醸造副産物を活用した美容製品の開発に関する研究

食品コスメ部
岩元彬　柘植圭介
宮島醤油株式会社
尾上亜美

食酢発酵時に形成する酢酸菌膜の美容効果を評価するため，酢酸菌膜エキスのヒト線維芽細胞由来エラスターゼへの影響を調べた結果，酢酸菌膜エキスは濃度依存的にエラスターゼ活性を阻害した．続いて，酢酸菌膜エキス成分中のエラスターゼ活性阻害因子を特定するため，簡易ゲル濾過カラム及び固相抽出カラム，低分子用サイズ排除クロマトカラムを用いて分画したところ，172-556 Da の Fraction 14 に強いエラスターゼ活性阻害作用を認めた．LC-MS を用いた成分の分析の結果，Fraction14 には 2-4 個のアミノ酸からなるペプチドが多く含まれることが示された．なかでも，ピークエリアの大きかった A，P，S，L からなるペプチドに着目し，合成した 8 個のペプチドのエラスターゼへの影響を評価したところ，SLPA と SLPA が著しいエラスターゼ活性阻害を示した．また，LC-MS/MS を用いた解析では，Fraction 14 中に SLPA が検出された．これらの結果から，酢酸菌膜エキスがエラスターゼ活性を阻害することを見出し，その活性成分の一つは SLPA ペプチドであることを明らかにした．本研究によって，酢酸菌膜がシワやタルミの原因となるエラスチン分解を抑制する効果を有する可能性を示すことができた．

1. はじめに

佐賀県では，地域創生の取り組みとして，「美と健康に関するコスメティック産業を集積させ，コスメに関連する自然由来原料の供給地となることを目指すコスメティック構想」を推進しており，当センターでも県内素材の美容効果の検証を行ってきた．その結果，イチゴ葉エキスやレンコンポリフェノールが炎症性サイトカインやコラゲナーゼ産生を抑制することや[1-3]，キヌアがコラーゲン産生増強効果や分解阻害効果を有すること[4]，褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分 Sargahydroquinoic acid や Sargaquinoic acid を含むこと等を見出してきた[5]．

また，近年では地域資源そのものだけでなく，微生物発酵により，美容機能を高めた発酵化粧品が注目されている．発酵化粧品成分としてはコウジ酸やグルコシルセラミドなどがよく知られるが[6,7]，最近はライスパワーエキスなど地域の伝統産業を活かした発酵化粧品原料が開発されるようになってきた[8]．

食酢は，古くから調味料として広く親しまれている発酵食品であり，伝統的な製造方法として静置発酵法が知られている．静置発酵法は，発酵液の表面に酢酸菌が膜を形成し，酸素を取り込みながら緩やかに発酵が進行する発酵法であり，製造された食酢はまろやかな風味であることが特徴である．

静置発酵法では，チリメン状の薄い菌膜形成が発酵に適するが，酢酸濃度の上昇による低 pH 環境への耐性機構として，発酵の進行に伴い菌膜が厚く形成することがある．一般に，発酵を終えた菌膜は廃棄されるが，厚く成長した菌膜には酢酸菌体に加えて多糖類やアミノ酸をはじめとする多様な成分が含まれており，サスティナブル素材としての活用が期待される．

酢酸菌膜の美容分野での利用については，構成成分の一つであるバクテリアセルロースが，美容成分を浸透・保持するためのフェイスマスク基材等，物理的担体として研究されているが[9-11]，酢酸菌膜そのものの美容機能性については明らかになっていない．

そこで，本研究では酢酸菌膜エキスの肌のシワ形成やハリ低下を引き起こすヒト真皮由来エラスターゼへの影響を評価することにより，化粧品原料としての有用性を評価した．

2. 実験方法

2.1 酢酸菌膜エキスの調整

酢酸菌膜は宮島醤油株式会社の食酢製造時に形成した酢酸菌膜を使用した．酢酸菌膜エキスは，凍結乾燥した酢酸菌膜に 20 倍量の水を加え，撹拌した後

に遠心して得られた上澄み液を濃縮乾燥することにより得た．エラスターゼ活性阻害率の測定には，特定濃度に水で調製した酢酸菌膜エキスを用いた．

2.2 酢酸菌膜エキスの分画

酢酸菌膜エキスを分子量の大きさを指標にEcono-Pac 10DG columns (Bio-rad) を用いて分画した．まず，カラムを 20 mL の水で平衡化した後，3 mL の酢酸菌膜エキスを添加した．その後，4 mL の水を加え，6 kDa 以上の Fraction H を回収した．続いて，4 mL の水を新たに添加し，得られた濾液を Fraction L1 とした．この操作を繰り返し，Fraction L2，L3，L4 を回収した．

また，酢酸菌膜エキスを分子の疎水性相互作用を指標に固相抽出法を用いて分画した．まず，メタノールを用いて固相抽出樹脂（Sep-Pak Vac C18, 2 g（Waters））を活性化し，水で平衡化した後に酢酸菌膜エキスをアプライした．カラムを水で洗浄後，メタノールの濃度を 20, 40, 60, 80, 100% (v/v)と上げ，30 mL の溶媒で順次溶出させた．溶出液はそれぞれ，Fraction 20%Me，40%Me，60%Me，80%Me，100%Me とした．

分画液は乾燥し，固形物を所定濃度になるように溶解させ，エラスターゼへの影響評価に使用した．

2.3 サイズ排除クロマトグラフィーによる分画

試料溶液は，精密ろ過の後，表 1 に示すサイズ排除クロマトグラフィーの条件で分析した．LC（Prominence, Shimadzu）は，サイズ排除クロマトグラフィーカラム（Superdex peptide HR 10/30, GE Healthcare）を用いて実施した．検出は UV 214 nm で行った．

2.4 LC-MS を用いた成分分析

試料溶液は，精密ろ過の後，LC-MS に供した．LC（Vanquish UHPLC, Thermo Fisher Scientific）は，ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより実施し，移動相は 0.1%ギ酸含有水と 0.1%ギ酸含有アセトニトリルの 2 液混合系によるグラジエント溶離とした．検出は LC 部のフォトダイオードアレイ (PDA) 検出とオービトラップ MS 検出（Q Exactive, Thermo Fisher Scientific）の両方で行った．LC-MS の条件の詳細は表 2 に示した．

得られたデータは低分子データ解析ソフトウェア Compound Discoverer（Thermo Fisher Scientific）による化合物推定解析を実施した．検出されたピークの主要 MS 及び MS/MS スペクトル情報と MS スペクトルライブラリー（mzCloud, Metabolika 及び Chem Spider）とのマッチングを行った．

2.5 ヒト線維芽細胞エラスターゼ活性阻害率の測定

線維芽細胞からエラスターゼを含む粗酵素液を調製するため，コンフレントに培養したヒト新生児由来線維芽細胞を剥離し，リン酸生理食塩水 (PBS(-)) で 2 回洗浄した後，2.0×10^6 cells/mL となるように 0.5%Triton-X100 溶液（TCI）を加えた．室温で 30 分静置後，10,000*g* で 5 分間遠心分離し，得られた上澄み液を粗酵素液とした．

96well プレートに 25 µL の試料溶液，50 µL の 5 mM Suc-Ala-Ala-Ala-pNA/1mM フッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）含有 0.1M トリス塩酸緩衝液（pH8.0），25 µL の粗酵素液を加え，37℃で 2 時間インキュベートした．その後，マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定し，エラスターゼ活性阻害率（式（1））を算出した．

$$[\text{エラスターゼ活性阻害率 \%}] = \left(1 - \left(\frac{[A_{Sample}] - [A_{Negative}]}{[A_{Positive}] - [A_{Negative}]}\right)\right) \times 100 \quad (1)$$

表１　サイズ排除クロマトグラフィー条件

HPLC	装置	Prominece (Shimadzu)
	カラム	Superdex peptide HR 10/30 (GE Helthcare)
	移動相	Acetonitrile/water/trifluoroacetic acid = 30/70/0.1 (v/v/v)
	流速	0.6 mL/min
	カラム温度	40°C
	検出器	UV 214 nm

表２　LC-MS 条件

HPLC	装置	Vanquish (Thermo Fisher Scientific)
	カラム	Cadenza CDC18 (2 mm I.D. x 250 mm with guard) (Imtakt Corp.)
	移動相	A: Water/HCOOH = 100/0.1 (v/v) B: Acetonitrile/HCOOH = 100/0.1 (v/v) B 3%(0 to 5 min) ,B 3-40% with linear gradient to 5-45 min, B 100% to 45.5-60 min
	検出	MS &MS/MS
	注入量	3 µL
MS	装置	Q-exactive（Thermo Fisher Scientific)
	イオン源	ESI
	極性	Positive ion mode
	検出	Orbitrap
	m /z範囲	134-1,500 m/z

ここで，$[A_{sample}]$は酢酸菌膜エキス等の試料を添加した場合の吸光度を，$[A_{positive}]$はコントロールにおける吸光度を，$[A_{negative}]$は粗酵素液を添加しない場合のコントロールにおける吸光度を示している．

2.6 統計解析

得られたデータは，GraphPad PRISM 11 (GraphPad Software Inc.)を用い，*student's t* test もしくは one-way ANOVA で解析した．

3. 結果及び考察

3.1 酢酸菌膜エキスのエラスターゼ活性への影響

酢酸菌膜エキスのヒト線維芽細胞エラスターゼへの影響を検討した．その結果，酢酸菌膜エキスは濃度依存的にエラスターゼ活性を阻害した（図 1）．また, IC50（標的の活性を 50%にする濃度）は 320 μg/mL であった．

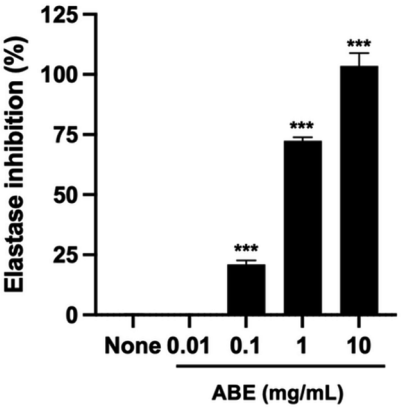
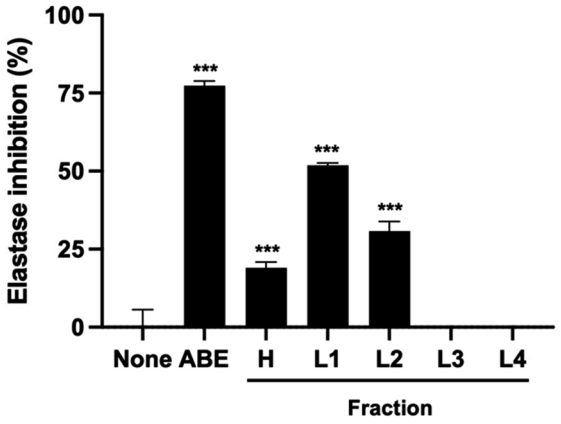


図 1　酢酸菌膜エキスのエラスターゼ活性阻害
ABE：酢酸菌膜エキス．測定値は 3 点の平均値であり，エラーバーは標準偏差を示す. ***p<0.001 vs None を示す.

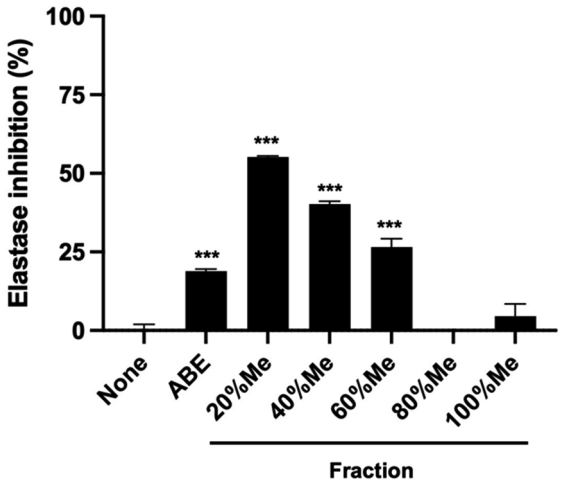
3.2 酢酸菌膜エキスの分画

酢酸菌膜エキスに含まれるエラスターゼ活性阻害因子の特徴を調べるため，簡易ゲル濾過カラムを用いて分子量を指標に成分を分画した．Fraction H は 6 kDa 以上で，Fraction L1 から L4 になるにつれ，含まれる成分の分子量は小さくなる．これらの画分のエラスターゼへの影響を調べたところ, Fraction H, L1, L2 が活性を阻害し，特に Fraction L1 は最も高い阻害率を示した（図 2A）．

続いて，Fraction 1 を固相抽出により分画し，エラスターゼへの影響を調べたところ，Fraction 20%Me, 40%Me, 60%Me の順で有意にエラスターゼ活性を阻害し，特に 20%Me は最も高い阻害率を示した（図 2B）．



（A）簡易ゲル濾過カラムによる分画



（B）固相抽出カラムによる分画

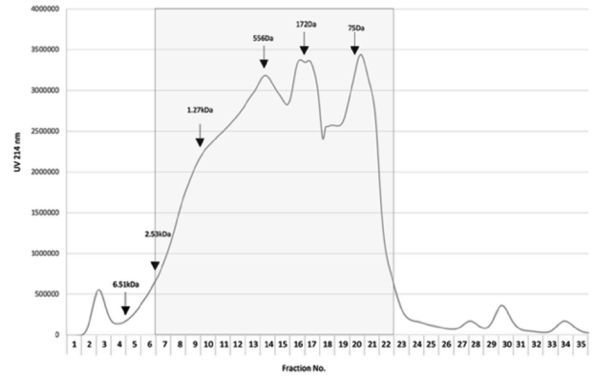
図 2　酢酸菌膜エキス画分のエラスターゼ活性阻害
（A）ABE : 1mg/mL，Fraction H，L1-L4 : 2.5% (v/v)（B）ABE : 0.1 mg/mL，20-100%Me：0.1mg/mL．測定値は 3 点の平均値であり，エラーバーは標準偏差を示す. ***p<0.001 vs None を示す.

3.3 サイズ排除クロマトグラフィー解析

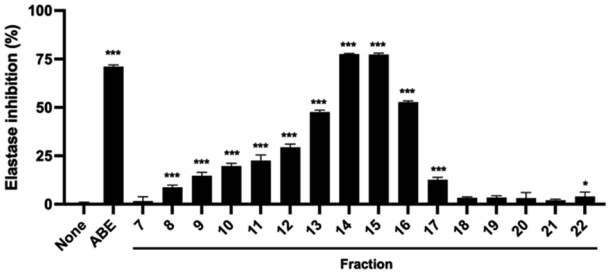
Fraction 20%Me に含まれる成分の分子量を調べるため，サイズ排除クロマトグラフィーに供したところ, 図 3A に示すようなクロマトグラムが得られた．特に大きなピークが存在する Fraction 7-22 を回収し，エラスターゼへの影響を調べたところ，Fraction 14 と 15 が強くエラスターゼ活性を阻害した（図 3B）．そのため，172-556 Da 付近の Fraction 14，15 にはエラスターゼ阻害活性因子が多く含まれるものと推察された．

3.4 LC-MS 解析

回収率の高かった Fraction 14 に着目し, LC-MS を用いて含有成分の分析を行った．分析結果を Compound Discoverer に供し，同定されたピークのうち，[Fraction 13/Fraction 14] 比が 0.5 より小さいものから，Area 値が大きい 5 つのピークを選抜し，構造



（A）クロマトグラム



（B）エラスターゼ活性阻害率

図 3　サイズ排除クロマトグラフィー画分のエラスターゼ活性阻害

ABE：1 mg/mL．測定値は 3 点の平均値であり，エラーバーは標準偏差を示す. *p<0.05，**p<0.01，***p<0.001 vs None を示す.

表 3　LC-MS により推定された成分

No.	Name	Formula	m/z	Area
1	Pregablin	$C_8H_{17}O_2$	160.13295	1622552579
2	Ala-pro-ser-leu	$C_{17}H_{30}N_4O_6$	387.22307	1499895647
3	Leu-leu	$C_{12}H_{24}N_2O_3$	245.18546	1396541927
4	Leu-gly-leu	$C_{14}H_{27}N_3O_4$	302.20675	1081311696
5	Pro-val-val	$C_{15}H_{27}N_3O_4$	314.20654	950134213
6	Arg-pro	$C_{11}H_{21}N_5O_3$	272.17116	817671910

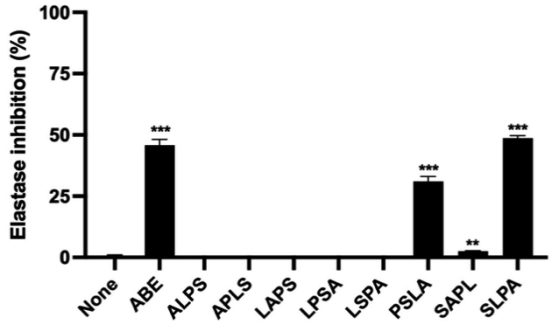
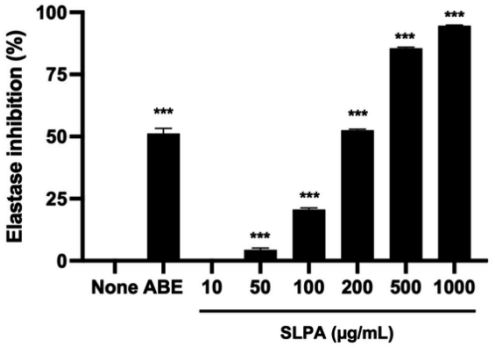


図 4　合成ペプチドのエラスターゼ活性阻害

ABE：1 mg/mL．ペプチド：200 μM．測定値は 3 点の平均値であり，エラーバーは標準偏差を示す. **p<0.01，　***p<0.001 vs None を示す.



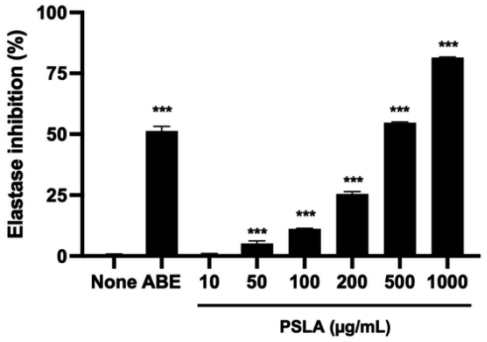


図 5　SLPA と PSLA のエラスターゼ活性阻害

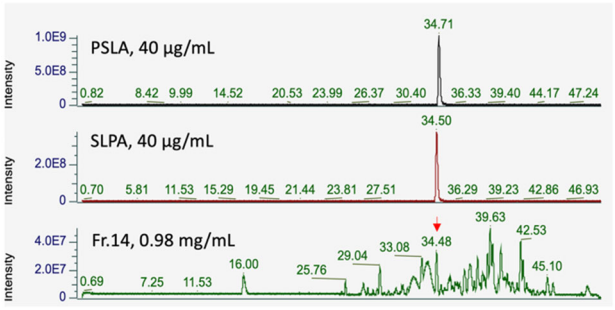
ABE：1 mg/mL．測定値は 3 点の平均値であり，エラーバーは標準偏差を示す. ***p<0.001 vs None を示す.

推定した．表 3 に示すように，上位 6 つのうち 5 つはいずれも 2 から 4 個のアミノ酸からなるペプチドであった.

そこで, 最も Area 値が大きかった A（Ala）, P（Pro）, S（Ser），L（Leu）からなるペプチドに着目し，無作為に 8 つのペプチドを合成し，エラスターゼへの影響を調べた. その結果, SLPA と PSLA がエラスターゼ活性を阻害し，特に SLPA が強い阻害作用を示した（図 4）．また，SLPA 及び PSLA は濃度依存的にエラスターゼ活性を阻害し, IC50 値はそれぞれ 208.4 μM，395.1 μM であった（図 5）.

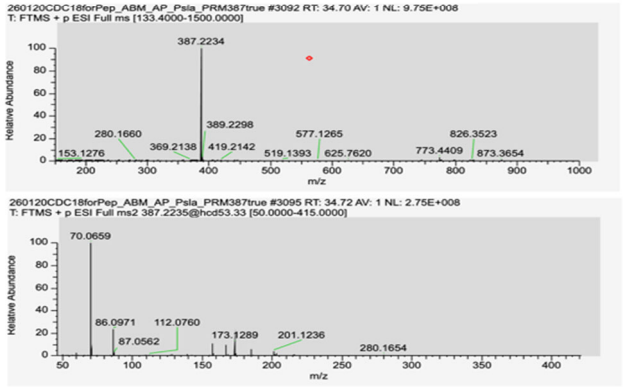
続いて，LC-MS を用いて Fraction 14 に SLPA と PSLA が含まれるか解析したところ，保持時間 34.48 のピークのマススペクトルが SLPA と考えられた（図 6A）．また，MS/MS 解析したところ，Fraction 14 と SLPA のフラグメントに m/z 187.108（Pro-Ala）と推定されるペプチドが検出された（図 6B）．そのため，Fraction 14 に SLPA が含まれることが示唆された. また, ピークの Area 値から算出された Fraction 14 の SLPA 量は 2.51 mg/g であった.

食酢の美容機能については，韓国の穀物酢 15 種

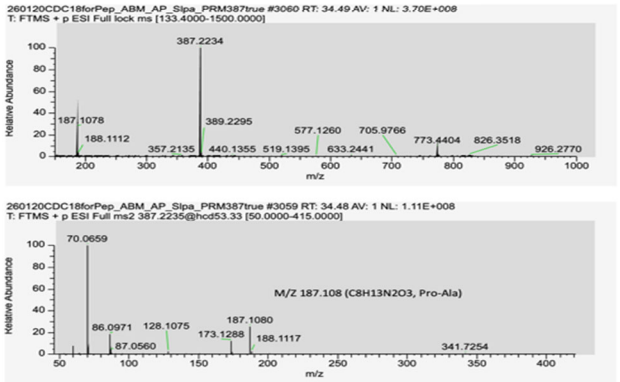


（A）MS（陽イオンモード）検出

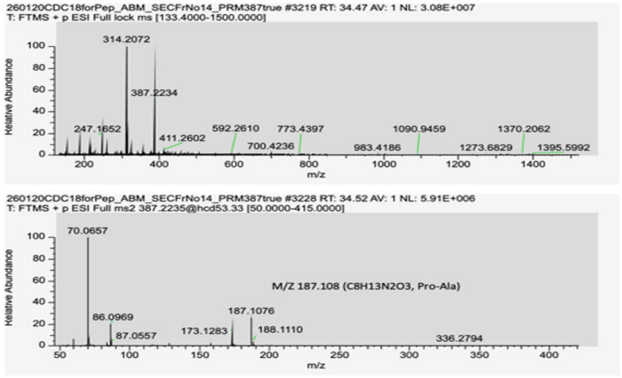
PSLA 40 µg/mL



SLPA 40 µg/mL



Frac.14 0.98 mg/mL



（B）MS/MS 検出

図 6　Fraction 14 の LC-MS/MS 分析

類及び柿酢 14 種類がコラゲナーゼ及びチロシナーゼを阻害し，穀物酢においては遊離アミノ酸含量とこれらの阻害作用に相関性があることや[12]，食酢の原料にアントシアニンを豊富に含む紫黒米を使用した紫黒米酢が抗酸化活性に優れることが報告されているがエラスターゼ活性の阻害作用については報告されていない[13]．

また，ペプチドのエラスターゼ活性阻害について，クルミ（*Juglans regia* L.）の FFVPF（Phe-Phe-Val-Pro-Phe）がエラスターゼ活性を阻害することや[14]，ウシエラスチン加水分解物中の Gly，Ala，Val，Pro を含むペプチドが高いエラスターゼ阻害活性を示し[15]，バイオインフォマティクス解析からエラスターゼと Gly，Ala，Val，Pro，特に Gly と Ala に対して高い親和性を示すことが報告されている[16]．これらの知見から，本研究で特定した酢酸菌膜エキス中のエラスターゼ活性阻害ペプチドは SLPA であり，Pro や Ala が含まれるため，エラスターゼに結合することにより，酵素活性を阻害したことが示唆された．

4. おわりに

本研究では，食酢製造時に形成される酢酸菌膜から抽出エキスを作製し，美容効果を検証した．その結果，酢酸菌膜エキスはヒト線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害し，肌ハリの維持やシワの形成予防といったアンチエイジング効果を有することが示唆された．さらに，酢酸菌膜エキスを分画し，エラスターゼへの影響を評価したところ，SLPA がエラスターゼ活性を阻害することを見出した．したがって，酢酸菌膜エキス中の有効成分の一つは SLPA であることが明らかになった．

今後は，酢酸菌膜エキス及び SLPA のヒト皮膚への有効性を調べることにより，より美容効果が明確になることが期待される．

なお，研究を実施するにあたって使用したイオントラップ型高速液体クロマトグラム質量分析システム（LC-MS）及びマイクロプレートリーダーは，電源立地地域対策交付金で導入した機器である．

参考文献

1) 柘植圭介, 岩元彬, 松浦洋一, 霜尾毅, 植田義敬, 田中一平, 竹田健太郎, イチゴ葉の化粧品・美容食品サスティナブル原料化に関する研究, 2022, 令和 4 年度佐賀県工業技術センター研究報告書
2) 山内良子，岩元彬，吉村裕美，柘植圭介，炎症性サイトカイン産生抑制用の組成物，2020，特許

第 6667773 号
3) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, et al. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro. *Cytotechnology*. 2022;74(2):309-317.
4) 岩元彬，柘植圭介，鶴田裕美，三田かおり，コラゲナーゼ活性阻害用組成物及びコラーゲン産生促進用の組成物，2022，特開 2022-139538
5) 柘植圭介，岩元彬，鶴田裕美，山内良子，藻類の産業利用に関する可能性研究（第 2 報），2018，平成 30 年佐賀県工業技術センター研究報告書，19-31.
6) 伊賀和宏，横田紗綾，中井大助，中山秀夫，陳科榮，コウジ酸の顔面黄ぐすみに対する改善効果，西日本皮膚科，3(77)，244-249(2015)
7) Miyagawa M, Fujikawa A, Nagadome M, Kohama K, Ogami T, Kitamura S, Kitagaki H, Glycosyl-ceramides purified from the japanese traditional non-pathogenic fungus aspergillus and koji increase the expression of genes involved in tight junctions and ceramide delivery in normal human epidermal keratinocytes. Fermentation, 5(2), 43(2019)
8) 松野孝祐，徳山孝仁，大久保明，徳山孝，各種機能性を有する米発酵エキスの研究開発，化学と生物，2(57)，129-133(2019)
9) Perugini P, Bleve M, Redondi R, Cortinovis F, Colpani A, In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facialmasks as active delivery systems to skin. *J Cosmet Dermatol*. 19(3), 725–735(2020)
10) Fonseca D.F.S., Vilela C., Pinto R.J.B., Bastos V., Oliveira H., Catarino J., Faísca P., Rosado C., Silvestre A., Freire C. Bacterial nanocellulose-hyaluronic acid microneedle patches for skin applications: In vitro and in vivo evaluation. Mater. *Sci. Eng. C*. 118(2021)
11) Oliveira TJ, Segato TCM, Machado GP, Grotto D, Jozala AF, Evolution of bacterial cellulose in cosmetic applications: an updated systematic review. *Molecules*. 27(23), 8341(2022)
12) Yu HH, Jang S-W, Kim E, Kim J-C, Jang M, Quality status and skin-related functional properties of traditional korean fermented vinegars. *Foods*, 14(15), 2728, (2025)
13) 水野裕一、宮島清一、加藤富民男、柘植圭介、焼酎麹を用いた色調および呈味性を改良した紫黒米酢の製造、生物工学会誌、7(100)、346-353(2022)
14) Xiong Y, Peng P, Chen SJ, Chang M, Wang Q, Yin SN, Ren DF, Preparation, identification, and molecular docking of novel elastase inhibitory peptide from walnut (Juglans regia L.) meal. Food Chem, 5(100139), (2022)
15) Liu Y, Su G, Zhou F, Zhang J, Zheng L, Zhao M, Protective effect of bovine elastin peptides against photoaging in mice and identification of novel antiphotoaging peptides. *J Agric Food Chem*. 66(41), 10760-10768(2018)
16) Taddese S, Weiss AS, Neubert RH, Schmelzer CE. Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biol*. 27(5), 420-428(2008)