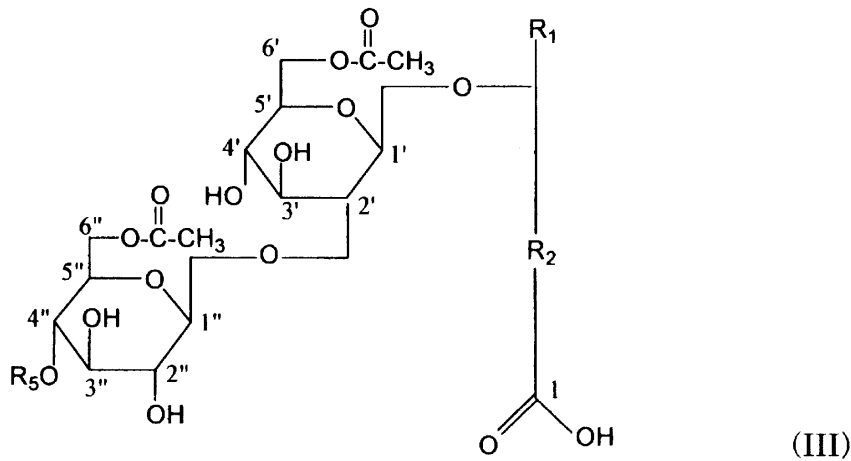
(2) 一般式 (I) 中、 R_6 が一般式 (II) で示されるソホロース環の 4'' 位に結合する R_7 O - 基の R_7 と合一して単結合を形成しており； R_1 はメチル基； R_2 は二重結合を 1 つ有する炭素数 15 のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の 4'' 位に結合する R_5 O - 基の R_5 がヒドロキシ基を有するオレイン酸残基であり、残りの R_5 は水素原子；

一般式 (II) 中、 R_1 はメチル基； R_2 は炭素数 13 のアルケニレン基； R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基である化合物。

【請求項 4】

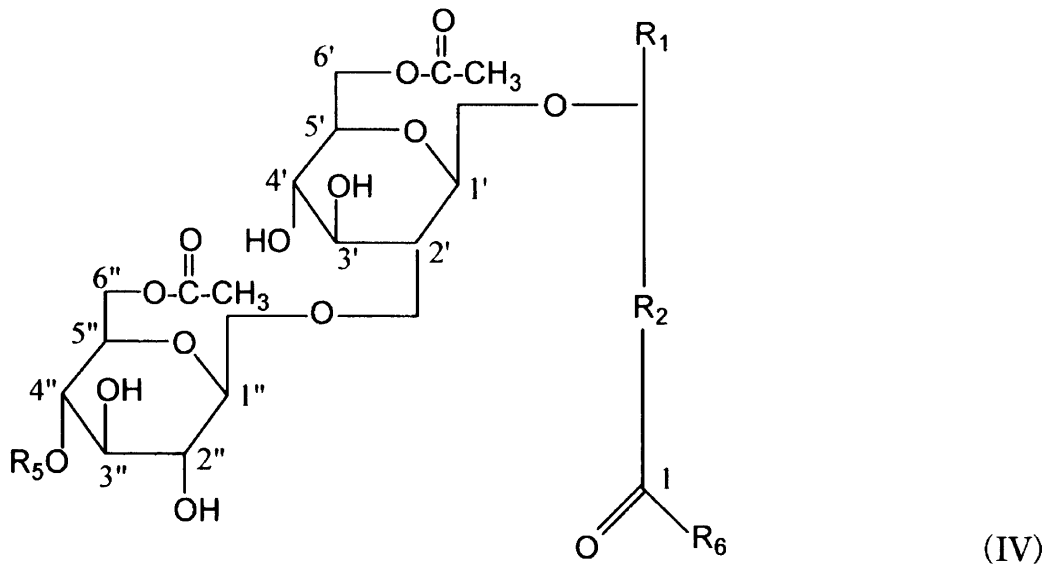
上記ソホロリピッド化合物が、下式 (III) または式 (IV) で示される化合物である請求項 1 に記載するソホロリピッド化合物：

【化 3】



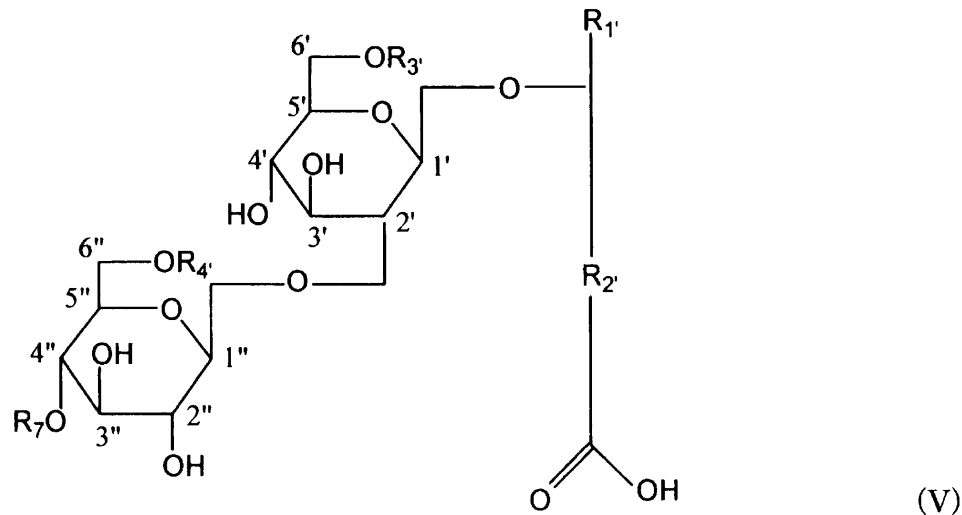
(式 (III) 中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数 15 のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を示す。)

【化 4】



(式 (IV) 中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数 15 のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を示す。 R_6 は、下式 (V) で示される R_7 と合一して単結合を形成している。)

【化5】



10

(式(V)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数13のアルキレン基、 R_3 は水素原子、 R_4 はアセチル基を示す。)

【請求項5】

請求項1乃至4のいずれか一項に記載するソホロリピッド化合物を少なくとも1つ含有する組成物(但し、ソホロリピッド産生酵母の培養物は含まない)。

20

【請求項6】

界面活性剤である、請求項5に記載する組成物。

【請求項7】

医薬品、医薬部外品、化粧品、飲食品またはこれらの添加物である、請求項5に記載する組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオサーファクタントの一種であるソホロリピッドに関する。

30

【背景技術】

【0002】

生物由来の界面活性剤であるバイオサーファクタント(以下、「BS」と称する。)は、生分解性及び安全性が高いことから、次世代型界面活性剤として産業利用が期待されている。

【0003】

糖脂質型BSの一つとして知られるソホロリピッド(以下、「SL」とも称する。)は、酵母の発酵物から得られる発酵産物である。当該SLは、例えば、グルコースなどの糖類と植物油などの炭素源を含む液体培地に酵母を接種し、穏和な温度、圧力条件下で通気しながら攪拌するだけで容易に生産される。SLは、他のBSに比べて、生産性が高いことから(例えば、100g/L程度)、広く産業利用されている(非特許文献1、特許文献1)。またSLは、人体に対する安全性が高いことから、実際に、食洗器用洗剤や化粧品へ利用されている例もある(特許文献2)。

40

【0004】

またSLの用途拡大を目指して、培地条件(特に炭素源)を変更してSLを醗酵生産したり(非特許文献2,3)、SL誘導体を化学合成するなど、今なお多くの研究がされている(特許文献3)。

しかし、一般に、化合物の化学合成については、環境に対する悪影響や安全性が懸念されており、現在では、LCA(Life Cycle Assessment)の観点から、原材料も含めたより安全な製造方法の確立が重要であると認識されている。このため、

50

安全性の高い天然物由来のSLについてもまた、有害な有機溶剤を使用・排出することなく製造する手法を確立することが重要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2002-45195号公報

【特許文献2】特開2003-13093号公報

【特許文献3】特開平7-118284号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Gorin, Can. J Chem., 39, 846 (1961)

【非特許文献2】A. Brakemeier, D. Wullbrandt, S. Lang: Appl Microbiol Biotechnol., 50, 161-166 (1998)

【非特許文献3】David A., Cavaleiro, David G. Cooper., Journal of Biotechnology 103 (2003) 31-41

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、飲食品、化粧品、医薬品、及び医薬部外品などの広範囲の分野に適用することができる新規なSLを提供することを目的とする。より詳細には、従来公知のSLと同様に界面活性能力を備えながらも、従来のSLと比べて有意に苦味が低減されてなり、飲食品、化粧品、及び経口用の医薬品や医薬部外品に対しても、その味を大きく損なわず、好適に使用することができる新規なSLを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討をした結果、SLを生産する能力を有する微生物の培養物から、従来公知のSL（酸型、ラクトン型）とは異なる新規構造のSL化合物を得ることができ、当該SL化合物は従来公知のSL（酸型SL、ラクトン型SL）と同様に界面活性能力（表面張力、乳化力）を有する一方で、苦味を有する従来公知のSLとは異なり苦味が格段に少ないことを確認した。当該SL化合物は、例えば飲食物や経口医薬品や医薬部外品、並びに化粧品の成分として、広範囲に適用することができる。

【0009】

本発明はかかる知見に基づいて開発されたものであり、下記の実施形態を有する。

【0010】

(I) 新規ソホロリピッド化合物（新規SL化合物）

(I-1) 下記一般式(I)で示されるSL化合物：

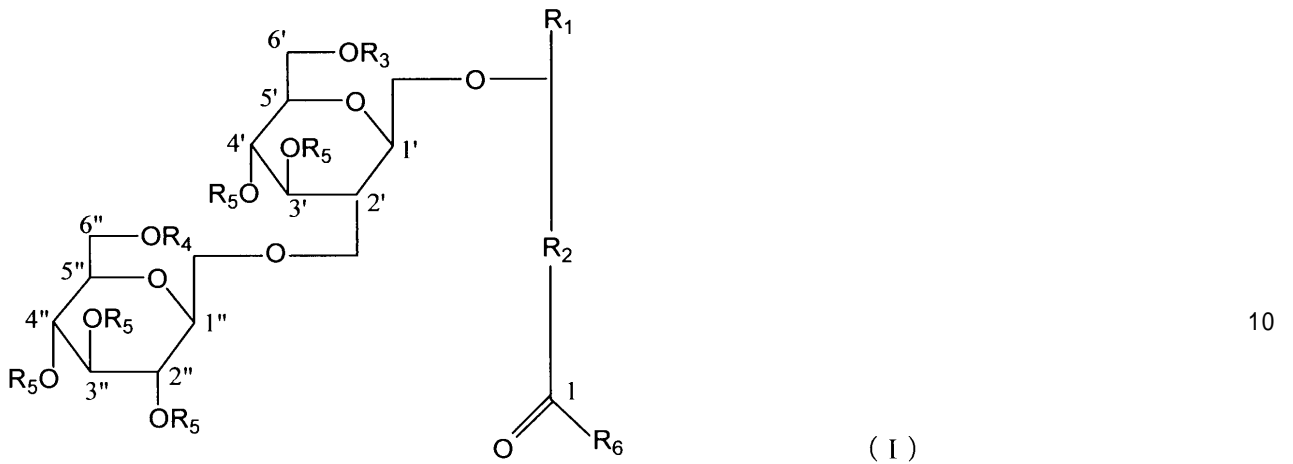
【0011】

10

20

30

【化1】



【0012】

〔式(I)中、 R_1 は水素原子またはメチル基を示す；

R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す；

R_5 は、5つのうち、1つはヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基であり、残りの4つはすべて水素原子である；

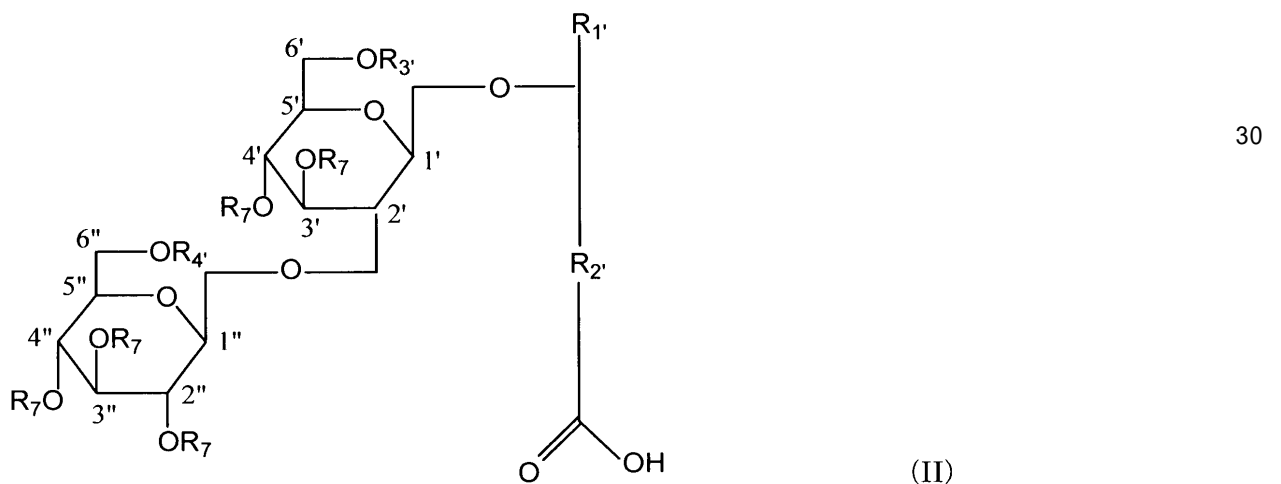
20

R_2 は、炭素数9～18のアルキレン基または1～3の二重結合を有する炭素数9～18のアルケニレン基を示す；

R_6 は水酸基を示す。あるいは、 R_6 は下式(II)で示す化合物の5つある R_7 のいずれか1つと合一して単結合を形成していてもよい；

【0013】

【化2】



【0014】

〔式(II)中、 R_1' は水素原子またはメチル基を示す；

R_3' 及び R_4' は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す；

R_2' は、炭素数9～18のアルキレン基または1～3の二重結合を有する炭素数9～18のアルケニレン基を示す；

R_7 のうち一つは式(I)で示す化合物の R_6 と合一して単結合を形成しており、残りはすべて水素原子である。〕。

40

【0015】

(1-2)一般式(I)中、 R_5O -基の R_5 の一つはヒドロキシ基を有することのある炭素数12～20の飽和脂肪酸残基または1～3の二重結合を有するヒドロキシ基を有することのある炭素数12～20の不飽和脂肪酸残基であり、残りの R_5 はすべて水素

50

原子である、(I-1)に記載するS L化合物。

【0016】

(I-3) ヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基であるR₅を有するR₅O-基がソホロース環の4"位に結合してなり、ソホロース環の3'位、4'位、2"位、及び3"位に結合してなるR₅O-基のR₅はすべて水素原子である、(I-1)または(I-2)に記載するS L化合物。

【0017】

(I-4) 一般式(I)中、R₆が式(II)で示される基であり、R₆と合一して単結合を形成するR₇を有するR₇O-基がソホロース環の4"位に結合してなり、ソホロース環の3'位、4'位、2"位、及び3"位に結合してなるR₇O-基のR₇はすべて水素原子である、(I-1)~(I-3)のいずれかに記載するS L化合物。

10

【0018】

(I-5) 一般式(I)中、R₆は水酸基；R₁はメチル基；R₂は二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基；ソホロース環の4"位に結合するR₅O-基のR₅はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基であり、残りのR₅はすべて水素原子である、(I-1)~(I-3)のいずれかに記載するS L化合物。

【0019】

(I-6) 一般式(I)中、R₆は一般式(II)で示されるソホロース環の4"位に結合するR₇O-基のR₇と合一して単結合を形成しており；R₁はメチル基；R₂は二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基；ソホロース環の4"位に結合するR₅O-基のR₅はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基であり、残りのR₅はすべて水素原子；一般式(II)中、R₁'はメチル基；R₂'は炭素数13のアルキレン基である、(I-1)~(I-3)のいずれかに記載するS L化合物。

20

【0020】

(I-7) 上記S L化合物が、下記(1)または(2)で示す化合物である(I-1)に記載するS L化合物：

(1) 一般式(I)中、R₆は水酸基；R₁はメチル基；R₂は炭素数9~17のアルキレン基または二重結合を1~3つ有する炭素数13~17のアルケニレン基；R₃及びR₄は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の4"位に結合するR₅O-基のR₅がヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12~20の脂肪酸残基であり、残りのR₅は水素原子である化合物、

30

(2) 一般式(I)中、R₆が一般式(II)で示されるソホロース環の4"位に結合するR₇O-基のR₇と合一して単結合を形成しており；R₁はメチル基；R₂は炭素数9~17のアルキレン基または二重結合を1~3つ有する炭素数13~17のアルケニレン基；R₃及びR₄は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基；ソホロース環の4"位に結合するR₅O-基のR₅がヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12~20の脂肪酸残基であり、残りのR₅は水素原子；

一般式(II)中、R₁'はメチル基；R₂'は炭素数9~17のアルキレン基または二重結合を1~3つ有する炭素数13~17のアルケニレン基；R₃'及びR₄'は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基である化合物。

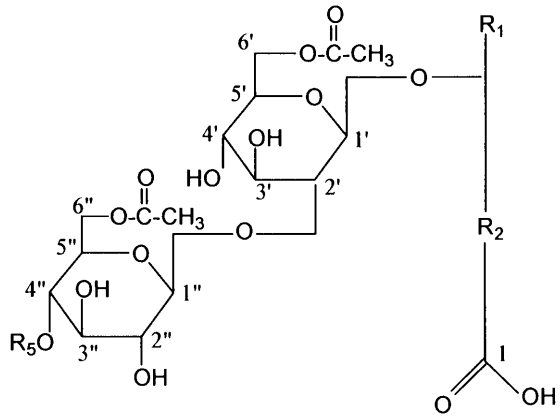
40

【0021】

(I-8) 下式(III)または式(IV)で示される化合物である(I-1)に記載するS L化合物：

【0022】

【化3】



(III)

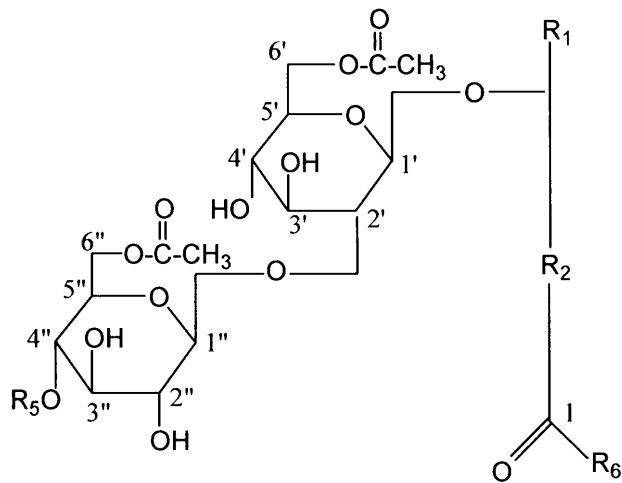
10

【0023】

(式(III)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を示す。)

【0024】

【化4】



(IV)

20

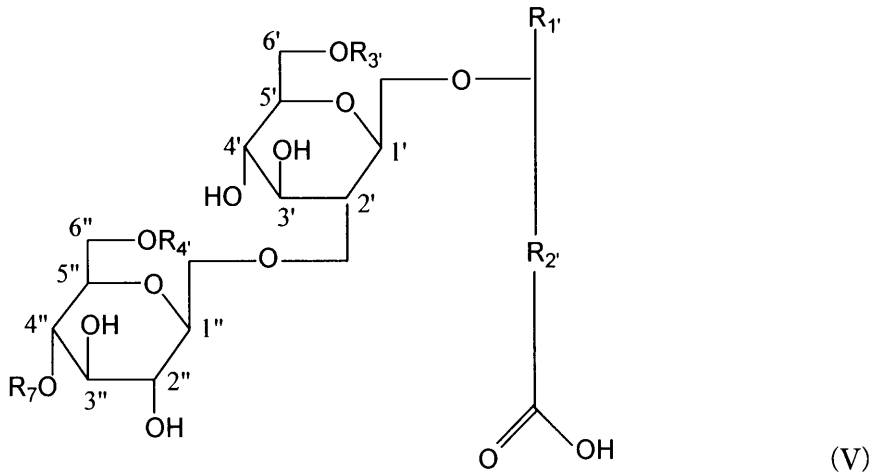
30

【0025】

(式(IV)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を示す。 R_6 は、下式(V)で示される R_7 と合一して単結合を形成している。)

【0026】

【化5】



10

【0027】

(式(V)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数13のアルキレン基、 R_3 は水素原子、 R_4 はアセチル基を示す。)

【0028】

(II) 新規ソホロリピッド含有組成物

(II-1) 上記(I-1)～(I-8)のいずれかに記載するSL化合物を少なくとも1つ含有する組成物。但し、当該組成物には、SL産生酵母の培養物は含まれない。

20

【0029】

(II-2) 界面活性剤である、(II-1)に記載する組成物。

【0030】

(II-3) 医薬品、医薬部外品、化粧品、飲食品またはこれらの添加物である、(II-1)に記載する組成物。

【発明の効果】

【0031】

本発明の新規SL化合物は、従来のSL(酸型、ラクトン型)と同様またはこれに匹敵する界面活性能(表面張力、乳化力)を有する一方で、強い苦味を有する従来型SLとは異なり、苦味が格段に少ないことを特徴とする。このため、本発明の新規SL化合物は、従来のSLでは苦味が理由で適用できなかった分野または適用が限られていた分野、例えば飲食品分野、経口医薬品分野、経口医薬部外品分野、及び化粧品分野においても、その界面活性作用を利用して、製品の一成分(例えば、乳化剤、消泡剤、凝固剤、保存料、結着剤、安定剤など)として有効に使用することができる。

30

【0032】

本発明の新規SL化合物を用いることで、味にほとんど影響を与えることなく、飲食品、医薬品、医薬部外品及び化粧品に対して所望の界面活性能を付与することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0033】

【図1】実施例1(1)で取得した「従来型SL/新型SL含有物」を逆相カラムクロマトグラフィーに供したクロマトグラムを示す(実施例1(3)参照)。

【図2】上から順に、X1画分、X2画分、酸型SL(アセチル基を有さない)、及びラクトン型SL(アセチル基を2つ有する)の赤外吸収スペクトルを示す(実施例1(4)(4-1)FTIR)参照。図2中、符号1の点線で示す 3340 cm^{-1} 付近のピークはOH伸縮; 符号2の点線で示す 2920 cm^{-1} 及び 2850 cm^{-1} 付近のピークは $-\text{CH}_2$, メチレン鎖由来; 符号3の点線で示す 1740 cm^{-1} 付近のピークは $\text{C}=\text{O}$, カルボン酸由来; 符号4の点線で示す 1240 cm^{-1} 付近のピークは $\text{C}=\text{O}$, アセチル基由来のカルボニル; 及び符号5の点線で示す 1040 cm^{-1} 付近のピークは $\text{C}-\text{O}$

50

- H, 糖由来のピークに、それぞれ該当する。

【図3】新型SL(X1-26)(図1のクロマトグラム中、ピーク26の化合物。以下同じ。)の、(A)¹H-NMRの結果、(B)¹³C-NMRの結果を示す。

【図4】新型SL(X1-26)の(A)HMQCの結果、(B)HMBCの結果を示す。

【図5】新型SL(X2-36)(図1のクロマトグラム中、ピーク36の化合物。以下同じ。)の、(A)¹H-NMRの結果、(B)¹³C-NMRの結果を示す。

【図6】新型SL(X2-36)の(A)HMQCの結果、(B)HMBCの結果を示す。

【図7】(A)新型SL(X1-26)のDEPT135の結果、(B)新型SL(X2-36)のDEPT135の結果、をそれぞれ示す。

【図8】(A)新型SL(X1-26)のMS⁽ⁿ⁾分析(ポジティブモード)結果を示す。(B)新型SL(X2-36)のMS⁽ⁿ⁾分析(ポジティブモード)結果を示す。

【図9】(A)X1画分のESI-MS分析結果を示す。(B)X2画分のESI-MS分析結果を示す。

【図10】(A)X1画分のMALDI-TOFMS分析結果を示す。(B)X2画分のMALDI-TOFMS分析結果を示す。

【発明を実施するための形態】

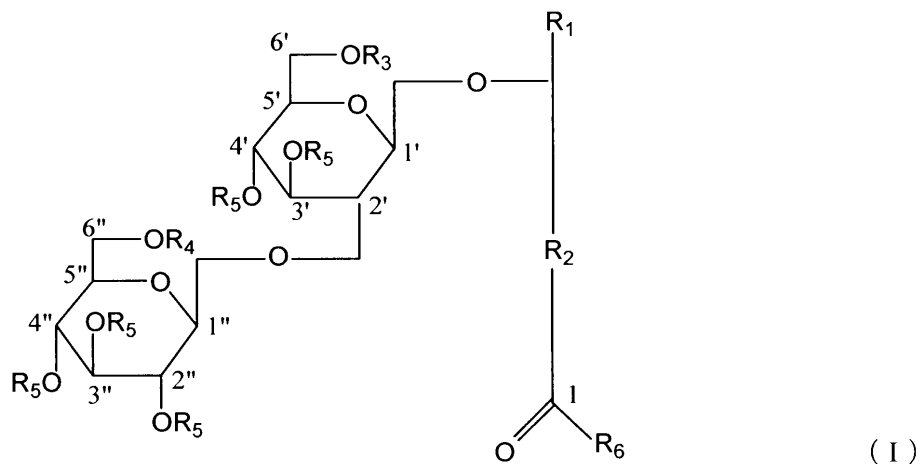
【0034】

(I) 新型ソホロリピッド化合物(新型SL化合物)

本発明のSL化合物(単に「新型SL」とも称する)は、下記の一般式(I)で示すことができる。

【0035】

【化6】



【0036】

上記式(I)中、R₁は水素原子またはメチル基を示す。好ましくはメチル基である。

【0037】

R₃及びR₄は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す。R₃及びR₄がいずれも水素原子であってもよいし、またはアセチル基であってもよい。またR₃が水素原子である場合、R₄はアセチル基であってもよいし、その逆にR₃がアセチル基である場合、R₄は水素原子であってもよい。好ましくは、R₃及びR₄はいずれもアセチル基である。

【0038】

R₂は、炭素数9~18、好ましくは炭素数9~17のアルキレン基または1~3の二重結合を有する炭素数9~18、好ましくは炭素数13~18のアルケニレン基を示す。ここで炭素数9~18のアルキレン基には、炭素数9~18の直鎖または分岐状のアルキレン基が含まれる。好ましくは直鎖状のアルキレン基である。炭素数は、好ましくは11~18、より好ましくは13~18、特に好ましくは15~16である。また1~3つの二重結合を有する炭素数9~18のアルケニレン基には、二重結合を1~3つ有する炭素

数 9 ~ 18 の直鎖または分岐状のアルケニレン基が含まれる。好ましくは直鎖状のアルケニレン基であり、より好ましくは二重結合を 1 または 2 つ有する炭素数 9 ~ 18 の直鎖状のアルケニレン基であり、さらに好ましくは二重結合を 1 つ有する炭素数 9 ~ 18 の直鎖状のアルケニレン基である。炭素数は、好ましくは 13 ~ 18、より好ましくは 13 ~ 17、特に好ましくは 13 ~ 16 である。R₂ として、好ましくは炭素数 13 ~ 16 のアルケニレン基または 1 または 2 つの二重結合を有する炭素数 13 ~ 16 のアルケニレン基であり、より好ましくは 1 つの二重結合を有する炭素数 15 ~ 16 のアルケニレン基である。

【0039】

R₅ は、水素原子、ヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基を示す。但し、式 (I) の化合物 (以下、「化合物 (I)」とも称する。) に示される 5 つの R₅ のうち、1 つはヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基であり、残りの全ては水素原子である。

10

【0040】

ここで飽和脂肪酸残基としては、炭素数 12 ~ 20 の直鎖脂肪酸残基 (ラウリン酸残基、ミリスチン酸残基、ペンタデシル酸残基、パルミチン酸残基、マルガリン酸残基、ステアリン酸残基、アラキジン残基) を挙げることができる。好ましくは炭素数 14 ~ 20、より好ましくは炭素数 16 ~ 20、さらに好ましくは炭素数 16 ~ 18 の直鎖脂肪酸残基であり、特に好ましくは炭素数 16 のパルミチン酸残基及び炭素数 18 のステアリン酸残基である。

20

【0041】

また不飽和脂肪酸残基としては、二重結合を 1 ~ 3 つ有する炭素数 12 ~ 20 の直鎖脂肪酸残基を挙げることができる。二重結合の数として、好ましくは 1 ~ 2 であり、より好ましくは 1 である。また炭素数として好ましくは 16 ~ 20 であり、より好ましくは 16 ~ 18、特に好ましくは 18 である。好適な不飽和脂肪酸残基としては、二重結合を 1 つ有する炭素数 16 のパルミトレイン酸残基；二重結合を 1 つ有する炭素数 18 のオレイン酸残基またはバクセン酸残基 (好ましくはオレイン酸残基)；二重結合を 2 つ有する炭素数 18 のリノール酸残基；二重結合を 3 つ有する炭素数 18 の (9,12,15) リノレン酸残基、(6,9,12) リノレン酸残基、及びエレオステアリン酸残基；二重結合を 2 つ有する炭素数 20 の (9,12,15) リノレン酸残基、(6,9,12) リノレン酸残基、及びエレオステアリン酸残基を挙げることができる。より好ましくは二重結合を 1 つ有する炭素数 16 のパルミトレイン酸残基、及び二重結合を 1 つ有する炭素数 18 のオレイン酸残基であり、特に好ましくは二重結合を 1 つ有する炭素数 18 のオレイン酸残基である。

30

【0042】

これらの脂肪酸残基は、ヒドロキシ基を有していてもよいし、有していなくてもよい。ヒドロキシ基を有する場合、ヒドロキシ基の数としては 1 ~ 2、好ましくは 1 を挙げることができる。また脂肪酸残基上のヒドロキシ基の位置としては、1 位または 2 位を挙げることができる。

【0043】

化合物 (I) において、R₅ がヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基である場合の -OR₅ の位置は、ソホロース環の 3' 位、4' 位、2" 位、3" 位、及び 4" 位のいずれであってもよい。つまり、本発明が対象とする化合物 (I) には、これらのいずれかが 1 つの位置に、上記脂肪酸残基である R₅ を有する -OR₅ 基が結合してなる SL 化合物が含まれる。より好ましくはソホロース環の 4" 位に、ヒドロキシ基を有することのある飽和脂肪酸残基またはヒドロキシ基を有することのある不飽和脂肪酸残基を R₅ とする -OR₅ が結合してなる化合物 (I) である。

40

【0044】

上記式 (I) 中、R₆ は水酸基であってもよい。R₆ が水酸基である本発明の SL 化合物を便宜上、「単量型 SL 化合物」とも称する。

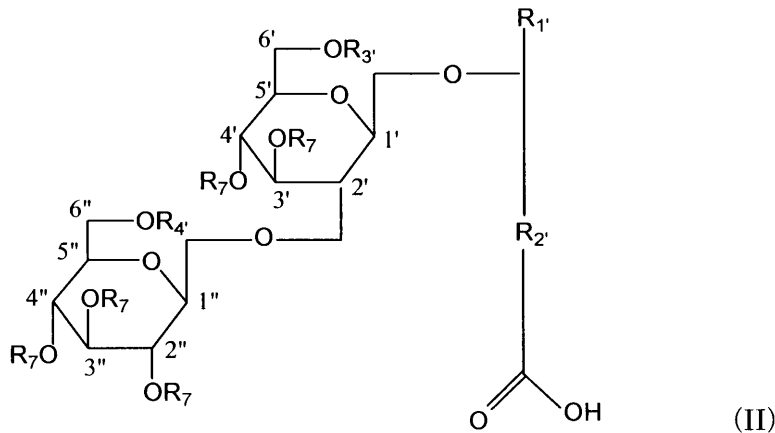
50

【 0 0 4 5 】

また上記 (I) 中の R_6 は、下式 (II) で示される分子のソホロース環の 3' 位、4' 位、2'' 位、3'' 位、及び 4'' 位のいずれかに、エステル結合によって結合してなる R_7 のいずれか一つと合一して単結合を形成していてもよい。

【 0 0 4 6 】

【 化 7 】



10

【 0 0 4 7 】

R_6 と一緒になって単結合を形成する R_7 は、上記式 (II) のソホロース環の 3' 位、4' 位、2'' 位、3'' 位、及び 4'' 位のいずれの R_7 であってもよい。つまり、本発明が対象とする化合物 (I) には、これら R_7 のいずれか 1 つの位置に、 R_6 との結合 (単結合) を介して、上記式 (I) で示される化合物が結合してなる 2 量体タイプの SL 化合物が含まれる。当該二量体タイプの SL 化合物として、好ましくは上記式 (II) 中のソホロース環の 4'' 位に位置する -OR₇ の R_7 が、式 (I) 中の R_6 と合一して単結合を形成してなる化合物を挙げることができる。当該二量体タイプの SL 化合物を、上記「単量型 SL 化合物」と区別するために、便宜上、「二量型 SL 化合物」とも称する。

20

【 0 0 4 8 】

なお、上記式 (II) 中、 $R_{1'}$ は水素原子またはメチル基を示す。好ましくはメチル基である。

30

【 0 0 4 9 】

$R_{3'}$ 及び $R_{4'}$ は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す。 $R_{3'}$ 及び $R_{4'}$ がいずれも水素原子であってもよいし、またはアセチル基であってもよい。また $R_{3'}$ が水素原子である場合、 $R_{4'}$ はアセチル基であってもよいし、その逆に $R_{3'}$ がアセチル基である場合、 $R_{4'}$ は水素原子であってもよい。好ましくは、 $R_{3'}$ は水素原子であり、 $R_{4'}$ はアセチル基である。

【 0 0 5 0 】

$R_{2'}$ は、炭素数 9 ~ 18、好ましくは炭素数 9 ~ 17 のアルキレン基または 1 ~ 3 の二重結合を有する炭素数 9 ~ 18、好ましくは炭素数 13 ~ 18 のアルケニレン基を示す。ここで炭素数 9 ~ 18 のアルキレン基には、炭素数 9 ~ 18 の直鎖または分岐状のアルキレン基が含まれる。好ましくは直鎖状のアルキレン基である。炭素数は、好ましくは 11 ~ 18、より好ましくは 13 ~ 18、さらに好ましくは 13 ~ 16、特に好ましくは 13 または 14 である。また 1 ~ 3 つの二重結合を有する炭素数 9 ~ 18 のアルケニレン基には、二重結合を 1 ~ 3 つ有する炭素数 9 ~ 18 の直鎖または分岐状のアルケニレン基が含まれる。好ましくは直鎖状のアルケニレン基であり、より好ましくは二重結合を 1 または 2 つ有する炭素数 9 ~ 18 の直鎖状のアルケニレン基であり、さらに好ましくは二重結合を 1 つ有する炭素数 9 ~ 18 の直鎖状のアルケニレン基である。炭素数は、好ましくは 13 ~ 18、好ましくは 13 ~ 17、特に好ましくは 13 ~ 16 である。 $R_{2'}$ として、好ましくは炭素数 13 ~ 16 のアルキレン基または 1 つの二重結合を有する炭素数 13 ~ 16 のアルケニレン基であり、より好ましくは炭素数 13 または 14 のアルキレン基であ

40

50

る。

【0051】

R_6 が式 (II) で示される基である場合、式 (I) 中の R_2 と式 (II) 中の R_2 とは同一または異なる基であってよく、異なる場合の例として、 R_2 が二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基であり、 R_2 が炭素数13のアルキレン基を例示することができる。

【0052】

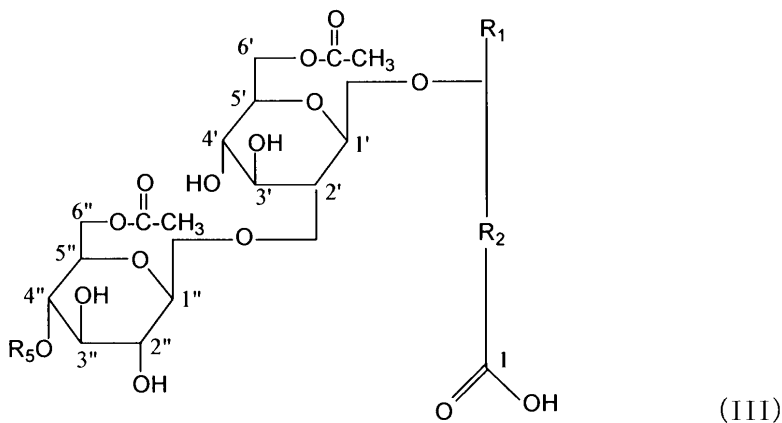
本発明の好適なSL化合物として、単量型SL化合物として下式(III)で示される化合物を、また二量型SL化合物として下式(IV)で示される化合物を挙げることができる。

10

【0053】

【化8】

単量型SL化合物の一例 (実施例において「新型SL (X1-26)」として記載)



20

【0054】

式 (III) 中、 R_1 はメチル基を示す。

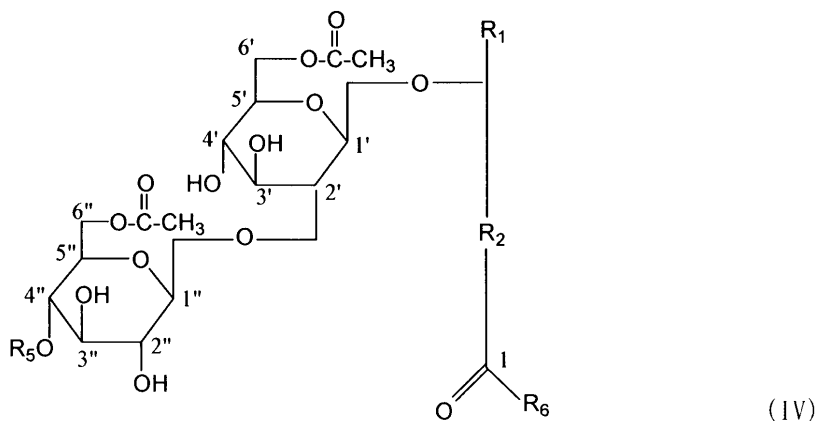
また R_2 は二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を意味する。

30

【0055】

【化9】

二量型SL化合物の一例 (実施例において「新型SL (X2-36)」として記載)



40

【0056】

式 (IV) 中、 R_1 はメチル基を示す。

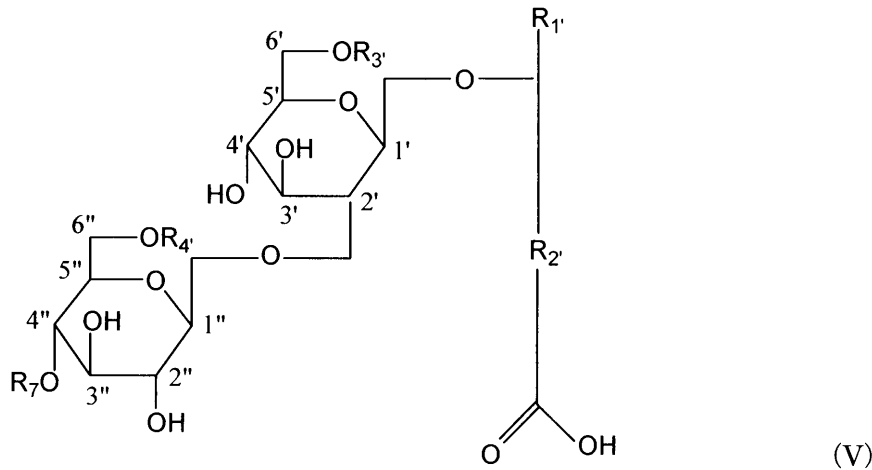
R_2 は二重結合を1つ有する炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有する

50

オレイン酸残基を意味する。また、 R_6 は、下式 (V) で示される R_7 と合一して単結合を形成している。

【0057】

【化10】



10

【0058】

式 (V) 中、 $R_{1'}$ はメチル基を示す。

$R_{2'}$ は炭素数 13 のアルキレン基、 $R_{3'}$ は水素原子、 $R_{4'}$ はアセチル基を意味する。

20

【0059】

(II) 新型 SL 化合物の製造方法

本発明の SL 化合物は、酵母を培養して得られる培養物から調製することができる。

【0060】

(II-1) 使用する微生物

上記培養に使用する酵母としては、キャディダ・ボンビコーラ (*Candida bombicola*) を好適に挙げることができる。なお、キャディダ・ボンビコーラは、現在スタメラ (*Starmerella*) 属という名称に変更されている。当該酵母は、SL (酸型、ラクトン型) を著量生産することが知られている公知の SL 産生酵母である [Canadian Journal of Chemistry, 39,846(1961) (注: 当該文献に記載されているトルロプシス属は、キャディダ属に該当するが、上記するように、現在スタメラ (*Starmerella*) 属に分類されている。)、Applied and Environmental Microbiology, 47,173(1984) など]。なお、キャディダ (スタメラ) ・ボンビコーラは生物資源バンクである ATCC (American Type Culture Collection) に登録されており、そこから入手することができる (*Candida bombicola* ATCC22214 など)。また、本発明の SL 化合物の製造には、SL (酸型、ラクトン型) を産生することが知られているキャンディダ属に属する他の SL 産生酵母を使用することもできると考えられ、かかる SL 産生酵母として、例えばキャンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*)、キャンディダ・グロペンギッセリ (*Candida gropengiseri*)、及びキャンディダ・アピコーラ (*Candida apicola*) を挙げることができる。なお、これらの酵母の培養液中に SL が比較的多量に生産されることは既に報告されている (R. Hommel, Biodegradation, 1, 107(1990))。

30

40

【0061】

(II-2) 使用する培地及び培養条件

本発明における上記酵母の培養においては、炭素源としてグルコース等の糖類 (親水性基質)、並びに脂肪酸、脂肪酸トリグリセリド等の脂肪酸エステル類、または脂肪酸を構成成分として含む植物油等の油脂類 (疎水性基質) を含有する培地が用いられる。培地のその他の条件については、特に制限はなく、酵母に対して一般に用いられる培地成分から適宜選定することができる。

【0062】

50

S Lの脂肪酸部分は、培地成分として添加する疎水性基質の脂肪酸鎖長やその割合に依存することが知られている。本発明のS L化合物においても同様であり、培地に添加する疎水性基質を適宜選択することでS L化合物を構成する脂肪酸鎖長やその割合を制御することができる。例えば、疎水性基質として、ラウリン酸(12:0)、ミリスチン酸(14:0)、ペンタデシル酸(15:0)、パルミチン酸(16:0)、マルガリン酸(17:0)、ステアリン酸(18:0)またはアラキジン酸(20:0)等の炭素数12~20の長鎖飽和脂肪酸またはこれらの飽和脂肪酸を高い割合で含有する脂質を疎水性基質として用いることで、これらの飽和脂肪酸残基またはそれに由来する鎖(アルキレン基)を構成成分に有するS L化合物を製造することができる。またパルミトレイン酸(16:1)、オレイン酸(18:1)、バクセン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、(9,12,15)-リノレン酸(18:3)、(6,9,12)-リノレン酸(18:3)、エレオステアリン酸(18:3)、8,11-イコサジエン酸(20:2)または5,8,11-イコサトリエン酸(20:3)等の二重結合を1~3つ有する炭素数16~20の長鎖不飽和脂肪酸またはこれらの不飽和脂肪酸を高い割合で含有する脂質を疎水性基質として用いることで、これらの不飽和脂肪酸残基またはそれに由来する鎖(アルケニレン基)を構成成分に有するS L化合物を製造することができる。

【0063】

疎水性基質(油性基質)としては、培養によるS L産生に使用され得ることが報告されているいずれの油性基質もが使用可能であり、このような疎水性基質として、植物性油脂(Zhouら、J. Am. Oil. Chem. Soc., 69:89-91(1992)など)、動物性油脂(Deshpandeら、Bioresource Technol., 54:143-150(1995))、脂肪酸(Asmerら、J. Am. Oil. Chem. Soc., 65:1460-1466(1988)など)、脂肪酸エステル(Davilaら Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:6-11(1992))、n-アルカン(Tullochら、Can. J. Chem., 46:345-348(1968)などが報告されている。好ましくは、植物性油脂または脂肪酸、あるいは植物油脂を原料とする脂肪酸エステルが使用され得る。植物性油脂として、通常、食用植物油が使用され得る。使用される植物油としては、例えば、ダイズ油、ナタネ油、綿実油、ヒマワリ油、カボック油、ゴマ油、コーン油、コメ油、落花生油、ベニバナ油、オリーブ油、アマニ油、キリ油、ヒマシ油、パーム油、パーム核油、ヤシ油など、またはこれらの混合物が挙げられる。ダイズ油、ナタネ油、ヒマワリ油、ベニバナ油、またはこれらの混合物が好ましい。このような脂肪酸の炭素数は6~24、好ましくは12~20の範囲であり、さらにそれぞれの分子内に0~3箇所の不飽和結合を含んでもよい。用いられる脂肪酸としては、カブロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、およびリグノセリン酸のような飽和脂肪酸；ならびにトウハク酸、リンデル酸、ツズ酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、ペトロセリン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、エルカ酸、リノール酸、-リノレン酸、およびリノレン酸のような不飽和脂肪酸；ならびにこれらの混合物が挙げられる。脂肪酸エステルとしては、前出の脂肪酸のエステルが挙げられる。培養の開始時に添加され得る油性基質の濃度は、50~200 g/L、好ましくは100~150 g/Lの範囲である。連続的に供給される場合、上記濃度に相当する量の油性基質が、培養期間中に均等速度で培養系に添加される。

【0064】

疎水性基質として、好ましくは1つの二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸であるオレイン酸あるいはオレイン酸を高い割合で含有する脂質を挙げることができる。かかる脂質として、例えばパーム油、米ぬか油、ナタネ油、オリーブ油、サフラワー油などの植物油、及び豚脂や牛脂などの動物油が挙げられる。さらに、疎水性基質をトリグリセライドとオレイン酸の混合基質を用いれば、高い割合でオレイン酸残基またはそれに由来する鎖(アルケニレン基)を有するS L化合物を高い収量・収率で得ることが可能である。

【0065】

10

20

30

40

50

産業利用の観点からは、安定的に高い収量・収率でSL化合物を発酵生産させることが求められるが、この場合、炭素源として上記の疎水性基質（長鎖飽和または不飽和脂肪酸、脂質）と親水性基質とを混合して用いることが好ましい。親水性基質としては、グルコース、フルクトース、ガラクトースなどの単糖類；およびスクロースやマルトースなどの二糖類等の糖類を挙げることができるが、好ましくはグルコースである。

【0066】

特に前記キャディダ（スタメレラ）・ボンピコーラ（*Candida*[*Starmerella*] *bombicola* ATCC22214）株を用いて、本発明のSL化合物を生産する場合の好適な培地組成は、以下のとおりである。

酵母エキス：1～6 g/L、好ましくは2～5 g/L、より好ましくは2.5～4.5 g/L、

長鎖飽和または不飽和脂肪酸：50～200 g/L、好ましくは50～170 g/L、より好ましくは50～150 g/L、

脂質（油脂）：50～200 g/L、好ましくは50～170 g/L、より好ましくは50～150 g/L、

糖類（グルコース）：50～200 g/L、好ましくは50～150 g/L、より好ましくは70～120 g/L、

塩化ナトリウム：0.1～5 g/L、好ましくは0.1～3 g/L、より好ましくは0.5～1.5 g/L、

リン酸一カリウム：5～50 g/L、好ましくは5～35 g/L、より好ましくは10～25 g/L、

硫酸マグネシウム；1～50 g/L、好ましくは1～30 g/L、より好ましくは5～15 g/L、

ペプトン：1～50 g/L、好ましくは1～30 g/L、より好ましくは5～15 g/L、

尿素：0.01～10 g/L、好ましくは0.01～5 g/L、より好ましくは0.05～3 g/L。

【0067】

本発明のSL化合物の製造方法（SL産生酵母の培養）は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができるが、定法に従って種培養及び本培養の順にスケールアップしていくことが望ましい。これらの培養における、培地、培養条件を例示すると以下のとおりである。

【0068】

a) 種培養；含水グルコース10 g/L、酵母エキス5 g/L、及びペプトン10 g/Lを含む液体培地で、キャディダ（スタメレラ）・ボンピコーラ（*Candida*[*Starmerella*] *bombicola* ATCC22214）株を30で2日間振盪培養する。

【0069】

b) 本培養；上記種培養で得られた培養液を種菌として、脂質（油脂）50 g/L、長鎖飽和または不飽和脂肪酸50 g/L、含水グルコース100 g/L、酵母エキス2.5 g/L、塩化ナトリウム1 g/L、リン酸一カリウム20 g/L、硫酸マグネシウム7水和物10 g/L、尿素1 g/Lを含む液体培地（滅菌前pH4～5）に接種して、30程度の温度条件で6日間、通気培養を行い発酵させる。

【0070】

なお、上記脂質（油脂）及び長鎖飽和または不飽和脂肪酸としては、前述するように本発明のSL化合物を構成する脂肪酸残基または脂肪酸由来基（アルキレン基、アルケニレン基）に応じて適宜選択設定することができる。例えば、オレイン酸残基またはオレイン酸由来基（1つの二重結合を有する炭素数18のアルケニレン基。式(1)の場合、R₂は1つの二重結合を有する炭素数15のアルケニレン基）を構成成分として有するSL化合物を製造する場合には、長鎖飽和または不飽和脂肪酸としてオレイン酸を、また脂質（油脂）としてオレイン酸残基を多く含む、例えばパーム油、米ぬか油、なたね油、オリ-

10

20

30

40

50

ブ油、サフラワー油などの植物油を好適に使用することができる。

【0071】

また新しく得られる培養物から、本発明のSL化合物を含む画分を取得する方法としては、例えば次の方法を挙げることができる。

【0072】

i) SL含有画分(従来型SLと本発明のSL化合物を含む混合物)の調製

上記で得られる培養物を静置し、生じた上澄を除去した後、上澄と同量の水を添加し、これに水酸化ナトリウム等のアルカリ成分を用いてpH6.5~7程度に調整し、培養物に含まれるSLを可溶化する。これを遠心分離することで固形物を除去し、SLが可溶化した上清を回収する。これに例えば硫酸水溶液を添加してpH2~3に調整するとSLが

10

再不溶化するため、この不溶化物を回収することでSL含有画分(従来型SLと本発明のSL化合物を含む混合物)を得ることができる。

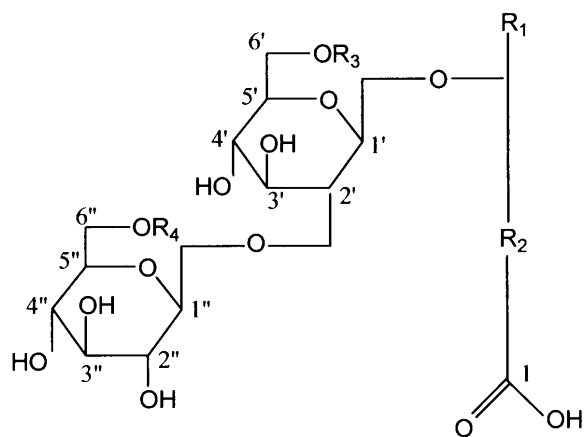
【0073】

なお、従来型SLには、下式(VI)で示される酸型SLと下式(VII)で示されるラクトン型SLが含まれる。

【0074】

【化11】

酸型SL



20

(VI)

30

【0075】

式(VI)中、R₁は水素原子またはメチル基を示す。

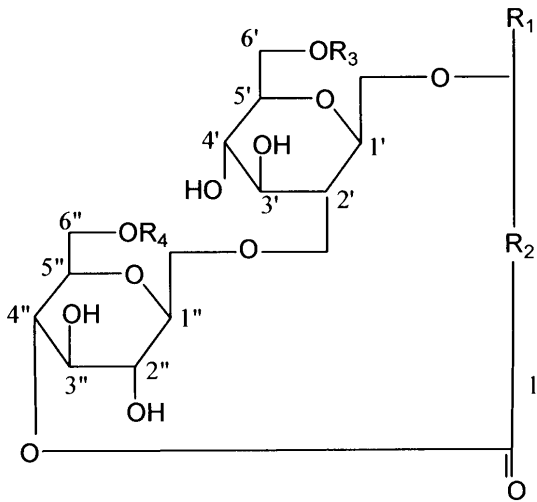
R₃及びR₄は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す。

R₂は、炭素数9~18のアルキレン基または1~3の二重結合を有する炭素数9~18のアルケニレン基を示す。

【0076】

【化 1 2】

ラクトン型 S L



(VII)

10

【 0 0 7 7】

式 (VII) 中、 R_1 は水素原子またはメチル基を示す。

R_3 及び R_4 は、同一または異なって、水素原子またはアセチル基を示す。

R_2 は、炭素数 9 ~ 18 のアルキレン基または 1 ~ 3 の二重結合を有する炭素数 9 ~ 18 のアルケニレン基を示す。

20

【 0 0 7 8】

ii) S L 含有画分から本発明の S L 化合物の単離

例えば、C18 の ODS カラムを用いた逆相カラムクロマトグラフィーを用いることで、従来型 S L と本発明の S L 化合物との両方を含む S L 含有画分から本発明の S L 化合物を含む画分を、従来型 S L (酸型、ラクトン型) と分別して単離することができる。具体的には、実施例 1 (2) に示すように、固定相として C18 の ODS カラムを、移動相として 50 ~ 95 容量%のエタノール水溶液を用いた逆相カラムクロマトグラフィーにおいて、従来型 S L は酸型 S L もラクトン型 S L はいずれも 80 容量%エタノール水溶液で溶出するのに対して、本発明の S L 化合物はエタノール濃度が 90 容量%濃度以上のエタノール水溶液で溶出する。本発明の S L 化合物は、一般式 (I) 中、 R_6 が水酸基である S L 化合物 (単量型 S L 化合物) と、 R_6 が式 (II) で示される R_7 と一緒に単結合を形成して 2 量体を形成してなる S L 化合物 (二量型 S L 化合物) に大きく分類されるが、前者の「単量型 S L 化合物」は、上記逆相カラムクロマトグラフィーにおいてエタノール濃度が 90 容量%であるエタノール水溶液で溶出回収することができ、後者の「二量型 S L 化合物」は、エタノール濃度が 95 容量%であるエタノール水溶液で溶出回収することができる。

30

【 0 0 7 9】

なお、90 容量%のエタノール水溶液で溶出回収される画分 (X1 画分) には、一般式 (I) 中、 R_6 が水酸基である「単量型 S L 化合物」が複数種含まれる。これらの化合物は、後述する表 1 に記載する条件の HPLC において保持時間 45 ~ 60 分の領域にピークを有する化合物群である (図 1 参照)。

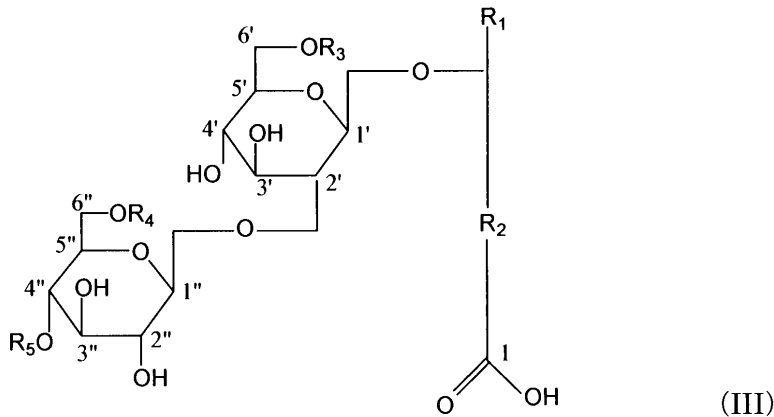
40

【 0 0 8 0】

これらの X1 画分には、図 1 で示すクロマトグラムにおいてピーク 26 (保持時間 54 分) で示される下式 (III) :

【 0 0 8 1】

【化 1 3】



10

【 0 0 8 2 】

(式(III)中、 R_1 はメチル基、 R_3 及び R_4 はいずれもアセチル基、 R_2 は炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を意味する。)

で示される化合物(単量型SL化合物)が含まれる他、上記式(III)において R_5 で示される脂肪酸残基の鎖長及び/又は R_2 で示される脂肪酸に由来する脂肪族残基の鎖長が上記化合物(III)と異なる化合物が含まれる。具体的には、 R_1 はメチル基、 R_3 及び R_4 はいずれもアセチル基、 R_2 は炭素数9~17のアルキレン基または二重結合を1~3有する炭素数13~17のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数12~20の脂肪酸残基であるSL化合物が含まれる(以上説明する化合物群を、便宜上「単量型SL化合物-例1」と称する)。

20

【 0 0 8 3 】

また、X1画分には、上記化合物(単量型SL化合物-例1)において R_1 がメチル基に代えて水素原子であるSL化合物；上記化合物において R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて水素原子であるSL化合物；上記化合物において R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて、 R_3 及び R_4 の一方が水素原子であり、他方がアセチル基であるSL化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて水素原子であるSL化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて R_3 及び R_4 の一方が水素原子であり、他方がアセチル基であるSL化合物も含まれる(以上説明する化合物群を、便宜上「単量型SL化合物-例2」と称する)。

30

【 0 0 8 4 】

さらにX1画分には、上記化合物群(単量型SL化合物-例1及び例2)に属する各種の化合物において、ソホロース環の4''位に対する-OR₅基の結合に代えて、-OR₅基がソホロース環の3'位、4'位、2''位または3''位のいずれか一箇所に結合してなるSL化合物が含まれる。

【 0 0 8 5 】

なお、95容量%のエタノール水溶液で溶出回収される画分(X2画分)には、一般式(I)中の R_6 が式(II)で示される R_7 と一緒に単結合を形成して2量体を形成してなる二量型SL化合物が複数種含まれる。これらの化合物は、後述する表1に記載する条件のHPLCにおいて保持時間60~70分の領域にピークを有する化合物群である(図1参照)。

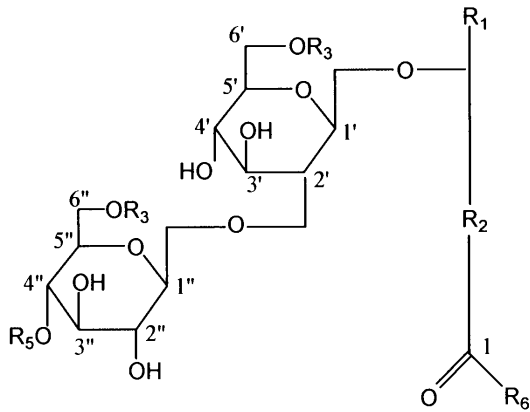
40

【 0 0 8 6 】

これらのX2画分には、図1で示すクロマトグラムにおいてピーク36(保持時間64分)で示される下式(IV)：

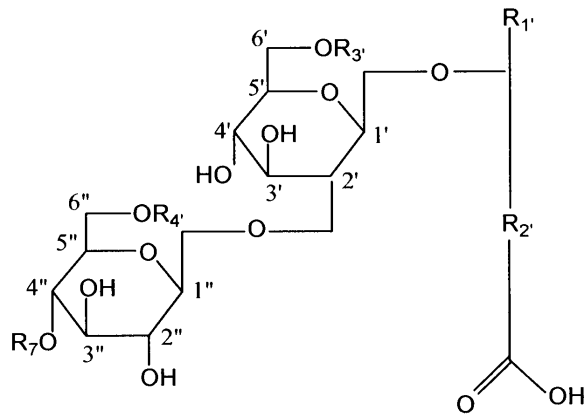
【 0 0 8 7 】

【化 1 4】



(IV)

(式 (IV) 中、 R_1 はメチル基、 R_3 及び R_4 はいずれもアセチル基、 R_2 は炭素数 15 のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を意味する。 R_6 は下式 (V) で示される基の R_7 と合一して単結合を形成している。



(V)

(式 (V) 中、 R_1' はメチル基、 R_3' は水素原子、 R_4' はアセチル基、 R_2' は炭素数 13 のアルキレン基を意味する。)

【 0 0 8 8】

で示される化合物が含まれる他、上記式 (IV) 及び (V) において R_5 で示される脂肪酸残基の鎖長、 R_2 で示される脂肪酸に由来する脂肪族残基の鎖長、及び / 又は R_2' で示される脂肪酸に由来する脂肪族残基の鎖長が上記化合物と異なる化合物が含まれる。具体的には、 R_1 及び R_1' はメチル基、 R_3 及び R_4 並びに R_3' 及び R_4' はいずれもアセチル基、 R_2 及び R_2' は炭素数 9 ~ 17 のアルキレン基または二重結合を 1 ~ 3 有する炭素数 13 ~ 17 のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するかまたは有しない炭素数 12 ~ 20 の脂肪酸残基である化合物が含まれる (以上説明する化合物群を、便宜上「二量型 SL 化合物 - 例 1」と称する)。

【 0 0 8 9】

また、X2 画分には、上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子である SL 化合物；上記化合物において R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて水素原子である SL 化合物；上記化合物において R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて、 R_3 及び R_4 の一方が水素原子であり、他方がアセチル基である SL 化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて水素原子である SL 化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_3 及び R_4 がアセチル基に代えて R_3 及び R_4 の一方が水素原子であり、他方がアセチル基である SL 化合物なども含まれる (以上説明する化合物群を、便宜上「二量型 SL 化合物 - 例 2」と称する)。

【 0 0 9 0】

さらに X2 画分には、上記化合物群 (二量型 SL 化合物 - 例 1 及び例 2) に属する各種

10

20

30

40

50

の化合物において、 R_1 がメチル基に代えて水素原子である化合物；上記化合物において R_3 が水素原子に代えてアセチル基である化合物；上記化合物において R_3 がアセチル基に代えて水素原子である化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_3 が水素原子に代えてアセチル基である化合物；上記化合物において R_1 がメチル基に代えて水素原子であり、 R_4 がアセチル基に代えて水素原子である化合物なども含まれる（以上説明する化合物群を、便宜上「二量型SL化合物 - 例3」と称する）。

【0091】

さらにX2画分には、上記化合物群（二量型SL化合物 - 例1～例3）に属する各種の化合物において、ソホロース環の4"位に対する $-OR_5$ 基の結合に代えて、 $-OR_5$ 基がソホロース環の3'位、4'位、2"位または3"位のいずれか一箇所に結合してなるSL化合物；式(V)中のソホロース環の4"位に対する $-OR_7$ 基の結合に代えて、 $-OR_7$ 基がソホロース環の3'位、4'位、2"位または3"位のいずれか一箇所に結合してなるSL化合物が含まれる。

【0092】

本発明のSL化合物は、後述する実験例に示すように、単量型SL化合物及び二量型SL化合物のいずれも、界面活性能、特に表面張力及び乳化力を有するという特性のほか、従来公知の酸型SL及びラクトン型SLと異なり、苦味を有しないか、若しくは苦味が格段に低減されているという特徴を備えている。

【0093】

(III) 新型ソホロリピッド化合物を含む組成物

本発明が対象とする組成物は、前述する一般式(I)で示される本発明のSL化合物を含むことを特徴とする。但し、当該組成物には、天然物や製造原料であるSL産生酵母の培養物は含まれない。ここでSL化合物は、前述する単量型SL化合物及び二量型SL化合物の総称であり、本発明の組成物には、SL化合物として単量型SL化合物だけを含有するもの、二量型SL化合物だけを含有するもの、および単量型SL化合物と二量型SL化合物の両方を含む組成物が含まれる。

【0094】

本発明の組成物は、上記の本発明SL化合物(I)の特性に基づいて、界面活性能、特に表面張力及び乳化力を有することを特徴とする。好ましくは、本発明の組成物は、少なくとも式(III)で示される単量型SL化合物、及び/又は式(IV)で示される二量型SL化合物を含み、界面活性能、特に表面張力及び乳化力を有するものである。

【0095】

本発明の組成物は、本発明のSL化合物の界面活性能に基づいて界面活性剤として、飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、及びこれらの添加物（例えば、乳化剤、消泡剤、凝固剤、保存料、決着料、安定剤など）に適用することができる。特に本発明のSL化合物は前述するように苦味がないか若しくは格段に低減されているため、飲食品、化粧品、経口・口腔用医薬品、または経口・口腔用医薬部外品等のように、口腔内で使用されるか、経口摂取されるか、または口に入る可能性のある製品に適用することができる。

【0096】

例えば、口に入る可能性のある化粧品などとしては、顔に適用する化粧水、乳液、クリーム、口紅、リップクリーム、洗顔料、クレンジング料、シャンプー、及びコンディショナー等を挙げることができる。また、口腔内で使用される飲食物や医薬品以外のものとしてマウスウォッシュ、洗口液、歯磨き剤、口腔消臭剤等を挙げることができる。

【0097】

本発明の組成物におけるSL化合物の配合割合は、本発明の組成物が界面活性能、特に表面張力及び乳化力を有することを限度として特に制限されず、目的に応じて適宜設定調節される。例えば、組成物の用途に応じてSL化合物の総量として、0.01～100重量%、好ましくは0.05～30重量%の範囲から適宜選択することができる。

【実施例】

【0098】

以下、実施例及び実験例を用いて本発明の構成及び効果をより詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実験例によって制限されるものではない。

【0099】

実施例1 新型ソホロリッド(X1及びX2)の調製及び同定(1) 従来型SL及び新型SL含有物(従来型SL/新型SL含有物)の調製

培養培地として、1L当たり、含水グルコース10g(日本食品化工社製、製品名:日食含水結晶ブドウ糖)、ペプトン10g(オリエンタル酵母社製、製品名:ペプトンCB90M)、酵母エキス5g(アサヒフードアンドヘルスケア社製、製品名:ミーストパウダーN)を含有する液体培地を使用し、30℃で2日間、*Candida bombicola* ATCC 22214を振盪培養し、これを前培養液とした。

10

【0100】

5L容量の発酵槽に仕込んだ本培養培地(3L)に、上記前培養液を仕込み量の4質量%の割合で植菌し、30℃で6日間、通気0.6vvmの条件下で培養し発酵させた。なお、本培養培地として、1L当たり、含水グルコース100g、パームオレイン50g(日油製、製品名:パーマリイ2000)、オレイン酸(ACID CHEM製、製品名:パルマック760)50g、塩化ナトリウム1g、リン酸一カリウム10g、硫酸マグネシウム7水和物10g、酵母エキス2.5g(アサヒフードアンドヘルスケア社製、製品名:ミーストパウダーN)、及び尿素1gを含む培地(滅菌前のpH:pH4.5~4.8)を用いた。

20

【0101】

培養開始から6日目に発酵を停止し、発酵槽から取り出した培養液を50~80℃に加熱してから室温に戻し、2~3日間静置して、下から順に、液状の褐色沈殿物層、主に菌体と思われる乳白色の固形物層、上澄の3層に分離した。上澄を除去した後、工業用水または地下水を、除去した上澄の量と同量添加した。これを攪拌しながら、48質量%の硫酸化ナトリウム水溶液を徐々に加えてpH6.5~6.9とし、培養液中に含まれるSLを可溶化した。これを卓上遠心分離機(ウェストファリア:ウェストファリアセパレーターAG製)で遠心処理(2,400xg、15分、室温(25℃))することにより、乳白色の固形物を沈殿させ、上澄を回収した。回収した上澄を攪拌しながら、これに62.5質量%濃度の硫酸水溶液を徐々に加えてpH2.5~3.0とし、SLを再不溶化した。これを2日間静置後、デカンテーションにより上澄を可能な限り除去し、残留物(約50%含水物)を取得した。これは、後述するように従来型SLと新型SLの両方を含む混合物であり、これを「従来型SL/新型SL含有物」と称する。

30

【0102】

なお、当該「従来型SL/新型SL含有物」には、後述するようにSL総量100質量%あたり従来型SLが60質量%、新型SLが40質量%含まれていた。

【0103】

(2) 従来型SLと新型SLとの分離

上記で取得した「従来型SL/新型SL含有物」600g(約50%含水物)を、下記条件の逆相カラムクロマトグラフィーに供した。

40

固定相:C18カラム(コスモシル40C18-PREP、(株)ナカライテスク製、7.5kg)

移動相:エタノール濃度50~95容量%のエタノール水溶液。

【0104】

具体的には、「従来型SL/新型SL含有物」600g(約50%含水物)に50%エタノール水溶液600gを混合した溶液を、C18カラム(7.5kg)に添加し、これに50%エタノール水溶液10L、次いで80%エタノール水溶液10Lを供することにより、従来型SL(酸型、ラクトン型)を溶出した。次いで90%エタノール水溶液15Lを供することにより、新型SL(X1)を溶出回収し、次いで95%エタノール水溶液15Lを供することで、新型SL(X2)を溶出回収した。

50

【0105】

(3) 新型SL(X1)及び新型SL(X2)の確認

上記カラムクロマトグラフィーによる50%エタノール水溶液溶出画分、80%エタノール水溶液溶出画分、90%エタノール水溶液溶出画分、及び95%エタノール水溶液溶出画分をそれぞれ下記の表記載の条件の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供し、各溶出画分に含まれる物質の溶出挙動を確認した。具体的には、各溶出画分を蒸発乾固させた後にエタノールに溶解し、これを被験試料として下記条件のHPLCに供した。

【0106】

【表1】

(分析条件)

装置	島津製作所 LC-10AD-VP	10
カラム	Inertsil ODS-3 (4.6 mm×250 mm)	
カラム温度	40℃	
移動相	A; 蒸留水、 B; 0.1容量%ギ酸を含むメタノール [グラジエント] 0 → 60 min : (B) 70 → 100 % 60 → 70 min : (B) 100 → 70 %	
流量	1.0 mL/min	20
試料調製	エタノール	
注入量	10 µL	
検出器	島津製作所 蒸発光散乱検出器(ELSD-LT II)	
検出器温度	40℃	
ゲイン	5	
ガス圧力	350 kPa (N ₂ ガス)	30

【0107】

その結果、従来型SL(酸型、ラクトン型)の標準品の保持時間と対比することにより、80%エタノール水溶液溶出画分には従来型SL(酸型、ラクトン型)が含まれており、90%エタノール水溶液溶出画分(以下、「X1画分」ともいう)及び95%エタノール水溶液溶出画分(以下、「X2画分」という)にはいずれも従来型SL(酸型、ラクトン型)が含まれていないことが確認された。また、上記条件のHPLCにおいて、従来型SLのうち酸型SL及びラクトン型SLは、それぞれ保持時間10~25分及び25~40分の領域に溶出する。一方、90%エタノール水溶液溶出画分(X1画分)及び95%エタノール水溶液溶出画分(X2画分)は、上記条件のHPLCにおいて、それぞれ保持時間45~60分領域及び60~70分領域にピークを有する物質が含まれていることが確認された。

【0108】

なお、従来型SL(酸型、ラクトン型)、X1画分、及びX2画分の溶出挙動を比較するために、80%エタノール水溶液溶出画分(従来型SL(酸型、ラクトン型)を含む)、90%エタノール水溶液溶出画分(X1画分)及び95%エタノール水溶液溶出画分(X2画分)を混合したものを上記条件のHPLCに供した結果(クロマトグラム)を図1に示す。

【0109】

これらのことから、90%エタノール水溶液溶出画分及び95%エタノール水溶液溶出画分に含まれている物質は、いずれも80%エタノール水溶液で溶出する従来型SL(酸

型、ラクトン型)とは異なる物質であり、且つ従来型SLよりも、より疎水的な化合物であることが判明した。

【0110】

またこのHPLC分析(ピーク面積比)から、(1)で取得した「従来型SL/新型SL含有物」には、SL総量100質量%あたり、従来型SLの酸型SLが17.5質量%、従来型SLのラクトン型SLが42.5質量%、新型SL(X1)が19.5質量%、新型SL(X2)が20.5質量%の割合で含まれていることが確認された。

【0111】

(4) 新型SL(X1及びX2)の同定

上記90%エタノール水溶液溶出画分(X1画分)に含まれる化合物及び95%エタノール水溶液溶出画分(X2画分)に含まれる化合物の構造決定は、以下のように行った。

【0112】

(4-1) FTIR

被験試料として、X1画分とX2画分をそれぞれ凍結乾燥したものを使用した。赤外吸収スペクトルについては、フーリエ変換赤外分光分析装置SpectrumTM100(パーキンエルマージャパン製)を使用し、ATR法で分析した。得られた赤外吸収スペクトルを、従来型SL(酸型SL、ラクトン型SL)の分析結果と併せて、図2に示す。なお、ここで酸型SLは前述する式(VI)においてR₃及びR₄がいずれも水素原子であるものを、ラクトン型SLは前述する式(VII)においてR₃及びR₃がいずれもアセチル基であるものを使用した。

【0113】

図2中、上から順に、X1画分、X2画分、酸型SL、及びラクトン型SLの赤外吸収スペクトルを示す。図2に示すように、いずれも、3340cm⁻¹(符号1:OH伸縮)、2920cm⁻¹、2850cm⁻¹(符号2:-CH₂,メチレン鎖由来)、1740cm⁻¹(符号3:C=O,カルボン酸由来)、1240cm⁻¹(符号4:C=O,アセチル基由来のカルボニル)、1040cm⁻¹(符号5:C-O-H,糖由来)のピークが検出された。このことから、X1画分及びX2画分に含まれる化合物は、従来型SLと類似するSL様構造を有する化合物であることが予想された。

【0114】

(4-2) ガスクロマトグラフィー(GC)

X1画分とX2画分の混合物(114.9mg)にメタノール/塩酸(メタノール(10.4mL)と濃塩酸(1.7mL)の混合物)12.1mLを加え、還流条件下、80℃、3時間加熱した。室温まで冷却後、水(20mL)、及びクロロホルム/メタノール(2:1,容量比)(20mL)を加えた。十分に混合後、遠心分離を行い、有機層を回収した。残った水層を再度、クロロホルム/メタノール(2:1,容量比)(20mL)で抽出して有機層を回収して先に回収した有機層と混合した。さらに残った水層をヘキサン/酢酸エチル(1:1,容量比)(20mL)で抽出して有機層を回収し、これを先に回収した有機層と混合した。

【0115】

斯くして回収した有機層をエバポレーターに供して有機溶媒を除去し、残渣(脂質)を回収した。回収した脂質(8µl)に0.5mL(トルエン:ヘキサン:メタノール=4:1:1,容量比)と20mLトリメチルシリルジアゾメタン(2Mジエチルエーテル溶液)を混合した。室温で10分間反応後、下記条件のGCに供した。

【0116】

[GC条件]

装置:Agilent Technologies 6890N

カラム:DB-23(0.25mm×30m,Agilent Technologies)

検出器:FID(245)

10

20

30

40

50

注入口温度：250

昇温条件：150，0.5 min

150 - 170，4 /min

170 - 195，5 /min

195 - 215，10 /min

215，11 min

スプリット比：50：1。

【0117】

GCの結果をもとに算出した、X1画分とX2画分との混合物に含まれる化合物の脂肪酸組成を表2に示す。表に記載する「脂肪酸組成」の表記において、「：」の前の数値は脂肪酸の炭素数を、後ろの数値は二重結合の数を意味する。また表中、「17OH」は式(I)のR₁がメチル基であることを意味し、「18OH」は式(I)のR₁が水素原子であることを意味する。

10

【0118】

【表2】

脂肪酸組成	質量 (%)
12：0	0.4
14：0	0.4
16：0	1.8
18：0	1.0
18：1	7.2
18：2	2.8
16：0 (17OH)	11.8
16：0 (18OH)	11.3
18：0 (17OH)	7.8
18：1 (17OH)	44.5
18：2 (17OH)	1.9
18：1 (18OH)	5.7
20：0 (17OH)	3.4

20

30

【0119】

この結果から、X1画分とX2画分との混合物には、炭素数12～20の飽和脂肪酸残基（例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、またはアラキジン酸の残基）、及び1または2の不飽和基を有する炭素数18の不飽和脂肪酸残基（例えば、オレイン酸残基またはリノール酸残基）を含む化合物が含まれていることが確認された。なかでも1つの不飽和基を有する炭素数18の不飽和脂肪酸残基（オレイン酸残基）を有する化合物（式(I)中、R₁はメチル基）が高い割合で含まれていることがわかる。

40

【0120】

(4-3) 各種NMR (¹³C-NMR及び¹H-NMR)

X1画分及びX2画分から、それぞれ一番ピーク面積の大きかったピーク26（保持時間54分）及びピーク36（保持時間64分）（図1参照）を分取した（前者を「新型SL（X1-26）」、後者を「新型SL（X2-36）」と称する。）。これらをそれぞれNMR装置（JNMEX-270（日本電子））に供し、¹H-NMR及び¹³C-NMR分析を行った。なお、溶媒としてCD₃ODを使用した。

【0121】

新型SL（X1-26）の¹H-NMR及び¹³C-NMRの結果を図3（A）及び（B）

50

)に、新型SL(X2-36)の ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRの結果を図5(A)及び(B)に、それぞれ示す。また、図4に新型SL(X1-26)の2次元NMRスペクトル(図4(A):HMQC、図4(B):HMBC)を、図6に、新型SL(X2-36)の2次元NMRスペクトル(図6(A):HMQC、図6(B):HMBC)を示す。

【0122】

これらの結果を纏めたものを下記表3及び表4に示す。

【0123】

【表3】

	新型SL(X1-26)	
	^{13}C -NMR	^1H -NMR
ソホロース		
C-1'	102.4	4.4
C-2'	82.7	3.1
C-3'	71.2	3.2
C-4'	70.9	3.4
C-5'	77.8	3.3
C-6'	62.7	4.1
C-1''	104.7	4.5
C-2''	74.9	3.3
C-3''	77.4	3.4
C-4''	71.4	4.8
C-5''	77.6	3.5
C-6''	64.8	4.3
アセチルグループ		
-C=O (C-6', 6'')	172.4	—
-CH ₃ (C-6', 6'')	20.4, 20.7	1.2
アシルグループ		
-C=O (C-1)	175.2, 177.5	—
-CO-CH ₂ (C-2)	35.6	2.2
-CO-CH ₂ CH ₂ (C-3)	23.7	1.5
-(CH ₂) _n -	23.6-30.8	1.2-1.4
-CH=CH-CH ₂	28.1	1.9
-CH=CH	130.8, 130.9	5.2
-OCH(CH ₃)-CH ₂ (C-16)	37.8	1.5
-OCH(CH ₃) (C-17)	78.3	3.6
-CH ₃ (C-18)	21.8	1.1

【0124】

10

20

30

40

【表 4】

	新型SL (X2-36)	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
ソホロース		
C-1'	102.6	4.4
C-2'	82.7	3.1
C-3'	71.2	3.2
C-4'	70.8	3.4
C-5'	77.7	3.3
C-6'	62.6	4.1
C-1''	104.7	4.5
C-2''	74.9	3.3
C-3''	77.4	3.4
C-4''	71.2	4.8
C-5''	77.6	3.5
C-6''	63.2	4.3
アセチルグループ		
-C=O (C-6', 6'')	172.6	—
-CH ₃ (C-6', 6'')	20.8, 21.0	1.2
アシルグループ		
-C=O (C-1)	174.3, 174.7	—
-CO-CH ₂ (C-2)	34.7	2.2
-CO-CH ₂ CH ₂ (C-3)	23.7	1.5
-(CH ₂) _n -	23.6-30.8	1.2-1.4
-CH=CH-CH ₂	26.1	1.9
-CH=CH	130.8, 130.9	5.2
-OCH(CH ₃)-CH ₂ (C-16)	37.8	1.5
-OCH(CH ₃) (C-17)	75.8	3.6
-CH ₃ (C-18)	21.7	1.1

【0125】

(4-4) DEPT135、HMQC、及びHMBC

新型SL (X1-26) 及び新型SL (X2-36) のそれぞれを、DEPT135スペクトル解析に供した。その結果を、それぞれ図7(A) 及び(B) に示す。図からわかるように、糖骨格のC6' 及びC6'' は、それぞれ64.7 ppm 及び64.9 ppm であることが確認された(図7(A) 及び(B) 中、丸で囲った部分)。HMBC(図4(B)、図6(B)) との相関により、式(I) で示される化合物のC6' 位及びC6'' 位にはアセチル基が結合していることが確認された。但し、新型SL (X2-36) のC6'' にはプロトンが結合している。このことから、新型SL (X1-26) のソホロース環のC6' 及びC6'' にはアセチル基がエステル結合しており、新型SL (X2-36) のソホロース環のC6'' にはOH基が、またC6' にはアセチル基がエステル結合していることが判明した。

【0126】

10

20

30

40

50

(4-5) MS / MS 分析

MS (ⁿ) 分析 (ポジティブモード) をすることで、新型 SL (X1-26) 及び新型 SL (X2-36) それぞれの分解産物を確認した。新型 SL (X1-26) 及び新型 SL (X2-36) のマススペクトルをそれぞれ図 8 (A) 及び (B) に示す。

【0127】

図 8 (A) から、新型 SL (X1-26) は、親イオン (M) から [- 280 , C181] の分子量の化合物が分解した娘イオン (A) m/z 729 が検出された。この娘イオンは、従来型 SL (酸型 SL) (但し、アセチル基を 2 つ有する) と完全に一致し、当該従来型 SL (酸型 SL) にヒドロキシオレイン酸 (C18 1) が結合していることがわかった。

10

【0128】

また図 8 (B) から、新型 SL (X2-36) は親イオン (M') から [- 661 , 酸型 SL (C16 , Ac1)] および [- 280 , C18 1] の分子量の化合物が分解した娘イオン (B) および (C) が検出された。娘イオン (B) は新型 SL (X1-26) の分子量と一致した。このことから、新型 SL (X2-36) は、新型 SL (X1-26) に従来型 SL (酸型 SL) (但し、アセチル基を 1 つ有する) が結合した構造であることが推定された。娘イオン (C) をさらに分解すると、従来型 SL (酸型 SL) の擬似分子量と同じ値が得られた。

【0129】

(4-6) 加水分解

X1 画分と X2 画分の混合物 (0.1 g) に 48 質量%水酸化ナトリウムを 20 μL 添加し、蒸留水 1.88 mL 加え、80 で 2 時間加熱した。室温まで冷却後、ヘキサン 3 mL を加えた。十分に混合後、遠心分離を行い、ヘキサン層を回収し、脂肪酸類を除去した。なお、この操作 (ヘキサン抽出) を 3 回繰り返した。脂肪酸類を除去した水層は、HPLC 分析に供した。その結果、従来の酸型 SL (但し、アセチル基を持たない) のピークが検出されたため、一般式 (I) 中、R₅ で示される脂肪酸残基はソホロース環にエステル結合によって結合していることが確認された。

20

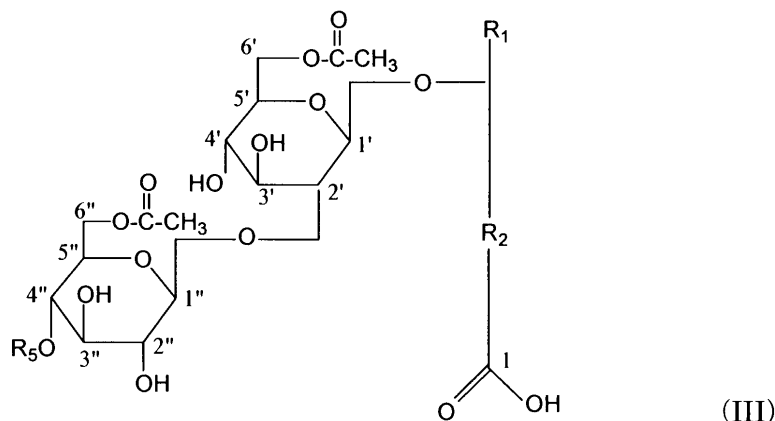
【0130】

以上 (4-1) ~ (4-6) の結果から、新型 SL (X1-26) は、下式 (III) で示されるように、公知の酸型 SL の基本骨格を有するとともに、ソホロース環の C4'' 位に、ヒドロキシ基を有する炭素数 18 の一価の不飽和脂肪酸であるヒドロキシオレイン酸残基がエステル結合によって結合していることが確認された。また C6' 位及び C6'' 位のプロトンとアセチル基由来のカルボニルがカップリングしていることから、ソホロース環の C6' 位と 6'' 位の両方に、酸素原子を介して、アセチル基が結合していることが確認された。なお、このアセチル基は加水分解されやすいため、経時的に分解され、水素原子になる。

30

【0131】

【化15】



40

【0132】

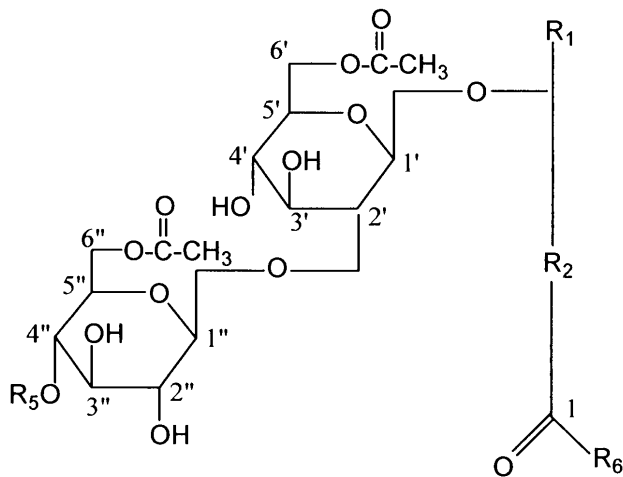
50

(式(III)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を意味する。)

また、新型SL(X2-36)は、下式(IV)で示されるように、公知の酸型SLの基本骨格を有するとともに、ソホロース環のC4'位に、ヒドロキシ基を有する炭素数18の一価の不飽和脂肪酸であるヒドロキシオレイン酸残基がエステル結合によって結合していることが確認された。またC6'位及びC6''位のプロトンとアセチル基由来のカルボニルがカップリングしていることから、ソホロース環のC6'位と6''位の両方に、酸素原子を介して、アセチル基が結合していることが確認された。なお、新型SL(X1-26)と同様に、このアセチル基は加水分解されやすいため、経時的に分解され、水素原子になる。さらに、新型SL(X2-36)はC-1位に下式(V)で示される酸型SLを結合してなる2量体であることが確認された。

【0133】

【化16】



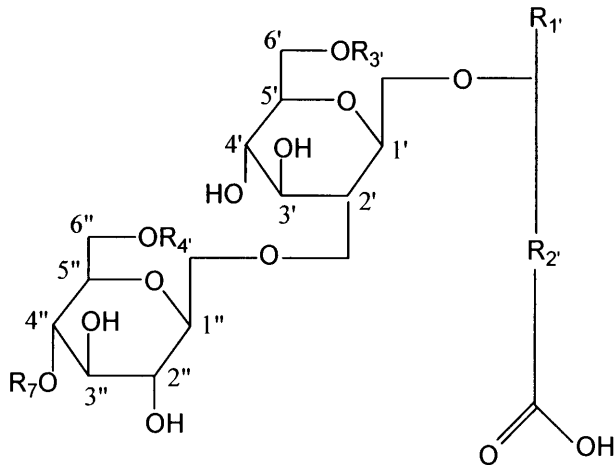
(IV)

【0134】

(式(IV)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数15のアルケニレン基、 R_5 はヒドロキシ基を有するオレイン酸残基を意味する。また、 R_6 は、下式(V)で示される R_7 と合一して単結合を形成している。)

【0135】

【化17】



(V)

【0136】

(式(V)中、 R_1 はメチル基、 R_2 は炭素数13のアルキレン基、 R_3 は水素原子、 R_4 はアセチル基を意味する。)

10

20

30

40

50

【0137】

(4-7) MALDI TOFMS 分析

X1画分及びX2画分のそれぞれを、下記条件でMALDI TOFMS分析を行い、分子量を確認した。

装置：AXIMA Confidence (Shimadzu Co.)

Mode：Linear (positive)

マトリックス：DHBA。

【0138】

X1画分及びX2画分のそれぞれの結果を図9(A)及び(B)に示す。この結果から分子量を算出し、それから結合しているアセチル基の数を確認した。結果を表5及び表6に示す。

10

【0139】

【表5】

X1画分

検出されたピーク	R ₅ の炭素数	R ₂ の炭素数	アセチル基の数 (R ₃ またはR ₄)
899	C16	C13	1
925	C16	C15△1	1
927	C16	C15	1
941	C18△1	C13	1
943	C16	C15	1
957	C14	C15	2
966	C18△2	C15	1
967	C18△1	C15△1	1
969	C18	C13	2
981	C16	C15△2	2
983	C16	C15△1	2
999	C18	C15	2
1009	C18△1	C15△1	2
1023	C20	C15△1	2
1025	C20	C15	2

20

30

【0140】

これから、X1画分には、式(III)で示される化合物(X1-26)(検出ピーク1009)のほか、上記の基を有する14種類のSL構造の化合物が含まれていることが確認された。つまり、上記表に示すように、これらの14種類の化合物は、従来の酸型SLのソホロース環の2"位、3"位、4"位、3'位、及び4'位のいずれか一カ所に、ヒドロキシ基を有することのある炭素数16~20の飽和又は不飽和脂肪酸残基がエステル結合によって結合した構造を有していると推定される。

40

【0141】

【表 6】

X 2 画分

検出されたピーク	R ₅ の炭素数	R ₂ の炭素数	R ₂ 'の炭素数	アセチル基の数 (R ₄ , R ₅ , R ₄ ', R ₅ ')
1 5 8 7	C 1 4	C 1 5	C 1 5 / 1	4
1 5 8 9	C 1 2	C 1 5 / 2	C 1 3	4
1 6 0 3	C 1 6	C 1 3	C 1 3 / 1	3
1 6 0 5	C 1 6	C 1 3	C 1 5	3
1 6 2 9	C 1 8 / 1	C 1 5 / 1	C 1 3	3
1 6 3 0	C 1 8 / 1	C 1 5	C 1 3	3
1 6 4 5	C 1 4	C 1 5	C 1 5 / 1	4
1 6 4 7	C 1 6	C 1 3	C 1 5	4
1 6 7 1	C 1 8 / 1	C 1 5 / 1	C 1 3	3
1 6 7 2	C 1 6	C 1 3	C 1 5 / 1	4
1 6 8 8	C 1 8	C 1 5	C 1 5	4
1 7 1 3	C 2 0	C 1 5	C 1 5 / 1	4
1 7 1 5	C 2 0	C 1 5	C 1 5	4
1 7 2 5	C 2 0	C 1 5 / 2	C 1 5 / 1	4
1 7 2 6	C 2 0	C 1 5 / 1	C 1 5 / 1	4
1 7 2 8	C 2 0	C 1 5	C 1 5 / 1	4

10

20

【 0 1 4 2 】

これから、X 2 画分には、式 (I V) で示される化合物 (X 2 -36) (検出ピーク1671) のほか、上記の基を有する 1 5 種類の S L 構造の化合物が含まれていることが確認された。つまり、上記表に示すように、これらの 1 5 種類の化合物は、従来の酸型 S L のソホロース環の 2 "位、3 "位、4 "位、3 '位、及び 4 '位のいずれか一カ所に、ヒドロキシ基を有することのある炭素数 1 2 ~ 2 0 の飽和又は不飽和脂肪酸残基がエステル結合によって結合した構造を有し、且つ式 (I) で示される R₆基が、式 (I I) で示されるソホロース環 4 "位に、酸素原子を介して結合している R₇と一緒に単結合を形成している 2 量体であると推定される。なお、式 (I I) で示される R₂'として、炭素数 1 3 ~ 1 5 のアルキレン基、または 1 ~ 2 つの二重結合を有する炭素数 1 5 のアルケニレン基を挙げることができる。言い換えると、X 2 画分に含まれる化合物は、式 (I) で示される化合物の C 1 位と従来公知の酸型 S L (R₂'が C 1 6、C 1 8、C 1 8 - 1、C 1 8 - 2) の 4 "位とが、エステル結合によって結合してなる二量体である。

30

【 0 1 4 3 】

(4-8) E S I - M S 分析

X 1 画分及び X 2 画分を構成する分子(ユニット)を確認するために、下記の条件で M S (ⁿ) 分析を行った。

40

【 0 1 4 4 】

【表 7】

MS分析条件

装置	LCQDECA (サーモクエスト)
イオン化モード	ESI (+, -)
キャピラリ温度	310℃
シースガス量	80ユニット
スプレー電圧	5 kV

10

【0145】

X1画分及びX2画分のマスペクトルを図10(A)及び(B)に示す。結果からX1画分及びX2画分にそれぞれ含まれる化合物の分子量を算出した。それを表8に示す。これからわかるように、ESIMSにおいても、MALDI-TOFMSで得られた結果と同等の分子量が得られた。

【0146】

【表 8】

X1画分及びX2画分に含まれる化合物の分子量(例)

溶出時間(分)	X1	X2
ポジティブモード	925, 967, 1009	1671, 1714
ネガティブモード	901, 943, 985	1647, 1689
分子量	902, 944, 986	1648, 1690

20

【0147】

実験例1 界面活性の確認

上記で同定した単量型SL化合物(X1画分)と二量型SL化合物(X2画分)のそれぞれについて、表面張力と乳化力の両面から界面活性性能を評価した。

【0148】

(1) 表面張力

単量型SL化合物と二量型SL化合物のそれぞれを0.1質量%の水溶液に調製し、Wilhelmy法(20, pH7)を用いて最低表面張力(mN/m)を測定した。比較対照のため、既に界面活性剤として知られている従来型SL(酸型SL)の最低表面張力も併せて測定した。

なお、従来型SL(酸型SL)は、式(VI)で示す化学式において、R₁がメチル基、R₂が炭素数15のアルケニレン基、R₃及びR₄がアセチル基である構造を有する化合物である(以下の実験例2も同じ)。

結果を表9示す。この結果からわかるように、単量型SL化合物と二量型SL化合物のいずれも従来型SL(酸型SL)と同等の表面張力を有していた。

40

【0149】

【表 9】

	最低表面張力 (mN/m)
従来型SL(酸型SL)	40.2
単量型SL化合物	39.9
二量型SL化合物	39.1

50

【 0 1 5 0 】

(2) 乳化力

蒸留水に単量型 S L 化合物または二量型 S L 化合物をそれぞれ加え、水酸化ナトリウムで pH 7 に調整し (単量型 S L 化合物または二量型 S L 化合物の終濃度 2 質量 %)、8 0 に加温した。この試料 3 g とオリーブスクワラン 3 g を 1 5 m L 容量の遠沈管に入れ、8 0 で 1 0 分間加温した後、ボルテックスで 1 分間攪拌した。室温にて一定時間ごとに分離した水の容量を目視で記録した。次式より水の分離率を求めて乳化力を評価した (n = 2)。比較対照のため、既に界面活性剤として知られている従来型 S L (酸型 S L) の乳化力も同様にして測定した。結果を表 1 0 に示す。この結果からわかるように、単量型 S L 化合物と二量型 S L 化合物のいずれも従来型 S L (酸型 S L) と同等の乳化力を有していた。

10

【 0 1 5 1 】

【 数 1 】

$$\text{水の分離率(\%)} = \frac{\text{分離した水の量}}{\text{使用した水の量}} \times 100$$

【 0 1 5 2 】

【 表 1 0 】

時間	1	3	6	2 4	4 8
従来型 S L (酸型 S L)	5 5	5 4	5 4	5 4	5 4
単量型 S L 化合物	5 4	5 4	5 4	5 4	5 4
二量型 S L 化合物	5 4	5 4	5 4	5 4	5 4

20

単位 (%)

【 0 1 5 3 】

これらの結果から、単量型 S L 化合物および二量型 S L 化合物はいずれも従来の酸型 S L と同程度の界面活性能 (表面張力、乳化力) を有していることが確認された。

実験例 2 官能評価 (苦味) その 1

2 0 名の健常被験者 (パネラー) を対象に、従来型 S L (酸型 S L、ラクトン型 S L)、単量型 S L 化合物、及び二量型 S L 化合物の苦味強度を測定した。各被験試料は、水に溶解して 0 . 5 質量 % 濃度の水溶液 (pH 7) として調整した。具体的には、各パネラーに、各被験試料の味を、基準物質の各種濃度の水溶液の味と比較してもらい、苦味の程度が同じである基準物質水溶液 (濃度) を選択してもらった。なお、苦味の基準物質には、「 L - トリプトファン (協和発酵工業株式会社、Lot No. S860281) 」を用い、低濃度水溶液として 0 . 0 5 ~ 0 . 2 5 質量 % の水溶液を、また高濃度水溶液として 0 . 5 ~ 1 . 0 質量 % の水溶液を調整した。

30

なお、従来型 S L (ラクトン型 S L) は、式 (VII) で示す化学式において、R₁ がメチル基、R₂ が炭素数 1 5 のアルケニレン基、R₃ 及び R₄ がアセチル基である構造を有する化合物である。

40

【 0 1 5 4 】

結果を下記表 1 1 ~ 1 4 に示す。

【 0 1 5 5 】

【表 1 1】

単量型SL化合物 (X 1画分)

基準物質濃度 (%)	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	平均点*
回答者 (人)	0	8	7	5	0	0	0.093

平均点の算出

$$(0 \times 0 + 0.05 \times 8 + 0.1 \times 7 + 0.15 \times 5 + 0.2 \times 0 + 0.25 \times 0) / 20 = 0.093$$

10

【0156】

【表 1 2】

二量型SL化合物 (X 2画分)

基準物質濃度 (%)	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	平均点*
回答者 (人)	0	9	7	4	0	0	0.088

平均点の算出

$$(0 \times 0 + 0.05 \times 9 + 0.1 \times 7 + 0.15 \times 4 + 0.2 \times 0 + 0.25 \times 0) / 20 = 0.088$$

20

【0157】

【表 1 3】

従来型SL (ラクトン型SL)

基準物質濃度 (%)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	平均点*
回答者 (人)	9	8	2	1	0	0	0.575

平均点の算出

$$(0.5 \times 9 + 0.6 \times 8 + 0.7 \times 2 + 0.8 \times 1 + 0.9 \times 0 + 1 \times 0) / 20 = 0.575$$

30

【0158】

【表 1 4】

従来型SL (酸型SL)

基準物質濃度 (%)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	平均点*
回答者 (人)	0	2	6	5	7	0	0.785

平均点の算出

$$(0.5 \times 0 + 0.6 \times 2 + 0.7 \times 6 + 0.8 \times 5 + 0.9 \times 7 + 1 \times 0) / 20 = 0.785$$

40

【0159】

この結果からわかるように、従来型SLは、酸型SLもラクトン型SLもいずれもその0.5質量%濃度の水溶液(pH7)は、0.785質量%のL-トリプトファン水溶液と同程度の苦味を有しているのに対して、単量型SL化合物または二量型SL化合物の0.5質量%濃度の水溶液(pH7)の苦味は、それぞれ0.093質量%及び0.088質量%のL-トリプトファン水溶液と同程度であった。このことから、単量型SL化合物または二量型SL化合物は、従来型SLと比較して8~10倍程度苦味が低減されていることが判明した。

50

【 0 1 6 0 】

実験例 3 官能評価 (苦味) その 2

下記処方に従って、各種製品を製造し、官能試験により苦味の有無を評価した。

【 0 1 6 1 】

処方例 1 クッキー

【 0 1 6 2 】

【表 1 5】

材料	質 量%
SL 〔従来型 SL (酸型 SL) 、単量型 SL 化合物、または二量型 SL 化合物〕	1. 0
薄力粉	52. 1
サラダ油	20. 8
砂糖	20. 8
水	5. 2

10

【 0 1 6 3 】

上記処方に従って材料を混合し、クッキーの形に成型した後に、180 で13分間焼成してクッキーを製造した。これをパネラーに試食してもらい、SLを添加しないで製造したクッキー (コントロール) と比較して、苦味の有無を評価してもらった。その結果、SLとして従来型SL (酸型SL) を配合したクッキーは苦味を強く発現していたのに対して、本発明のSL化合物を配合したクッキーは、単量型SL化合物及び二量型SL化合物のいずれの場合も苦味がなく、単量型SL化合物及び二量型SL化合物はいずれも食品の味に影響しないことが確認された。

20

【 0 1 6 4 】

処方例 2 化粧品 (リップクリーム) pH 6

【 0 1 6 5 】

【表 1 6】

原料	質 量%
ミツロウ	30
シア脂	20
イソステアリン酸ポリグリセリル-2/ダイマージリノール酸)コポリマー	10
オリーブスクワラン	28
グリセリン	5
水	5. 8
SL 〔従来型 SL (酸型 SL) 、単量型 SL 化合物、または二量型 SL 化合物〕	0. 5
クエン酸Na	0. 5
クエン酸	0. 2

30

40

【 0 1 6 6 】

上記処方に基づいて、定法に従って水性成分及び油性成分をそれぞれ80~90 に加温したものを混合攪拌し、次いで室温に戻すことでリップクリームを製造した。これをパネラーの唇に塗ってもらい、SLを添加しないで製造したリップクリーム (コントロール

50

)と比較して、唇を舐めた時の舌先に感じる苦味の有無を評価してもらった。その結果、SLとして従来型SL(酸型SL)を配合したリップクリームは苦味を強く発現していたのに対して、本発明のSL化合物を配合したリップクリームは、単量型SL化合物及び二量型SL化合物のいずれの場合も苦味がなく、単量型SL化合物及び二量型SL化合物はいずれも製品(リップクリーム)の呈味に影響しないことが確認された。

【0167】

処方例3 化粧水(pH4およびpH9)

【0168】

【表17】

原料	質量%
BG	7
SL 〔従来型SL(酸型SL)、単量型SL化合物又は二量型SL化合物〕	0.5
グリセリン	5
キサントガム	0.1
1,2-ヘキサンジオール	1
pH調整剤(水酸化カリウム)	適量用いて pH4または9に調整
水	残量

10

20

【0169】

上記処方に従って、各成分を混合してpH4及び9の化粧水をそれぞれ製造した。これをパネラーの肌(唇を含む)に塗布してもらい、SLを添加しないで製造した化粧水(コントロール)と比較して、唇を舐めた時の舌先に感じる苦味の有無を評価してもらった。その結果、SLとして従来型(酸型SL)を配合した化粧水は苦味を強く発現していたのに対して、本発明のSL化合物を配合した化粧水は、単量型SL化合物及び二量型SL化合物のいずれの場合も苦味がなく、単量型SL化合物及び二量型SL化合物はいずれも製品(化粧水)の呈味に影響しないことが確認された。

30

【0170】

処方例4 乳液(pH3~9)

【0171】

【表18】

原料	質量%
単量型SL化合物または二量型SL化合物	5
グリセリン	5
カルボマー	0.3
フェノキシエタノール	0.95
スクワラン	3
pH調整剤(水酸化カリウム)	適量用いてpH3~9に調整
水	残量

40

【0172】

上記処方に従って材料を定法に従って混合し、苦味のない乳液を調製した。

50

【 0 1 7 3 】

処方例 5 外用クリーム (pH 3 ~ 9)

【 0 1 7 4 】

【表 1 9】

原料	質量%
単量型 S L 化合物または二量型 S L 化合物	1 0
グリセリン	5
カルボマー	0. 5
フェノキシエタノール	0. 9 5
スクワラン	5
セタノール	2
p H 調整剤 (水酸化カリウム)	適量用いて p H 3 ~ 9 に調整
水	残量

10

【 0 1 7 5 】

上記処方に従って材料を定法に従って混合し、苦味のない外用クリームを調製した。

20

【 0 1 7 6 】

処方例 6 液体洗顔剤 (pH 3 ~ 9)

【 0 1 7 7 】

【表 2 0】

原料	質量%
単量型 S L 化合物または二量型 S L 化合物	3 0
グリセリン	1 0
フェノキシエタノール	0. 9 5
p H 調整剤 (水酸化カリウム)	適量用いて p H 3 ~ 9 に調整
水	残量

30

【 0 1 7 8 】

上記処方に従って材料を定法に従って混合し、苦味のない洗顔剤を調製した。

【 0 1 7 9 】

処方例 7 液体クレンジング (pH 3 ~ 9)

【 0 1 8 0 】

【表 2 1】

原料	質量%
単量型 S L 化合物または二量型 S L 化合物	1 0
グリセリン	1 0
フェノキシエタノール	0. 9 5
p H 調整剤 (水酸化カリウム)	適量用いて p H 3 ~ 9 に調整
水	残量

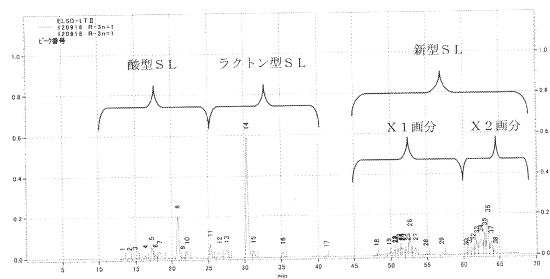
40

50

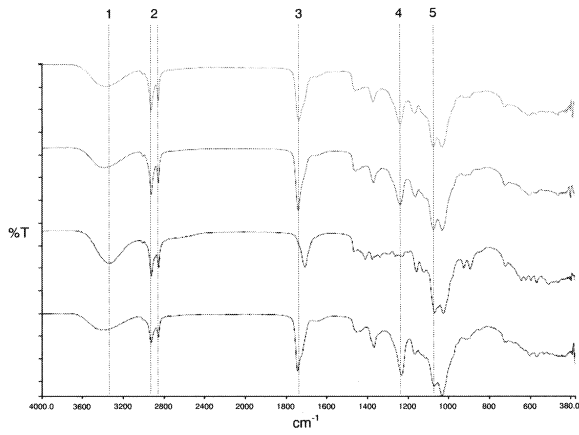
【 0 1 8 1 】

上記処方に従って材料を定法に従って混合し、苦味のない液体クレンジングを調製した。

【 図 1 】



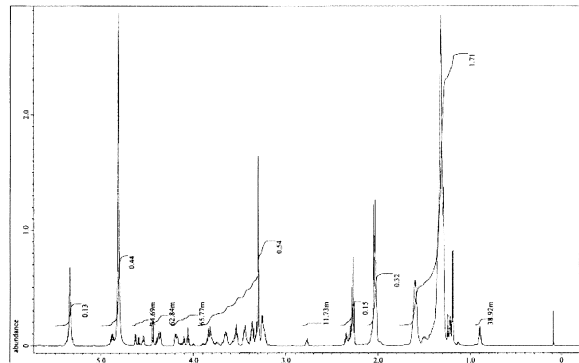
【 図 2 】



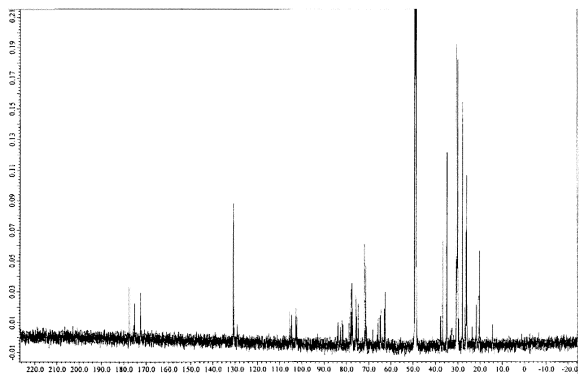
【 図 3 】

新型SL (X1-26)

(A) ¹H-NMR



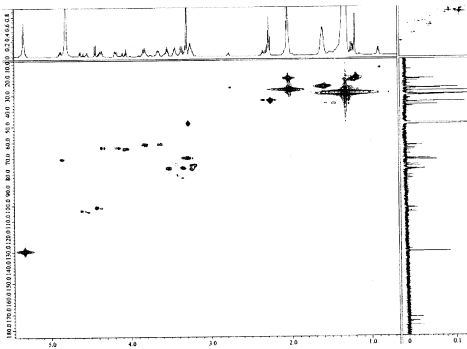
(B) ¹³C-NMR



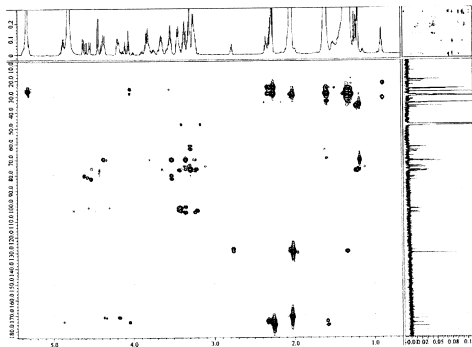
【 図 4 】

新型 S L (X 1 - 26)

(A) HMQC



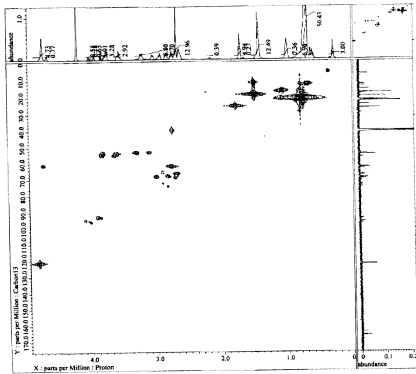
(B) HMBC



【 図 6 】

新型 S L (X 2 - 36)

(A) HMQC



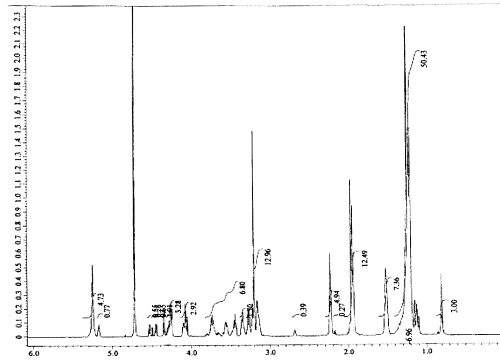
(B) HMBC



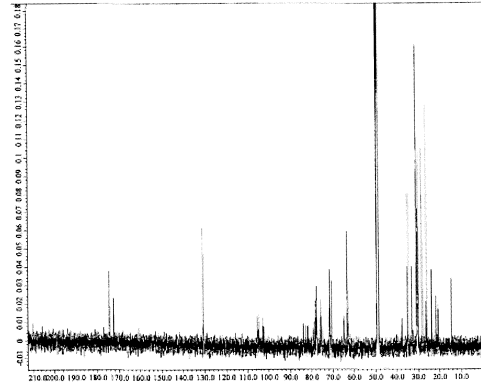
【 図 5 】

新型 S L (X 2 - 36)

(A) 1H-NMR



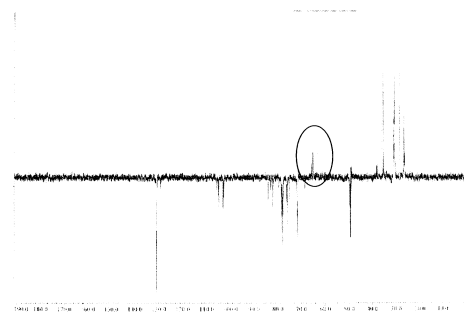
(B) 13C-NMR



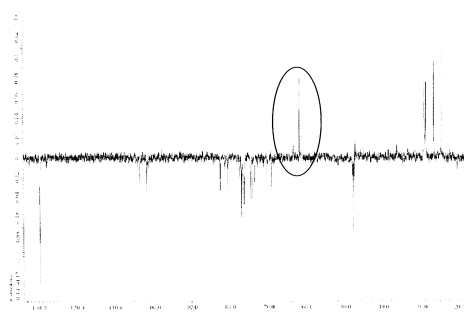
【 図 7 】

DEPT 135

(A) 新型 S L (X 1 - 26)

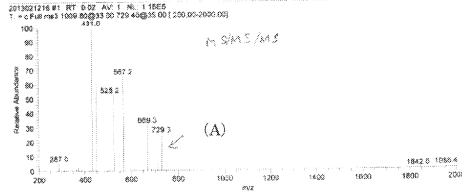
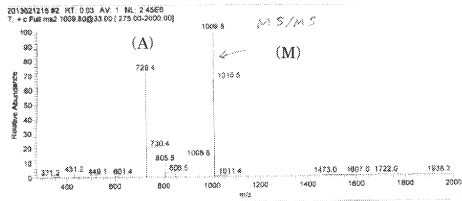


(B) 新型 S L (X 2 - 36)

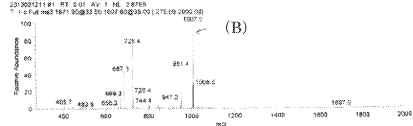
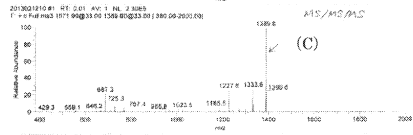
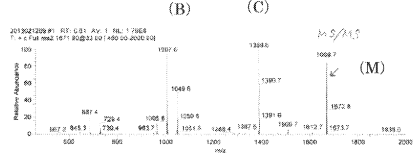


【 8 】

(A) 新型 S L (X 1 - 26)

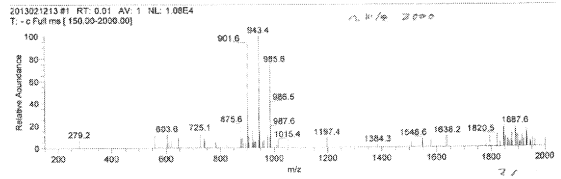
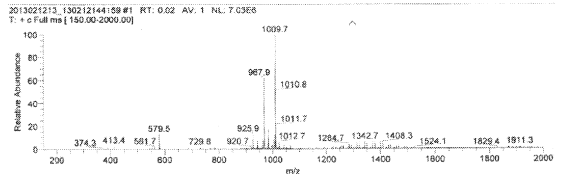


(B) 新型 S L (X 2 - 36)

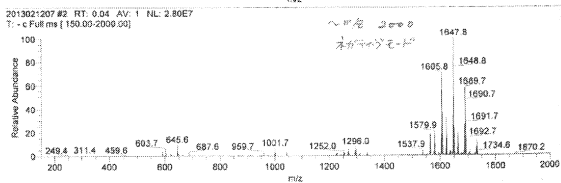
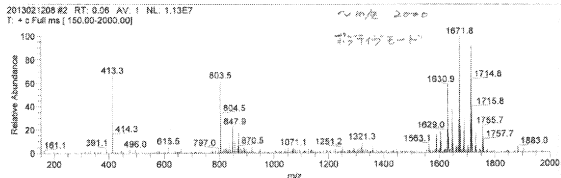


【 9 】

(A) X 1 画分

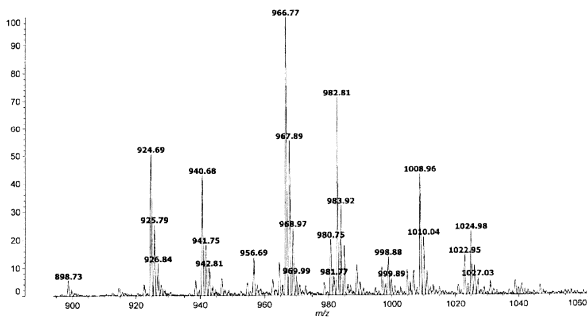


(B) X 2 画分

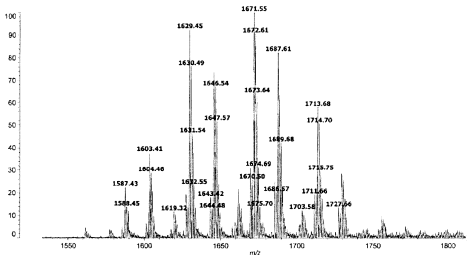


【 10 】

(A) X 1 画分



(B) X 2 画分



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 2 1 D	2/18	(2006.01)	A 2 1 D	2/18	
C 0 7 H	15/04	(2006.01)	C 0 7 H	15/04	C S P F
C 0 7 H	15/06	(2006.01)	C 0 7 H	15/06	
A 6 1 K	8/60	(2006.01)	A 6 1 K	8/60	
C 0 7 H	15/10	(2006.01)	C 0 7 H	15/10	
A 6 1 Q	1/04	(2006.01)	A 6 1 Q	1/04	
A 6 1 Q	19/10	(2006.01)	A 6 1 Q	19/10	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	

(56)参考文献 特開平07 - 118284 (JP, A)

VAN BOGAERT, I.N. et al., Microbial production and application of sophorolipids., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007年 8月, Vol.76, No.1, pp.23-34

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P

A 2 1 D

A 2 3 L

C 0 7 H

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S

(S T N)