

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-135218

(P2012-135218A)

(43) 公開日 平成24年7月19日(2012.7.19)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 P 17/02 (2006.01)		C 1 2 P	17/02	4 B 0 1 8
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N	1/20	A 4 B 0 6 4
A 2 3 L 1/30 (2006.01)		A 2 3 L	1/30	B 4 B 0 6 5
C O 7 D 311/04 (2006.01)		C O 7 D	311/04	4 C 0 6 2

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2010-287913 (P2010-287913)	(71) 出願人	000002901
(22) 出願日	平成22年12月24日 (2010.12.24)		株式会社ダイセル
			大阪府大阪市北区梅田三丁目4番5号
		(74) 代理人	110001210
			特許業務法人 Y K I 国際特許事務所
		(72) 発明者	二階堂 輝之
			兵庫県姫路市網干区新在家1239 ダイセル化学工業株式会社内
		(72) 発明者	山本 浩明
			兵庫県姫路市網干区新在家1239 ダイセル化学工業株式会社内
		Fターム(参考)	4B018 MD42 MD48 MD58 ME04 ME08
			4B064 AE44 CA02 DA01 DA10
			4B065 AA01X AC14 BB13 BB14 CA18
			CA41 CA44
			4C062 EE99

(54) 【発明の名称】 エクオール製造法、エクオール産生組成物、食品、食品添加物及び医薬品

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】単一の菌株を用いて、培地中におけるイソフラボン類の添加量を従来に比べ多くし、かつエクオールの生産量を大幅に増加させ、生産されたエクオールの回収が容易であり、かつエクオール得量が従来に比べ大幅に増大するエクオールの製造法を提供する。

【解決手段】イソフラボン類を含む培地に、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンを添加し、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種を作用させる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソフラボン類を含む培地に、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンを添加し、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種を作用させることを特徴とするエクオールの製造法。

【請求項 2】

イソフラボン類は、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインからなる群から選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項 1 に記載のエクオールの製造法。

【請求項 3】

前記偏性嫌気性微生物は、アドレクラウチア (*Adlercreutzia*) 属、アサッカロバクター (*Asaccharobacter*) 属、エガセラ (*Eggerthella*) 属、ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、シャーペア (*Sharpea*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、スラッキア (*Slackia*) 属、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属からなる群から選択される単一種であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載のエクオールの製造法。

【請求項 4】

イソフラボン類と、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種と、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンと、を含むことを特徴とするエクオール産生組成物。

【請求項 5】

イソフラボン類は、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインからなる群から選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項 4 に記載のエクオール産生組成物。

【請求項 6】

前記偏性嫌気性微生物は、アドレクラウチア (*Adlercreutzia*) 属、アサッカロバクター (*Asaccharobacter*) 属、エガセラ (*Eggerthella*) 属、ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、シャーペア (*Sharpea*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、スラッキア (*Slackia*) 属、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属からなる群から選択される単一種であることを特徴とする請求項 4 または請求項 5 に記載のエクオール産生組成物。

【請求項 7】

請求項 4 から請求項 6 に記載のエクオール産生組成物と、エクオールとを含む食品、食品添加物。

【請求項 8】

請求項 4 から請求項 6 に記載のエクオール産生組成物と、エクオールとを含む医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エクオールの製造法、エクオール産生組成物、それを用いた食品、食品添加物及び医薬品に関する。

【背景技術】

【0002】

大豆、葛などのマメ科の植物に多く含まれているイソフラボン類はポリフェノールの分類のひとつであり、イソフラボンを基本骨格とするフラボノイドである。近年の調査により、イソフラボン類は女性ホルモン作用（エストロゲン）や抗酸化作用を有し、イソフラボン類を摂取することにより、乳癌、前立腺癌、骨粗しょう症、高コレステロール血症、心疾患、更年期障害などに対して予防効果があることが明らかとなっている（非特許文献

10

20

30

40

50

1 から非特許文献 6 を参照)。

【0003】

また、大豆に含まれるイソフラボン類は、主に糖と共有結合したダイゼイン配糖体を含み、イソフラボンアグリコンを極少量含む。ダイゼイン配糖体として、例えば、ダイジン (daidzin)、グリシチン (glycitin)、ゲニスチン (genistin) を含む。

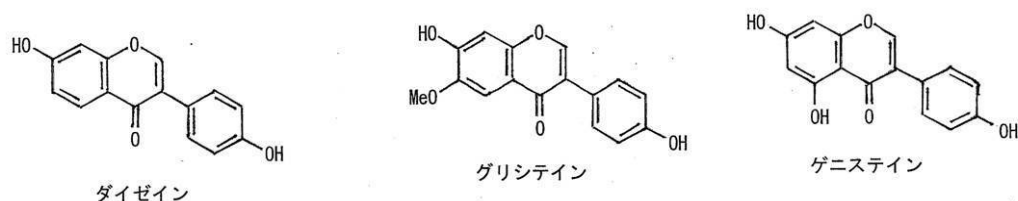
【0004】

ここで、ダイゼイン配糖体は、マロニル化、アセチル化されているものも存在しており、これらの配糖体は、ヒトや動物の体内に入ると消化酵素又は腸内細菌の産生する酵素である β グルコシダーゼ等の働きにより、それぞれダイゼイン (daidzein)、グリシテイン (glycitein)、ゲニステイン (genistein) となる。

10

【0005】

【化 1】



【0006】

さらに、ダイゼインは腸内細菌の働きにより、ジヒドロダイゼイン (dihydrodaidzein) を経て、オーデスメチランゴレンシン (O-desmethylan g o l e n s i n : O - D M A) 又はエクオール (equol) へと酵素的に変換されることが知られている。

20

【0007】

【化 2】



30

【0008】

エクオールは、これらの代謝産物の中で最もエストロゲン活性が高いことが知られている (非特許文献 7 及び 8)。しかしながら、人間の場合、イソフラボンの代謝には個人差があり、上記のようにダイゼインを発酵させてエクオールを産生する能力を有する腸内細菌を保有する人は少なく、その保有率は日本人で約 5 割、欧米人で約 3 割程度であることが明らかとなっている (非特許文献 9 及び 10)。そのため、エクオール産生菌を保有しない人は、大豆等のマメ科食物を摂取してもエクオールを体内で産生することができない。

40

【0009】

そこで、近年、乳酸菌等の嫌気性微生物を用いて体外的にエクオールを産生させる試みがなされている (例えば、特許文献 1 から特許文献 4 を参照)。しかしながら、どのような発酵条件・発酵方法により、より効果的・実用的にエクオールが製造できるかについては、明らかとなっていなかった。また、いずれも生成したエクオール濃度が低く、大量生産することができなかった。

【0010】

また、シクロデキストリンに代表される包接化合物は、その包接化合物を利用して不安定な化合物の安定化や食品の苦みの緩和、脱臭、難溶な化合物の可溶化などに応用されている。近年、生物学的な化合物の製造において、培地中に、原料の可溶化剤としてシクロ

50

デキストリンを添加する製造方法が提案されている（例えば、特許文献5から特許文献7を参照）。

【0011】

また、特許文献8には、エクオール産生菌と、エスケリッチア (*Escherichia*) 属、ラオウルテラ (*Raoultella*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、及びセラチア (*Serratia*) 属に属する微生物から選択される少なくとも1種のエクオール非産生菌と、を含む混合微生物を、ダイゼイン類を含む培地中で培養して、ダイゼイン代謝物を製造する際に、原料であるダイゼイン類の可溶化剤として、(1) シクロデキストリン、又は、(2) ポリエチレングルコールグルコール鎖を有し、水及びエタノール溶解可能でありHLB値が11以上である界面活性剤を、培地中に添加することが記載されている。

10

【0012】

前述した通り特許文献8にはエクオール産生菌と少なくとも1種のエクオール非産生菌と、を含む混合微生物を、ダイゼイン類を含む培地中で培養する際に、 β -シクロデキストリンを、培地中に添加することによりエクオール生産量が増加することが記載されているが、一般的に二種類以上の微生物を混合培養し、再現性の良い結果を得ることは極めて困難である。

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】特開2006-204296号公報

【特許文献2】特表2006-504409号公報

【特許文献3】特開2008-61584号公報

【特許文献4】特開2010-104241号公報

【特許文献5】特許第3549594号明細書

【特許文献6】特許第3135740号明細書

【特許文献7】特開2000-295999号公報

【特許文献8】特開2010-187647号公報

30

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Adlercreutz, H., The Lancet Oncol., 3, 364-373 (2002)

【非特許文献2】Duncan, A. M. et al., Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 17, 253-271 (2003)

【非特許文献3】Wu, A. H. et al., Carcinogenesis, 23, 1491-1496 (2002)

【非特許文献4】Yamamoto, S. et al., J. Natl. Cancer Inst., 95, 906-913 (2003)

40

【非特許文献5】Onozawa, M. et al., Jpn. J. Cancer Res., 90, 393-398 (1999)

【非特許文献6】Ridges, L. et al., Asia Pac. J. Clin. Nutr., 10, 204-211 (2001)

【非特許文献7】Schmitt, E. et al., Toxicol. In Vitro, 15, 433-439 (2001)

【非特許文献8】Sathyamoorthy, N. and Wang, T. T., Eur. J. Cancer, 33, 2384-2389 (1997)

【非特許文献9】Arai, Y. et al., J. Epidemiol., 10, 127-135 (2000)

50

【非特許文献10】Setchell, K. D. et al., J. Nutr., 133, 1027-1035 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、単一種の微生物を培養し、工業的に実施可能なレベルのエクオールの製造法を提供することである。また、エクオール産生組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、以下に示す本発明に至った。

10

【0017】

(1) イソフラボン類を含む培地に、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンを添加し、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種を作用させるエクオールの製造法である。

【0018】

(2) 前記イソフラボン類は、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインからなる群から選択される少なくとも一種である上記(1)に記載のエクオールの製造法である。

【0019】

(3) 前記偏性嫌気性微生物は、アドレクラウチア (*Adlercreutzia*) 属、アサッカロバクター (*Asaccharobacter*) 属、エガセラ (*Eggerthella*) 属、ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、シャーペア (*Sharpea*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、スラッキア (*Slackia*) 属、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属からなる群から選択される単一種である上記(1)または(2)に記載のエクオールの製造法である。

20

【0020】

(4) イソフラボン類と、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種と、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンとを含むエクオール産生組成物である。

30

【0021】

(5) 前記イソフラボン類は、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインからなる群から選択される少なくとも一種である上記(4)に記載のエクオール産生組成物である。

【0022】

(6) 前記偏性嫌気性微生物は、アドレクラウチア (*Adlercreutzia*) 属、アサッカロバクター (*Asaccharobacter*) 属、エガセラ (*Eggerthella*) 属、ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、シャーペア (*Sharpea*) 属、(*Streptococcus*) 属、スラッキア (*Slackia*) 属、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属からなる群から選択される単一種である上記(4)または(5)に記載のエクオール産生組成物である。

40

【0023】

(7) 上記(4)から(6)に記載のエクオール産生組成物と、エクオールとを含む食品添加物である。

【0024】

(8) 上記(4)から(6)に記載のエクオール産生組成物と、エクオールとを含む医薬品である。

【発明の効果】

【0025】

50

本発明のエクオール製造法によれば、従来に比べ、エクオールの生産量が増大する。

【0026】

本発明のエクオール産生組成物によれば、従来に比べ、エクオールの生産量が増大する。

【0027】

本発明の食品添加物、医薬品によれば、エストロゲンの不足に伴う症状、例えば、乳癌、前立腺癌、骨粗しょう症、高コレステロール血症、心疾患、更年期障害、等が予防または改善される。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】比較例1、実施例1～3におけるエクオールの生産性を説明する図である。

【図2】比較例2、実施例4～6におけるエクオールの生産性を説明する図である。

【図3】比較例3、実施例7～9におけるエクオールの生産性を説明する図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明の実施の形態におけるエクオールの製造法、エクオール産生組成物、食品、食品添加物及び医薬品について、以下に説明する。

【0030】

〔エクオールの製造法〕

本実施の形態におけるエクオールの製造法は、イソフラボン類を含む培地に、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンを添加し、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種を作用させる製造法である。

【0031】

本実施の形態におけるイソフラボン類は、主に大豆、クズ、レッドクローバー、カンゾウなどマメ科植物から得られるもので、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインからなる群から選択される少なくとも一種である。

【0032】

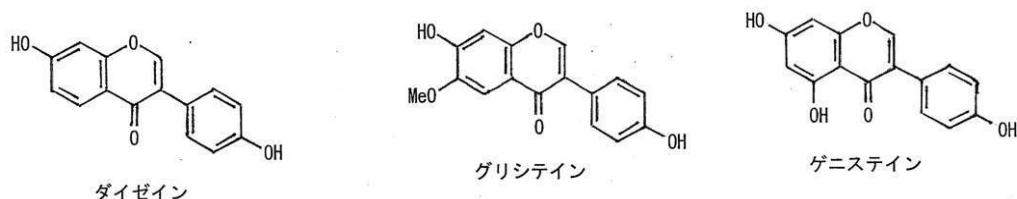
イソフラボンはそのままか、 β -グルコシダーゼ等の酵素あるいは微生物を作用させ、イソフラボンアグリコンに変換して本培養に用いることができる。イソフラボンアグリコンは、例えば、大豆胚芽に麹菌を加え発酵させ、得られた発酵大豆胚芽から抽出することにより得られる。

【0033】

イソフラボンアグリコンは、主に、ダイゼイン (daidzein)、グリシテイン (glycitein)、ゲニステイン (genistein) からなる。

【0034】

【化3】



【0035】

ダイゼイン配糖体を、ヒトや動物の体内に入ると消化酵素又は腸内細菌の産生する酵素である β -グルコシダーゼ等の働きにより、それぞれ、上述したダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインとなる。

【0036】

さらに、ダイゼインは、腸内細菌の働きにより、ジヒドロダイゼイン (dihydrodaidzein) を経て、O-デスメチルアングレンシン (O-desmethyla

10

20

30

40

50

ngolensin:O-DMA) 又はエクオール (equol) へと酵素的に変換される。

【0037】

【化4】



10

【0038】

本実施の形態におけるイソフラボン類としては、イソフラボン、イソフラボンアグリコン、ダイジン、ダイゼインが好ましい。ここで、イソフラボンは例えばフジッコ社製フジフラボンP40、P10などを用いることができる。イソフラボンアグリコンとして、例えば、「AglyMax-30」（ニチモウバイオテックス社製）を用いることができる。

【0039】

本実施の形態における偏性嫌気性微生物は、アドレクラウチア (Adlercreutzia) 属、アサッカロバクター (Asaccharobacter) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、エガセラ (Eggerthella) 属、ユーバクテリウム (Eubacterium) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 属、シャーペア (Sharpea) 属、(Streptococcus) 属、ストスラッキア (Slackia) 属、バクテロイデス (Bacteroides) 属からなる群から選択される単一種である。

20

【0040】

本実施の形態における偏性嫌気性微生物として、以下の表1に示す微生物が好ましい。

【0041】

【表 1】

微生物			由来	発表機関
<i>Sharpea azabuensis</i> ST18	DSM 18934		馬	クロスフィールドバイオ株式会社
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> FJC-B9T	DSM 19450		ヒト	フジッコ株式会社
<i>Asaccharobacter celatus</i> AHU 1763	DSM 18785		ラット	北海道大学
<i>Lactococcus</i> 20-92	FERM BP-10036		ヒト	大塚製薬株式会社
<i>Bacteroides</i> E-23-15	FERM BP-6435		ヒト	大塚製薬株式会社
<i>Streptococcus</i> E-23-17	FERM BP-6436		ヒト	大塚製薬株式会社
<i>Streptococcus</i> A6G225	FERM BP-6437		ヒト	大塚製薬株式会社
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> HE8	DSM 22006		ヒト	German Institute of Human Nutrition
<i>Eubacterium limosum</i>	ATCC 8486		ヒト	Marfarma Holding S.p.A. , イタリア

さらに、本実施の形態において、エクオールを生産する偏性嫌気性微生物として、アサッカロバクター・セラツス (*Asaccharobacter celatus*) DSM 18785 がより好ましい。

【0043】

上記嫌気性微生物は、その寄託番号に示された寄託機関から入手することができる。各受託番号は、当該嫌気性微生物が、それぞれ次の寄託機関に寄託されていることを示す。

F E R M : 特許生物寄託センター ; International Patent Organism Depository (IPOD) (<http://unit.aist.go.jp/pod/ci/index.html>)

A T C C : American Type Culture Collection

D S M : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

10

【0044】

本実施の形態では、シクロデキストリンのなかでも、 β -シクロデキストリン (シクロヘプタミロード) または β -シクロデキストリン誘導体、または γ -シクロデキストリンが好ましい。

【0045】

本実施の形態における β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体の添加量は、培地中のダイゼインの 0.5 モル ~ 5 モル倍好ましくは、1.0 モル ~ 3 モル倍である。

【0046】

本実施の形態における β -シクロデキストリン誘導体としては、例えば、グルコシル- β -シクロデキストリン (6-O-a-D-Glucosyl- β -cyclodextrin)、マルトシル- β -シクロデキストリン (6-O-a-D-Maltosyl- β -cyclodextrin)、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (Hydroxypropyl- β -cyclodextrin)、メチル- β -シクロデキストリン (Methyl- β -cyclodextrin)、ポリ- β -シクロデキストリン (Poly- β -cyclodextrin) などを挙げることができる。

20

【0047】

本実施の形態では、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物が、エクオールの生産に適した条件でダイゼイン等のイソフラボン類と接触させられ、培養される。エクオールの生産に適した条件は、エクオール生成活性を持つ偏性嫌気性微生物の生存と活動が維持される条件をいう。より具体的には、偏性嫌気性微生物の生存が可能な気相条件 (嫌気性条件) が維持され、偏性嫌気性微生物の活性と増殖を支持するための栄養素が与えられることをいう。

30

【0048】

ここで、偏性嫌気性微生物の生存に適した種々の培地組成として、公知の培養組成を用い、先に示したエクオール生産能を有する嫌気性微生物について、当業者が適宜培地組成を選択することができる。本実施の形態の培地として、例えば、日水製薬社製の G A M ブイヨン培地や、D i f c o 社製の B H I 培地等が用いられる。

【0049】

例えば、本発明で用いられる培地には、水溶性の有機物を炭素源として加えられる。水溶性の有機物として、ソルボース、フラクトース、グルコース、メタノール、さらに吉草酸、酪酸、プロピオン酸、酢酸、ギ酸など有機酸類が挙げられる。

40

【0050】

炭素源としての培地に加える有機物の濃度は、効率的に培地中の嫌気性微生物を発育させるために適宜調節することができる。一般的には、0.1 ~ 10 wt / vol % の範囲から添加量を選択することによって、過不足が避けられる。

【0051】

上記の炭素源に加えて、培地には、窒素源が加えられる。本実施の形態において、窒素源としては、通常の発酵に用いる各種の窒素化合物が用いられる。好ましい無機窒素源は、アンモニウム塩、及び硝酸塩である。好ましい有機窒素源はアミノ酸類、酵母エキス、ペプトン類、肉エキス、肝臓エキス、消化血清末などである。より好ましい無機窒素源

50

は、硫安、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、リン酸水素アンモニウム、硝酸カリウム及び硝酸ソーダである。より好ましい窒素源はアルギニン、シトルリン、オルニチン、リジン、酵母エキス、ペプトン類である。

【0052】

さらに、炭素源や窒素源に加えて、偏性嫌気性微生物の培養に適した他の有機物あるいは無機物を培地に加えることもできる。例えば、ビタミンなどの補因子や各種の塩類等の無機化合物を培地に加えることによって、偏性嫌気性微生物の増殖や活性を増強できる場合もある。例えば、無機化合物、ビタミン類、動植物由来の微生物増殖補助因子として以下のものを挙げることができる。

【0053】

無機化合物として、例えば、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、塩化コバルト、塩化カルシウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、明ばん、モリブデン酸ソーダ、塩化カリウム、ホウ酸等、塩化ニッケル、タングステン酸ナトリウム、セレン酸ナトリウム、硫酸第一鉄アンモニウムが挙げられる。

【0054】

また、ビタミン類として、例えば、ビオチン、葉酸、ピリドキシン、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ビタミンB12、チオオクト酸、p-アミノ安息香酸が挙げられる。

【0055】

これらの無機化合物やビタミン類、あるいは増殖補助因子を添加して培養液を製造する方法は公知である。従って、適宜製造方法にしたがって、培養液を作製する。培地は、液体、半固体、あるいは固体とすることができる。本実施の形態におけるエクオールの製造法において、好ましい培地の形態は、液体培地である。

【0056】

本実施の形態において、偏性嫌気性微生物は、公知の微生物の培養方法にしたがって培養することができる。工業的な製造には、培地や基質ガスを連続的に供給することができ、かつ培養物を回収するための機構を備えた連続培養システム (continuous fermentation system) も使用できる。

【0057】

偏性嫌気性微生物の培養において、連続培養システム内への酸素の混入を防ぐことが必要である。培養器は通常用いられる培養槽がそのまま利用できる。嫌気性微生物の培養にも利用することができる培養タンクは市販されており、培養槽内に混入する酸素を、窒素などの不活性気体あるいは基質ガスなどで置換することにより、嫌気的な雰囲気を作ることができる。

【0058】

例えば、嫌気培養ジャー(anaerobic jar)を、嫌気性微生物を培養するためのバイオリアクターとすることができる。嫌気培養ジャーは、金属、ガラス、あるいは合成樹脂製の気密容器で構成され、内部を大気中の酸素から遮断することができる。さらに、嫌気培養ジャーは、嫌気培養ジャー内部の空間や培養液中に含まれる分子状酸素を除去するための機構を備えることができる。例えば、嫌気培養ジャーは窒素、ヘリウム、水素、炭酸ガスなどを底部から通気攪拌し供給することで、内部を嫌気状態に維持することができる。

【0059】

本実施の形態において、培養槽に、付加的な機能を与えることができる。例えば、通常使用される攪拌混合槽のほか、気泡塔型、ドラフトチューブ型の培養槽も利用できる。液体培地に吹き込まれる混合気体によって微生物は遊離分散され、微生物と培地を十分に接触させることができる。また、バイオトリックリングフィルター (biotrickling filter) のように通気性の高いスラグ、その他セラミック系の無機充填物、あるいはポリプロピレン等の有機合成物質の充填層に、水分を滴らせながら微生物を生息させ、そこにガスを通気しながら培養することもできる。さらに、使用する微生物は常法によりカラギーナンゲル、アルギン酸ゲル、アクリルアミドゲル、キチン、セルロース、寒天などに固定

10

20

30

40

50

化して用いることもできる。

【0060】

本実施の形態では、当業者が、生成した嫌気性微生物と培養生成液を分離するため、公知の方法を用いることができる。好ましい分離の方法は、濾過性能、濃縮性能を有するホローファイバー型限外濾過あるいは精密濾過膜を利用する方法である。また、微生物と該生成液の分離に十分な濾過速度を得るためには使用する微生物に応じて適当な分画分子量の膜を選択すれば良い。培養槽から限外濾過膜を通して分離された培養液からエクオールを回収することができる。回収されたエクオールの精製方法は公知であり、例えば、培養物を遠心分離などで菌体を除き、上清を減圧下に濃縮、乾固後、70%エタノールあるいはメタノールで抽出する。抽出液をさらにシリカゲルクロマトグラフィーや晶析などの操作を行うことで精製できる。培養槽の形状によっては、培地を十分攪拌するため、攪拌機等を利用することもできる。培養槽内の培養物を攪拌することによって、培地成分や必要なガスを嫌気性微生物に接触させる機会を増やして、エクオールの生成効率を最適化することができる。また水素、窒素、炭酸ガスなどの単一あるいは混合ガスをマイクロあるいはナノバブルとして供給することもできる。

10

【0061】

微生物の十分な生育のため、培養物のpHは、3.0～9.0が好ましく、5.5～8.5がより好ましい。また、エクオールの回収量を増加させるため、培養槽の温度は特に制限されるものではないが、37℃を好ましい温度として挙げることができる。

【0062】

20

〔エクオール産生組成物〕

本実施の形態におけるエクオール産生組成物は、イソフラボン類と、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種と、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンと、を含む。

【0063】

なお、イソフラボン類と、エクオール生産能を有する偏性嫌気性微生物の一種と、 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体または γ -シクロデキストリンについては、上述同様であるため、ここでの記載は省略する。

【0064】

〔食品添加物、医薬品〕

30

本実施の形態における食品、食品添加物または医薬品は、上述したエクオール産生組成物と、エクオールとを含む。

【0065】

さらに、本実施の形態における食品、食品添加物または医薬品は、本実施の形態の製造法により得られたエクオールを含有する。

【0066】

エクオールを医薬品として提供する場合、その製剤化には、エクオールに加え、一般的に製剤化に用いられる物質（例えば、デンプン、デキストリン、乳糖、コーンスターチ、無機塩類等）を用いることができる。医薬品として提供する場合の剤型としては、アンプル、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、輸液、ドリンク剤等を例示することができる。

40

【0067】

エクオールを食品、食品添加物として添加してなる飲食物として、例えば、健康食品、清涼飲料、ミルク、プリン、ゼリー、飴、ガム、ヨーグルト、チョコレート、スープ、クッキー、スナック菓子、アイスクリーム、アイスキャンデー、パン、ケーキ、シュークリーム、ハム、ミートソース、カレー、シチュー、チーズ、バター、ドレッシング等が例示される。

【実施例】

【0068】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限さ

50

れるものではない。

【0069】

以下、各実施例においては、以下の方法により、ダイゼイン、ジヒドロダイゼイン、エクオール、グリシテイン、ゲニステインの定量を行った。

【0070】

ダイゼイン、ジヒドロダイゼイン、エクオール、グリシテイン、ゲニステインの定量：

培養液0.5mLに対し、酢酸エチル1.5mLを加えて、激しく攪拌した後、3000rpmで10秒遠心し、酢酸エチル層をパスツールピペットで可能な限り取り出した。同培養液に同様の操作をあと2回行い、それら酢酸エチル層を合わせてエクオール抽出液を得た。この抽出液をエバポレーターで減圧下に濃縮、乾固し、1.0mLのメタノールに溶解させた。これを0.45μmのポリテトラフルオロエチレン（PTFE）膜で濾過し、不溶物を除去したものを高速液体クロマトグラフィー測定サンプルとした。

10

【0071】

[高速液体クロマトグラフィー条件]

カラム：Phenomenox Luna 5u C18、2.0mm×150mm（島津ジーエルシー）

移動相：水／メタノール [55：45，v／v]

流速：0.2mL／min

カラム温度：40℃

検出：UV280nm

保持時間：ジヒドロダイゼインが13.8分、ダイゼインが19.6分、グリシテインが22.5分、エクオールが25.6分、ゲニステインが35.0分である。

20

【0072】

以下の実施例で使用したダイゼイン（以下「DAI」と略す）はLKT Laboratories, Inc. 社製を使用した。イソフラボンアグリコンはニチモウバイオテックス社製AglyMax-30を使用した。これの組成はDAI 21.2%、グリシテイン 9.8%、ゲニステイン 3.0%である（いずれもメーカー分析値、重量%）また、エクオールは「EQL」と略す。また、β-シクロデキストリンを以下「β-CD」ともいう。

【0073】

実施例1～3，比較例1：

30

GAMブイヨン培地（日水製薬製）5.9gとL-アルギニン塩酸塩1.21g（培地に対してアルギニンで1%）を純水100mLに溶かし、炭酸ガスを通じながら10.0mLずつ嫌気性菌培養用100mLバイアルビン（株式会社エルエム製）に分注し、ブチルゴム栓、アルミキャップをして115℃、15分間滅菌した。この培地に-80℃凍結保存していたアサッカロバクター・セラツス（*Asaccharobacter celatus*）DSM 18785株を0.2mL植菌し、無菌フィルターを通した水素／炭酸ガス（4：1，vol／vol）で気相を3分間以上置換した後、37℃、200spmで16時間振とう培養を行った。

【0074】

GAMブイヨン+1%アルギニン培地に表2に示す組成になるようにDAI、シクロデキストリンを加えた培地を調製し、115℃、15分間滅菌した。それらにこの種培養液を0.1mLずつ植菌し、水素／炭酸ガス（4：1，vol／vol）で無菌的に3分間以上置換した後、37℃、200spmの条件で振とう培養を行った。8，48，101時間後、培養液を取り出し、高速液体クロマトグラフィーにより生成したEQLを定量した。結果を図1に示す。

40

【0075】

【表 2】

	DAI, g/L	α -シクロデキストリン	β -シクロデキストリン	γ -シクロデキストリン
比較例1	1.02	—	—	—
実施例1	1.02	4 mM	—	—
実施例2	1.02	—	4 mM	—
実施例3	1.02	—	—	4 mM

濃度はいずれも培地での終濃度を表す。

10

【0076】

α -シクロデキストリンは効果が無く、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンがEQLを増加させることが分かった。特に β -シクロデキストリンが効果的であることがわかった。

【0077】

実施例4～6，比較例2：

GAMブイヨン+1%アルギニン培地に表3に示す組成になるようにAglyMax-30、シクロデキストリンを加えた培地を調製し（ダイゼインとシクロデキストリンは等モルになるよう添加した）115℃、15分間滅菌した。実施例1と同様にして培養した種培養液をそれぞれ0.1mLずつ植菌し、水素／炭酸ガス（4：1，vol／vol）で無菌的に3分間以上置換した後、37℃、200spmの条件で振とう培養を行った。21，50時間後、培養液を取り出し、高速液体クロマトグラフィーにより生成したEQLを定量した。結果を図2に示す。

20

【0078】

【表 3】

	AglyMax-30	β -シクロデキストリン
比較例2	25 g/L	—
実施例4	25 g/L	23.8 g/L
実施例5	35 g/L	32.9 g/L
実施例6	45 g/L	42.0 g/L

30

【0079】

イソフラボンアグリコンAglyMax-30では β -シクロデキストリン添加で試薬DAI以上にEQL生産が促進され、5.35g/Lにまで達することが明らかとなった。このように本法では極めて高濃度にEQLを蓄積できる。

40

【0080】

実施例7～9，比較例3： β -シクロデキストリン誘導体の使用；

GAMブイヨン+1%アルギニン培地に表4に示す組成になるようにAglyMax-30、 β -シクロデキストリン、グルコシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリンを加えた培地を調製し（ダイゼインとシクロデキストリン類は等モルになるよう添加した）115℃、15分間滅菌した。実施例1と同様にして培養した種培養液をそれぞれ0.1mLずつ植菌し、水素／炭酸ガス（4：1，vol／vol）で無菌的に3分間以上置換した後、37℃、200spmの条件で振とう培養を行った。21，50時間後、培養液を取り出し、高速液体クロマトグラフィーにより生成したEQLを定量した。結果を図3に示す。

50

【0081】

【表4】

	AglyMax-30	β-シクロデキストリン	グルコシル-β-シクロデキストリン	マルトシル-β-シクロデキストリン
比較例3	35 g/L	—	—	—
実施例7	35 g/L	34.1 g/L	—	—
実施例8	35 g/L	—	38.9 g/L	—
実施例9	35 g/L	—	—	43.8 g/L

10

【0082】

β-シクロデキストリンよりもグルコシル-β-シクロデキストリン、マルトシル-β-シクロデキストリンを添加した方がEQL生成濃度は高まることが明らかとなった。

【0083】

実施例10：エクオール粗精製品の取り出し；

GAMブイヨン+1%アルギニン培地にAglyMax-30 19.1 g/L、β-シクロデキストリン 17.0 g/Lを加えた培地を160 mL調製し、20 mLずつ8本の100 mL容バイアルビン（株式会社エルエム製）に分注し、ブチルゴム栓、アルミキャップをして115℃、15分間滅菌した。実施例1と同様にして培養した種培養液を0.2 mLずつ植菌し、水素/炭酸ガス（4：1，vol/vol）で無菌的に3分間以上置換した後、37℃、200 spmの条件で振とう培養を行った。96時間後、培養液を取り出し、高速液体クロマトグラフィーにより生成したEQLを定量したところ、EQLが平均2.62 g/L生成していた。これらを105℃で1分間加熱した後、室温まで冷却後、140 mLを集め、遠心分離（10000 rpm，10分間）にて上清を分離した。得られた上清中のEQL濃度は培養液とほぼ変わらず、EQLがすべて溶解していることが明らかになった。一方、上清中の他のアグリコンであるDAI、グリシテイン、ゲニステインの濃度は0.1 g/L程度でEQLが特異的に溶解していること、本条件で調製した発酵液はEQLを分離するのに極めて好適であることが判明した。上清液をエバポレーターにて減圧下に濃縮し、約1/3の重量にした。これの2倍重量のエタノールを加え、攪拌後、不溶物をろ紙でろ過した。再びろ液をエバポレーターにて減圧下に濃縮乾固し、残渣5.1 gを得た。高速液体クロマトグラフィーで残渣を分析した結果、4.9重量%のEQLが含まれていた。従って、本発酵法は容易に高い含量のEQL含有組成物が得られる優れた方法であることが分かった。

20

30

【産業上の利用可能性】

【0084】

本発明のエクオールの製造法は、培地中におけるイソフラボン類の添加量を従来に比べ多くし、かつエクオールの生産量を大幅に増加させたので、生産されたエクオールの回収が容易であり、かつエクオール得量が従来に比べ大幅に増大する。

40

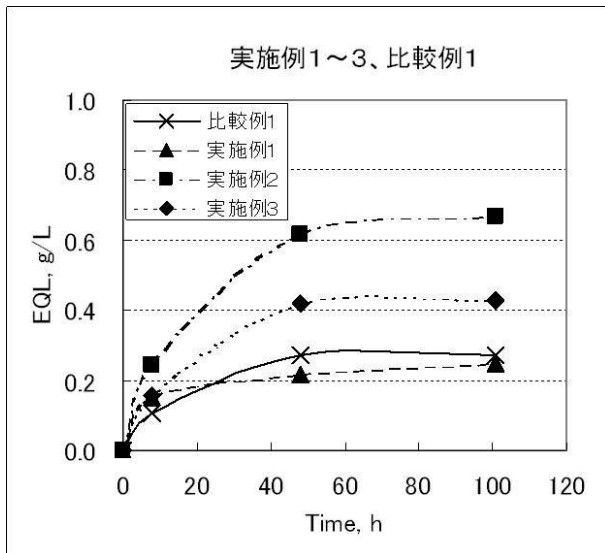
【0085】

本発明のエクオール産生組成物によれば、従来に比べ、エクオールの生産性が高く、また、従来に比べ、生産されたエクオールの回収が容易である。

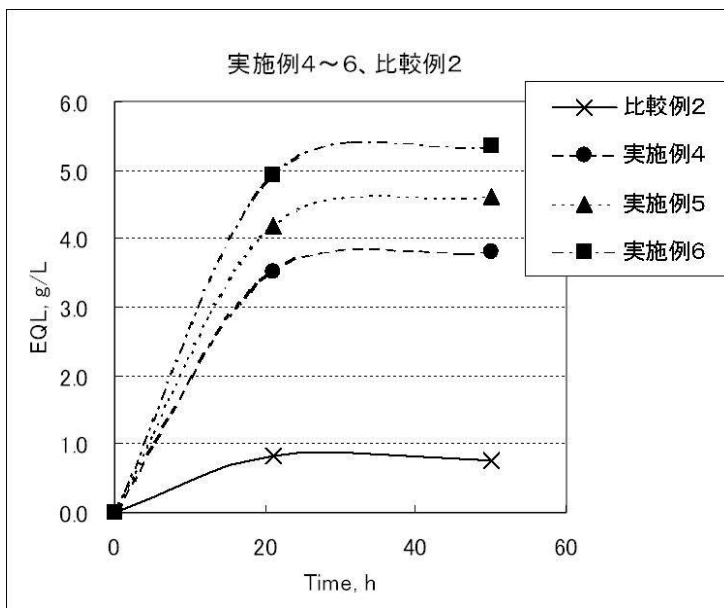
【0086】

本発明の食品、食品添加物、医薬品によれば、エストロゲンの不足に伴う症状、例えば、乳癌、前立腺癌、骨粗しょう症、高コレステロール血症、心疾患、更年期障害、等が予防または改善される。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

