

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-236889

(P2000-236889A)

(43)公開日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 P 1/00		C 1 2 P 1/00	A 4 B 0 6 4
// A 6 1 P 1/04		A 6 1 K 31/00	6 0 1 C 4 C 0 8 8
	3/00		6 0 3
	7/02		6 0 7 A
	31/18		6 3 1 M
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平11-38936

(22)出願日 平成11年2月17日(1999.2.17)

(71)出願人 397040993

株式会社沖縄発酵化学

沖縄県糸満市西崎町4丁目15番13

(72)発明者 佐渡山 恵一

沖縄県糸満市西崎町4丁目15番13 株式会

社沖縄発酵化学内

(74)代理人 100086759

弁理士 渡辺 喜平 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フコイダンの抽出方法

(57)【要約】

【課題】 製造設備における腐食等の問題がなく、所望の範囲内の平均分子量を有するフコイダンが効率的に得られる酵素を用いたフコイダンの抽出方法を提供する。

【解決手段】 オキナワモズクからフコイダンを抽出する方法において、オキナワモズクを有機酸塩を用いて膨潤させた後、フコイダン分解酵素を用いた酵素処理によりフコイダンを抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オキナワモズクからフコイダンを抽出する方法において、オキナワモズクを有機酸塩を用いて膨潤させた後、フコイタン分解酵素を用いた酵素処理によりフコイタンを抽出することを特徴とするフコイダンの抽出方法。

【請求項2】 前記オキナワモズク1000gあたり、前記有機酸塩の使用量を1~100gの範囲内の値とすることを特徴とする請求項1に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項3】 前記有機酸塩が、クエン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ステアリン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、グリコール酸、安息香酸からなる群から選択される少なくとも一つの有機酸の塩であることを特徴とする請求項1または2に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項4】 前記抽出工程の温度を25~95の範囲内の値とすることを特徴とする請求項1~3のいずれか一項に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項5】 前記抽出工程の抽出時間を0.5~48時間の範囲内の値とすることを特徴とする請求項1~4のいずれか一項に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項6】 前記抽出工程のpHを2~6の範囲内の値とすることを特徴とする請求項1~5のいずれか一項に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項7】 前記酵素が、アスペルギルスニガーより産生されるセルラーゼであることを特徴とする請求項1~6のいずれか一項に記載のフコイダンの抽出方法。

【請求項8】 前記フコイダンの平均分子量を、10,000~1,000,000の範囲内の値とすることを特徴とする請求項1~7のいずれか一項に記載のフコイダンの抽出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、オキナワモズクからの酵素および膨潤剤を用いたフコイダンの抽出方法に関する。さらに詳しくは、製造設備における腐食等の問題がなく、所望の範囲内の平均分子量を有するフコイタンが効率的に得られる酵素および膨潤剤を用いたフコイダンの抽出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、オキナワモズクに含まれるフコイタンは、優れた抗コレステロール作用、血液清澄作用、抗血液凝固作用、抗癌作用、抗エイズウイルス作用、および抗胃潰瘍作用等の薬理効果を有することから、効率的に抽出することが望まれていた。

【0003】そこで、特開平10-70970号公報に、モズクから、60~100の熱水を用い、30分~3時間の条件により、重量分子量が50,000~5

00,000の範囲内の値、中性糖含量が50~90%の範囲内の値、イオウ含量が3~17%の範囲内の値である熱水抽出物、例えばフコイタンを含んだ熱水抽出物を抽出する方法が開示されている。

【0004】また、特開平10-165114号公報や、刊行物である応用糖質科学、43巻、第2号、p.143~148、(1996)(刊行日1996年6月30日)には、養殖オキナワモズクから、塩酸や硫酸等の無機酸(濃度0.2N)を抽出剤として用い、室温にて、24時間程度の時間をかけてフコイタンを抽出する方法が開示されている。

【0005】また、特開昭61-57519号公報や特開昭61-5752019号公報には、海藻から、水や温水、あるいは塩酸を用いて抽出された高粘性のフコイタン含有溶液に、-1,3-グルカナナーゼまたはプロテアーゼを溶存させて、フコイタン含有溶液に含まれる高粘性付与物質を分解し、低粘性のフコイタン含有溶液を製造する方法、あるいは、さらに限外濾過膜を用いてフコイタンを製造する方法が開示されている。

【0006】さらに、特開平6-62852号公報、特開平7-59563号公報および特開平7-59564号公報には、真ウニ類から抽出したフコイタン分解酵素であり、至適pHがpH3~3.5付近であり、至適温度が50~55付近であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で約分子量23000のフコイタン分解酵素(特開平6-62852号公報)や、至適pHがpH4~4.5付近であり、至適温度が60付近であるフコイタン分解酵素(特開平7-59563号公報)や、至適pHがpH3~4.0付近であり、至適温度が45付近であるフコイタン分解酵素(特開平7-59564号公報)を用いたフコイダンの製造方法が開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、特開平10-70970号公報に開示された製造方法では、加圧しておらず、しかも抽出温度が低いために、フコイダンの収率が使用原料に対して1%未満と低く、しかも、フコイタンに含まれるフコース(ウロン酸)の含有量が少ないという問題が見られた。

【0008】また、特開平10-165114号公報等に開示された製造方法では、腐食性の高い強酸を抽出剤として用いているため、製造設備を腐食しやすいという問題が見られた。もちろん、耐腐食性の高い無機材料等を使用することにより、製造設備の腐食をある程度は防止することができるものの、耐腐食性の高い無機材料等は、極めて高価であったり、加工性が乏しい等の問題があり、経済的に不利であった。また、同公報等に開示された製造方法で得られるフコイタンは、分子量が高すぎて、所望の分子量、例えば、100,000~500,000の範囲内の値とすることが容易でなかった。な

お、例えば、抗エイズウイルス作用を典型的に示すには、フコイダンの平均分子量を100,0000~200,000の範囲内の値とするのが好ましいことが知られており、同様に、抗胃潰瘍作用を典型的に示すには、フコイダンの平均分子量を200,000程度の値とするのが好ましいことが知られている。さらに、抽出剤として強酸を使用した場合、得られたフコイダンにつき、最終的に強塩基を用いて中和する必要があり、製造工程数が増えたり、含有する不純物量が増えるという問題が見られた。

【0009】また、特開昭61-57519号公報や特開昭61-5752019号公報に開示された製造方法では、抽出剤として、強酸である塩酸を用いた場合には、特開平10-165114号公報等と同様の腐食性や分子量性等の問題があり、一方、抽出剤として、水や温水(40、14時間)を用いた場合には、特開平10-70970号公報と同様の抽出効率が極めて低いという問題が見られた。

【0010】さらに、特開平6-62852号公報、特開平7-59563号公報および特開平7-59564号公報に開示されたフコイダン分解酵素を用いた製造方法は、使用可能な酵素の種類が限定されており、また、製造設備の腐食性的の問題は見られないものの、かかるフコイダン分解酵素を用いただけでは、フコイダンに含まれるフコースの収率が低いという問題が見られた。

【0011】そこで、本発明の発明者らは上記問題を鋭意検討したところ、酵素処理の前に、膨潤処理を施すことにより、製造設備を腐食したり、フコイダンを過度に分解することなく、しかも使用する酵素の種類にかかわらず高い抽出率が得られることを見出し本発明を完成したものである。すなわち、本発明は、製造設備における腐食等の問題がなく、所望の範囲内の平均分子量を有するフコイダンが効率的に得られる酵素を用いたフコイダンの抽出方法を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、オキナワモズクからフコイダンを抽出する方法であり、オキナワモズクを有機酸塩を用いて膨潤させた後、フコイダン分解酵素を用いた酵素処理によりフコイダンを抽出することを特徴とする。このように膨潤処理と、酵素処理とを組み合わせることにより、フコイダンあるいはそれに含まれるフコースについて、優れた抽出効率を得ることができる。すなわち、有機酸塩を用いて、オキナワモズクを膨潤させるとともに、酵素処理におけるpHの調整をすることができるため、フコイダンの抽出効率につき、膨潤処理と酵素処理との優れた相乗効果が得られるものである。また、このような抽出方法であれば、製造設備に対する腐食性やフコイダンの分子量を調整する際の問題もない。

【0013】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、

り、オキナワモズク1000gあたり、有機酸塩の使用量を1~100gの範囲内の値とすることが好ましい。このように有機酸塩の使用量を制限することにより、フコイダンについての優れた抽出効率が得られ、しかも、含まれる不純物量を減少させることができる。

【0014】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、有機酸塩が、クエン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ステアリン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、グリコール酸、安息香酸からなる群から選択される少なくとも一つの塩であることが好ましい。このような種類の有機酸塩を使用することにより、優れた抽出効率が得られ、しかも製造設備に対する腐食性やフコイダンの分子量性的の問題がない。

【0015】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、抽出工程の温度を25~95の範囲内の値とすることが好ましい。このように抽出温度を制限することにより、優れた抽出効率が得られ、製造管理も良好となる。

【0016】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、抽出工程の抽出時間を0.5~48時間の範囲内の値とすることが好ましい。このように抽出時間を制限することにより、優れた抽出効率が得られ、経済性も良好となる。

【0017】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、抽出工程のpHを3~6の範囲内の値とすることが好ましい。このように抽出工程のpHを制限することにより、優れた抽出効率が得られ、しかも製造設備に対する腐食性やフコイダンの分子量性的の問題がない。

【0018】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、酵素として、繊維素分解酵素およびフコース硫酸遊離酵素が好ましいが、特に、繊維素分解酵素のうちのアスペルギルスニガーより産生されるセルラーゼが好ましい。

【0019】また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、フコイダンの平均分子量を、10,000~500,000の範囲内の値とすることが好ましい。このようにフコイダンの平均分子量を制限することにより、例えば、優れた抗エイズウイルス作用や抗胃潰瘍作用を示すことができる。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。なお、以下の説明は、本発明の抽出方法が理解できる程度に、概略的に行うものに過ぎない。したがって、本発明は以下の説明にのみ限定されるものではない。

【0021】[第1の実施形態]第1の実施形態は、以下の(1)~(3)の工程を順次に含むフコイダンの抽出方法である。

(1)オキナワモズクの前処理工程

(2) フコイダンの抽出工程

(3) フコイダンの後処理工程

【0022】(1) オキナワモズクの前処理工程

オキナワモズクから、フコイダンを抽出するにあたり、抽出効率を向上させ、不純物量を減少させるために、前処理(解凍、塩抜き、破碎、膨潤)することが好ましい。そして、第1の実施形態においては、有機酸塩を用いた膨潤処理が必須である。

【0023】①解凍および塩抜き

オキナワモズク(養殖および天然オキナワモズク)は、収穫後、保存性を良好にするため塩蔵したり、冷蔵してあることが多いため、一般に前処理工程において、塩抜きしたり、解凍することが好ましい。具体的には、水道水を用いて表面の水を洗い流した後、一例として、1000リットルの容器内に、250Kgの割合でオキナワモズクを収容した状態で、水を流しながら0.5~5時間浸漬するのが好ましい。

【0024】②破碎

また、抽出効率を上げるために、オキナワモズクを小片に破碎するのが好ましい。この小片の大きさについても特に制限されるものではないが、具体的に、カッターミキサー等を用いて、長さ(長辺)を0.1~50mmの範囲内の値とするのが好ましく、0.5~30mmの範囲内の値とするのがより好ましく、1~20mmの範囲内の値とするのがさらに好ましい。

【0025】③膨潤処理

抽出工程前に、優れた抽出効率を得るために、オキナワモズクを膨潤させる有機酸塩処理を施すことが必要湯である。すなわち、後工程において、酵素処理するにあたり、高い抽出効率を得るためには、膨潤処理が極めて有効なためである。

【0026】ここで、好ましい有機酸塩としては、クエン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ステアリン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、グリコール酸、安息香酸からなる群から選択される少なくとも一つの有機酸の、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。特に、クエン酸ナトリウムは、オキナワモズクに対する膨潤効果に優れており、優れた抽出効率を得られることから好ましい。

【0027】また、有機酸塩の使用量についても特に制限されるものではないが、例えば、オキナワモズク100重量部あたり、有機酸塩の使用量を0.1~20重量部の範囲内の値とするのが好ましい。この理由は、有機酸塩の使用量が0.1重量部未満となると、膨潤効果が得られない場合があるためであり、一方、有機酸塩の使用量が20重量部を超えると、不純物量が多くなり、あるいは得られるフコイダンの平均分子量の制御が困難となる場合があるためである。したがって、膨潤効果と、フコイダンの分子量の調整等とのバランスがより

良好となることから、有機酸塩の使用量を、オキナワモズク100重量部あたり、0.5~10重量部の範囲内の値とするのがより好ましく、1~5重量部の範囲内の値とするのがさらに好ましい。

【0028】また、有機酸塩による処理温度については特に制限されるものではないが、例えば、処理温度を25~90の範囲内の値とするのが好ましい。この理由は、処理温度が25未満となると、膨潤効果が得られない場合があるためであり、一方、処理温度が90を超えると、得られるフコイダンの平均分子量の制御が困難となる場合があるためである。したがって、膨潤効果と、フコイダンの分子量の調整とのバランスがより良好となることから、有機酸塩による処理温度を30~70の範囲内の値とするのがより好ましく、40~60の範囲内の値とするのがさらに好ましい。

【0029】さらに、有機酸塩による処理時間については、使用量や処理温度との関係もあるが、例えば、処理時間を0.1~24時間の範囲内の値とするのが好ましい。この理由は、処理時間が0.1時間となると、膨潤効果が得られない場合があるためであり、一方、処理時間が24時間を超えると、得られるフコイダンの平均分子量の制御が困難となる場合があるためである。したがって、膨潤効果と、フコイダンの分子量の調整とのバランスがより良好となることから、有機酸塩による処理時間を0.3~12時間の範囲内の値とするのがより好ましく、0.5~5時間の範囲内の値とするのがさらに好ましい。

【0030】また、膨潤処理を実施するにあたり、オキナワモズクと有機酸塩とを攪拌することが好ましい。具体的には、攪拌翼を用いて、5~200rpmの回転数で攪拌することが好ましく、10~100rpmの回転数で攪拌することがより好ましく、20~80rpmの回転数で攪拌することがさらに好ましい。この理由は、攪拌翼の回転数が5rpm未満となると、膨潤効果が著しく低下する場合があるためであり、一方、攪拌翼の回転数が200rpmを超えると、気泡を巻き込みやすくなり、逆に膨潤効果が低下したり、製造設備が大掛かりとなる場合があるためである。

【0031】(2) フコイダンの抽出工程

フコイダンの抽出効率や分子量を定める条件としての、第1の実施形態における抽出条件(酵素の種類、酵素の使用量、抽出温度、抽出時間、抽出pH値、攪拌条件)について説明する。

【0032】①酵素の種類

抽出方法を実施するにあたり、繊維素分解酵素およびフコース硫酸遊離酵素あるいはいずれか一方からなる酵素を使用することが好ましい。これらのうち、使用pH値の範囲がより広く、しかも、高い抽出効率を得られることから、繊維素分解酵素を使用することが好ましく、より好ましくは、アスペルギルスニガー(Aspergillus ni

ger, 麹黴)から産生されるセルラーゼあるいはヘミセルラーゼである。アスペルギルスニガーから産生されるセルラーゼ等は、強力なC×活性を有しており、フコイダンの抽出効率を特異的に高めることができる。また、かかるセルラーゼ等は、他の酵素と比較して、熱安定性(熱処理前と熱処理後における酵素活性の残存率(残存活性)が70%以上である温度)が0~70と広く、相対活性(温度60, pH4, 時間30分間の条件で測定される活性を100%としたときに、各温度で、pH4, 30分間の条件で熱処理したときの酵素活性割合)に基づく温度依存性も比較的小さいという特徴がある。さらに、他の酵素と比較して、セルラーゼ等はpH安定性(温度40、30分の条件で、各pH処理前とpH処理後における酵素活性の残存率(残存活性)が70%以上であるpH)についても、pH2~8と広く、相対活性(温度60, pH4, 時間30分間の条件で測定される活性を100%としたときに、各pH, 温度60, 30分間の条件でpH処理したときの酵素活性割合)に基づくpH依存性も比較的小さいという特徴がある。ここで、図1~図4を用いて、セルラーゼ系酵素の一例のpH依存性、pH安定性、温度依存性および温度安定性について説明する。具体的に、1%酵素濃度のセルラーゼ系酵素(スミチームAC)を、基質あたり、0.1重量%の使用量となるように用い、基質(CMC-Na)100gを分解した場合の分解能の結果を図1~図4に示す。すなわち、図1は、横軸にpH値(-)を採って示してあり、縦軸に上記相対活性(%)を採って示してある。また、図2は、横軸にpH値(-)を採って示してあり、縦軸に上記残存活性(%)を採って示してある。また、図3は、横軸に温度(°C)を採って示してあり、縦軸に上記相対活性(%)を採って示してある。また、図4は、横軸に温度(°C)を採って示してあり、縦軸に上記残存活性(%)を採って示してある。これらの結果から、セルラーゼ系酵素は、優れたpH依存性、pH安定性、温度依存性および温度安定性を有していることが理解される。

【0033】②酵素の使用量

また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、酵素の使用量を、オキナワモズク1000gあたり、0.1~20gの範囲内の値とすることが好ましい。この理由は、酵素の使用量が0.1g未満となると、単位時間あたりの抽出効率が著しく低下する可能性があるためであり、一方、酵素の使用量が20gを超えると、不純物量が多くなったり、フコイダンの平均分子量の調整が困難となる可能性があるためである。したがって、抽出効率と、含まれる不純物量等とのバランスがより良好となることから、酵素の使用量を、オキナワモズク1000gあたり、0.2~10gの範囲内の値とすることが好ましく、0.5~5gの範囲内の値とすることがさらに好ましい。

【0034】③抽出温度

また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、抽出温度を25~95の範囲内の値とすることが好ましい。この理由は、抽出温度が25未満となると、抽出効率が著しく低下する可能性があるためであり、一方、抽出温度が95を超えると、製造管理が困難となったり、フコイダンが過度に分解する可能性があるためである。したがって、抽出効率と、製造管理等とのバランスがより良好となることから、抽出温度を30~80の範囲内の値とすることが好ましく、40~70の範囲内の値とすることがさらに好ましい。

【0035】④抽出pH値

また、本発明の抽出方法を実施するにあたり、抽出時のpH値を3~6の範囲内の値とする必要がある。この理由は、pH値が3未満となると、酵素が死活したり、製造設備に対する腐食性が著しく高くなる可能性があるためであり、一方、pH値が6を超えると、抽出効率が著しく低下するためである。したがって、製造設備に対する腐食性と、抽出効率とのバランスがより良好となることから、抽出時のpH値を3.5~5.5の範囲内の値とすることが好ましく、3.8~5.0の範囲内の値とすることがさらに好ましい。

【0036】⑤抽出時間

また、抽出方法を実施するにあたり、抽出工程の抽出時間を0.1~48時間の範囲内の値とすることが好ましい。この理由は、抽出時間が0.1時間未満となると、抽出効率が著しく低下する可能性があるためであり、一方、抽出時間が48時間を超えると、経済的に不利となる可能性があるためである。したがって、経済性と、抽出効率とのバランスがより良好となることから、抽出時間を0.2~24時間の範囲内の値とすることが好ましく、0.5~5時間の範囲内の値とすることがさらに好ましい。

【0037】⑥攪拌条件

また、抽出方法を実施するにあたり、抽出容器内にて、攪拌することが好ましい。具体的には、攪拌翼を用いて、5~200rpmの回転数で攪拌することが好ましく、10~100rpmの回転数で攪拌することがより好ましく、20~80rpmの回転数で攪拌することがさらに好ましい。この理由は、攪拌翼の回転数が5rpm未満となると、抽出効率が著しく低下する可能性があるためであり、一方、攪拌翼の回転数が200rpmを超えると、気泡を巻き込みやすくなり、逆に抽出効率が低下したり、製造設備が大掛かりとなる可能性があるためである。

【0038】(3)フコイダンの後処理工程

第1の実施形態において、最終的にフコイダンを得るためには、抽出工程で得られた抽出液を、後処理(遠心分離、脱塩、濃縮、粉末化)することが好ましい。

【0039】①遠心分離

得られた抽出液を、遠心分離機の濾布内に収容した後、遠心分離処理することにより、固液分離することができる。すなわち、遠心分離処理することにより、不純物等の固形分と、フコイダンを多く含む溶液とを効率的に分離することができる。ここで、遠心分離処理条件は、特に制限されるものではないが、例えば、抽出工程で得られた抽出液が50以下の温度になったことを確認後、3,000~100,000rpmの回転数で、1~30分間の時間とすることが好ましい。

【0040】②脱塩

また、遠心分離処理して得られた液状物を、限外濾過装置を用いて、例えば、分画分子量10000以下の条件で、限外濾過処理を行うことが好ましい。このように限外濾過処理することにより、分子量分布が狭いフコイダンを多く含む溶液を、限外濾過濃縮液として得ることができ、結果として、塩分量や分子量が所定範囲内のフコイダンを効率的に得ることができる。なお、塩分計で測定される濾液（限外濾過濃縮液）における塩分濃度が、0.1重量%以下の値となるまで、限外濾過濃縮と、濾過水の加圧とからなる限外濾過処理を繰り返し行うことが好ましい。

【0041】③濃縮

減圧濃縮装置を用いて、得られた限外濾過濃縮液中のフコイダンの濃度を、例えば、2倍以上の値とすることが好ましい。このように濃縮化することにより、後工程における粉末化が容易となり、粒度分布の狭いフコイダンパウダーを得ることができる。

【0042】④粉末化

例えば、スプレードライ装置や凍結乾燥装置を用いて、粒度分布の狭いフコイダンパウダーを効率的に得ることができる。なお、スプレードライ装置を用いる場合には、粉末化が容易なように、減圧濃縮装置により得られたフコイダン濃縮液に、デキストリン等の賦型剤を、フコイダン100重量部あたり、50~500重量部の範囲内で添加することが好ましい。

【0043】[第2の実施形態]第2の実施形態も、第1の実施形態と同様に、上記(1)~(3)の工程を順次に含むフコイダンの抽出方法である。ただし、(2)フコイダンの抽出工程において、抽出剤として、酵素のほかに、有機酸を添加していることを特徴としている。したがって、かかる抽出剤の一つである有機酸について、以下、中心的に説明することにする。

【0044】まず、第2の実施形態で使用する有機酸としては、クエン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ステアリン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、グリコール酸、安息香酸からなる群から選択される少なくとも*

膨潤容器：ステンレス304製/容量500リットル/搅拌机付き

膨潤剤：クエン酸ナトリウム

膨潤剤の使用量：10g/オキナワモズク1000g

*一つが挙げられる。また、pH値の調整のしやすさが良好で、しかも、高い抽出効率を得られることから、クエン酸を使用することがより好ましい。さらに、クエン酸と他の有機酸とを併用する場合にも、使用する有機酸の使用量を100重量%としたときに、そのうちクエン酸の使用量を、50重量%以上の値とすることが好ましく、70重量%以上の値とすることがより好ましく、90重量%以上の値とすることがさらに好ましい。

【0045】なお、有機酸を使用する場合、その使用量を、オキナワモズク1000gあたり、1~100gの範囲内の値とすることが好ましい。この理由は、有機酸の使用量が1g未満となると、単位時間あたりの抽出効率が著しく低下する場合があるためであり、一方、有機酸の使用量が1000gを超えると、不純物量が多くなり、フコイダンの抽出効率が低下する場合があるためである。したがって、抽出効率と、含まれる不純物量等とのバランスがより良好となることから、有機酸の使用量を、オキナワモズク1000gあたり、2~50gの範囲内の値とすることが好ましく、5~30gの範囲内の値とすることがさらに好ましい。

【0046】また、第2の実施形態において、製造設備に影響しない範囲で無機酸を使用することも好ましい。このような無機酸としては、例えば、ギ酸、塩酸、硫酸、硝酸からなる群から選択される少なくとも一つが挙げられる。ただし、製造設備に対する腐食を有効に防止するために、抽出工程のpHを3~6の範囲内の値とする必要がある。したがって、抽出剤の全体量を100重量%としたときに、無機酸の使用量を、50重量%未満の値とすることが好ましく、より好ましくは、0.1~30.0重量%の範囲内の値とすることであり、さらに好ましくは、1.0~10.0重量%の範囲内の値とすることである。

【0047】なお、第2の実施形態のさらなる変形例として、抽出工程において、有機酸と、無機酸とを、それぞれ別個に用いることも好ましい。ただし、その場合にも、製造設備に対する腐食を有効に防止するために、上述した無機酸の使用量の範囲内とすることが好ましい。

【0048】

【実施例】[実施例1]

(フコイダンの製造)塩蔵された250Kgのオキナワモズク(産地：今帰仁)を、流水で3回洗浄し、表面の塩分を取り除いた後、1000リットルの容器内に収容し、さらに水を流しながら1時間水道水に浸漬した。次いで、容器からオキナワモズクを取り出し、カッターミキサーを用いて、オキナワモズクの長さ(長辺)を約10mmとした。この小片化したオキナワモズクを、以下の膨潤条件で有機酸塩処理をした。

膨潤温度： 50
 膨潤時間： 1時間
 攪拌条件： プロペラ使用 / 回転数50rpm

【0049】次いで、以下の抽出条件でフコイダンを抽出し、さらに以下の後処理条件で、最終的に5Kgのフ*

抽出容器： ステンレス304製 / 容量500リットル / 攪拌機付き
 酵素： スミチームAC-1 (新日本化学工業(株)製、セルラーゼ系酵素)
 酵素の使用量： 2g / オキナワモズク1000g
 抽出温度： 50
 抽出pH： 4.0
 抽出時間： 2時間
 攪拌条件： プロペラ使用 / 回転数50rpm
 遠心分離： 回転数100,000rpm / 60分間
 限外濾過処理： 分画分子量6,000以下除去 / 処理時間180分間
 濃縮処理： フコイダン濃度を約2倍に濃縮
 粉末化： スプレードライ法
 (賦型剤として、デキストリンを重量比1:1で使用)
 / 平均粒子径(100メッシュ相当)

【0050】(フコイダンの評価)

(1)成分評価

アンスロン硫酸法により、得られたフコイダンパウダー中の含フコイダンを測定したところ、52.0重量%であった。また、カルバゾール法により、さらにフコイダン中のフコース硫酸含有多糖類量を測定したところ、23.0重量%であった。また、イオンクロマトグラフィにより、さらにフコイダン中の硫酸量を測定したところ、12重量%であった。さらに、550 加熱灰化法により、さらにフコイダン中の灰分を測定したところ、22重量%以下であり、105 加熱乾燥法により、フコイダン中の水分を測定したところ、6重量%以下であった。

【0051】(2)収率

原料のオキナワモズクの使用量を基準にして、得られたフコイダンパウダー中のフコースの収率を算出したところ、23%という高い値が得られた。

【0052】(3)平均分子量

ゲル濾過法により、得られたフコイダンパウダーの平均分子量(平均重量分子量)を測定したところ、180,000であった。よって、本発明が好ましいとする平均分子量の範囲内であることが確認された。

【0053】(4)細菌数

標準寒天培地法により、得られたフコイダンパウダーの一般細菌数を測定したところ、300個/g未満であることを確認した。また、得られたフコイダンパウダーの大腸菌群を、BGLB法にて測定したところ、陰性であることを確認した。

【0054】(5)抗癌作用

シャーレ上で標準寒天培地法により培養したヒト前骨髄性白血病細胞(5万個)に、得られたフコイダンパウダ

20 ーを1 μ g/mlの濃度で添加し、その状態で、培養を続けた。その結果、培養時間18時間で、細胞数は約3万個まで減少し、さらに培養を続けたところ、培養時間40時間で、細胞数は0(消滅)まで減少した。一方、フコイダンパウダーを添加しなかったコントロールでは、培養時間18時間で、細胞数は約6万個まで増加し、さらに培養を続けたところ、培養時間40時間で、細胞数は約15万個まで増加した。よって、得られたフコイダンパウダーは、ヒト前骨髄性白血病細胞に対する優れた抗癌作用を有することが確認された。

30 【0055】(6)アポトーシス誘導作用

シャーレ上で標準寒天培地法により培養したヒト前骨髄性白血病細胞(5万個)に、得られたフコイダンパウダーを1 μ g/mlの濃度で添加し、その状態で、培養を続け、アポトーシス(死細胞の割合)を測定した。その結果、培養開始時には、アポトーシスは約20%であったが、培養時間22時間で、アポトーシスは約70%まで増加し、培養時間48時間で、アポトーシスはさらに約90%まで増加し、培養時間70時間で、アポトーシスはさらに約100%まで増加し、細胞はすべて死細胞となった。一方、フコイダンパウダーを添加しなかったコントロールでは、培養開始時、培養時間22時間、48時間および70時間において、それぞれアポトーシスは約20%であり、アポトーシスの変化はみられなかった。よって、得られたフコイダンパウダーは、ヒト前骨髄性白血病細胞に対する優れたアポトーシス誘導作用を有することが確認された。

40 【0056】(7)腐食性

抽出容器を構成するステンレス304の小片(長さ10cm、幅2.54cm、厚さ0.1mm)を、100mlの酵素溶液(濃度50重量%)に浸漬し、温度50

に保持したところ、1000時間経過後も、2000時間経過後にも、特に腐食の観察は観察されなかった。

【0057】[実施例2]

(フコイダンの製造)抽出温度を50 から60 に上昇させ、抽出時間を2時間から1時間としたほかは、実施例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0058】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(2)収率、(3)平均分子量、(4)細菌数、(5)抗癌作用、(6)アポトーシス誘導作用、(7)腐食性をそれぞれ評価したところ、実施例2においても、実施例1と同様の結果が得られた。

【0059】[実施例3]

(フコイダンの製造)抽出剤(酵素)として、スミチームAC-1単独のかわりに、スミチームAC-1とクエン酸との混合物を使用したほかは、実施例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0060】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(2)収率、(3)平均分子量、(4)細菌数、(5)抗癌作用、(6)アポトーシス誘導作用、(7)腐食性をそれぞれ評価したところ、実施例3においても、実施例1と同等の結果が得られた。

【0061】[実施例4および5]

(フコイダンの製造)オキナワモズクとして、今帰仁産の塩蔵品のかわりに、知念産の生オキナワモズク(実施例4)および塩蔵品(実施例5)を使用したほかは、実施例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0062】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(2)収率、(3)平均分子量、(4)細菌数、(5)抗癌作用、(6)アポトーシス誘導作用、(7)腐食性をそれぞれ評価したところ、実施例4および5においても、実施例1と同等の結果が得られた。

【0063】[実施例6~8]

(フコイダンの製造)酵素として、スミチームACのかわりに、スミチームC(実施例6, セルラーゼ系, 新日本化学(株)製)、スミチームX(実施例7, セルラーゼ系, 新日本化学(株)製)およびスミチームMC(実施例8, ヘミセルラーゼ系, 新日本化学(株)製)を使用したほかは、実施例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0064】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(2)収率、(3)平均分子量、(4)細菌数、(5)抗癌作用、(6)アポトーシス誘導作用、(7)腐食性をそれぞれ評価したところ、実施例6および7に

については実施例1と同等の結果が得られ、実施例8については、若干収率が低い傾向が見られた。

【0065】[比較例1]

(フコイダンの製造)抽出剤として、0.2Nの塩酸を使用し、抽出工程のpHの値を2.0とし、抽出温度を25 にし、抽出時間を16時間としたほかは、実施例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0066】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(3)平均分子量、(7)腐食性をそれぞれ評価した。その結果、抽出剤による腐食性が確認され、得られたフコイダンパウダーの平均分子量は70,000であった。なお、成分評価については、実施例1と同等であった。

【0067】[比較例2]

(フコイダンの製造)比較例1の抽出温度を25 から95 にしたほかは、比較例1と同様にフコイダンパウダーを製造した。

【0068】(フコイダンの評価)実施例1と同様に、得られたフコイダンパウダーについて、(1)成分評価、(3)平均分子量、(7)腐食性をそれぞれ評価した。その結果、抽出剤によるさらなる腐食性が確認され、得られたフコイダンパウダーの平均分子量は100,000以下であった。なお、成分評価については、実施例1と同等であった。

【0069】

【発明の効果】以上、詳細に説明したように、本発明のフコイダンの抽出方法によれば、使用する酵素の種類を限定することなく、製造設備における腐食等の問題がなく(一例として、1000時間以上腐食が発生しない。)、しかも所望の平均分子量(一例として、100,000~500,000の範囲内の値)を有するフコイダン(フコイダンパウダー)が効率的に得られるようになった。また、本発明のフコイダンの抽出方法の好適態様によれば、抽出剤として、有機酸を使用することにより、製造設備における腐食等の問題がないばかりが、さらに高い抽出効率を得られるようになった。

【図面の簡単な説明】

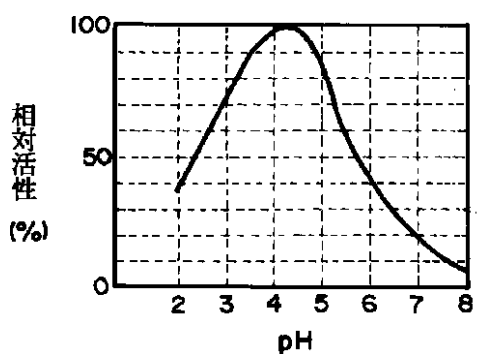
【図1】セルラーゼ系酵素におけるpH値と、相対活性との関係を示す図である。

【図2】セルラーゼ系酵素におけるpH値と、残存活性との関係を示す図である。

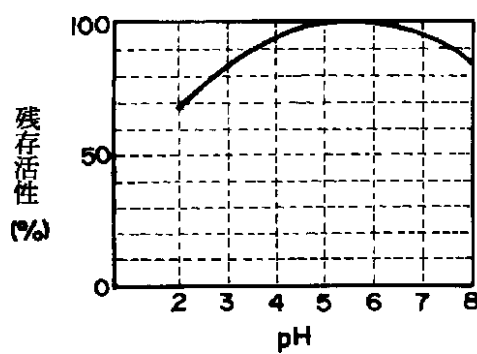
【図3】セルラーゼ系酵素における温度と、相対活性との関係を示す図である。

【図4】セルラーゼ系酵素における温度と、残存活性との関係を示す図である。

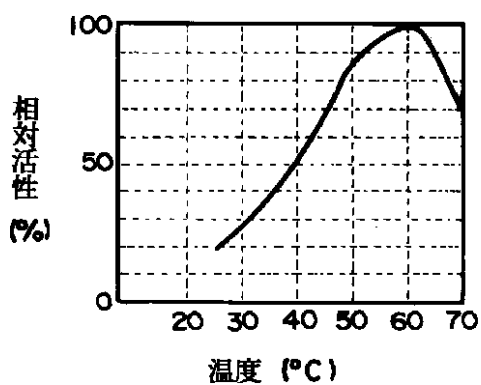
【図1】



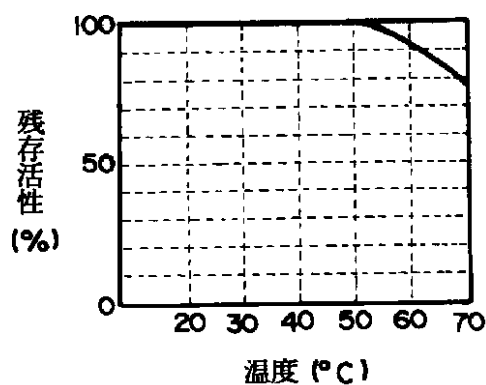
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テームコード(参考)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/00

6 3 5

A 6 1 K 35/80

35/80

Fターム(参考) 4B064 AF11 BA16 CA05 CA08 CA21
 CC03 CC06 CC07 CD07 DA01
 DA03 DA05 DA06 DA08
 4C088 AA13 AC15 BA12 BA26 BA27
 CA02 CA18 CA23 CA25 NA20
 ZA51 ZA54 ZA68 ZB26 ZC33
 ZC55