

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4892727号
(P4892727)

(45) 発行日 平成24年3月7日(2012.3.7)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int. Cl.

C 1 2 P 17/06 (2006.01)

F 1

C 1 2 P 17/06

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2006-256071 (P2006-256071)	(73) 特許権者	504258527 国立大学法人 鹿児島大学
(22) 出願日	平成18年9月21日(2006.9.21)		鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(65) 公開番号	特開2008-72961 (P2008-72961A)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(43) 公開日	平成20年4月3日(2008.4.3)		
審査請求日	平成21年3月5日(2009.3.5)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100101904 弁理士 島村 直己
		(72) 発明者	松尾 友明 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子タンニンの酵素的架橋反応

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高分子タンニン水溶液を過酸化水素及びペルオキシダーゼで処理することを特徴とする高粘性溶液、ゲル又は樹脂の製造方法。

【請求項2】

高分子タンニンが縮合型タンニンである請求項1記載の方法。

【請求項3】

縮合型タンニンがカキタンニンである請求項2記載の方法。

【請求項4】

ペルオキシダーゼ1mg当たり過酸化水素24～48mM用いる請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高分子タンニンの酵素的架橋反応による高粘性溶液、ゲル及び樹脂の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タンニンは、植物の幹、皮、葉、実等から抽出される天然物であり、一般に皮なめし剤として用いられている環境に優しい物質である。タンニンには、ピロガロール系の加水分 20

解型タンニンとカテコール系の縮合型タンニンがある。加水分解型タンニンは比較的分子量であることも手伝って、漢方薬など多くの植物材料から単離、同定が進み、基礎的な研究がほとんどこの型のタンニンだけを用いてなされていた。一方、縮合型タンニンは明確には同定されていなかった。1989年Weingesは無色の植物抽出物を酸で加熱した際にアントシアニジンを生じる物質をプロアントシアニジンと名づけた。そして構成成分がflavan-3-olsで複数の連結したフラボノイド単位からなる物質をプロアントシアニジンと定義づけた。従来縮合型タンニンと呼ばれていた多くの果実成分の実体がプロアントシアニジンポリマーであることが明らかにされ、縮合型タンニン（プロアントシアニジンポリマー）に関する研究が多くなされている。

【0003】

10

前記タンニンの原料となる植物は植林等により供給することができ、前記植林のサイクルは、例えば、南アフリカのブラックワットルの場合、10年サイクルといわれている。従って、前記タンニンは、南洋材の伐採のように地球環境に負荷をかけることなく持続的に供給することができ、石油製品から製造される合成樹脂等のように資源の枯渇を顧慮する必要もない。

【0004】

高分子タンニンは天然ポリフェノールが持つ抗酸化・活性酸素除去作用、タンパク質との結合性、重金属との結合、アルカロイドやアルデヒドとの結合などの性質を有し、抗菌性、抗酸化性、消臭性、抗ウイルス、抗ダニ性ゲル、及びタンパク質、重金属、アルカロイドの吸着樹脂の材料としての用途が期待されている。

20

【0005】

本発明者は、ホウ酸、リン酸、カルシウム塩等を用いて架橋を行い、高分子タンニンのゲルを作成する技術について既に特許出願をしている（例えば、特許文献1参照）。

【0006】

一方、高分子タンニンと酵素（タンパク質）は一般に強く結合して、沈澱を作るため、多くの酵素も失活して作用しないことが知られている（例えば、非特許文献1参照）。

【0007】

【特許文献1】国際公開第2006/085541号パンフレット

【非特許文献1】農業および園芸、第75巻、第1号（2000年）第3～13頁、果実のタンニンと関連化合物の化学と利用〔1〕

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、化学薬品を用いずに、高分子タンニンに新たな物性を付与し、ヒトや環境に優しい製品として高分子タンニンの有効利用を図ることである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記課題に鑑み研究を重ねた結果、本発明者は、高分子タンニンの高粘度化、ゲル化及び樹脂化に成功し、本発明を完成した。

【0010】

40

即ち、本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 高分子タンニン水溶液を過酸化水素及びペルオキシダーゼで処理することを特徴とする高粘性溶液、ゲル又は樹脂の製造方法。

(2) 高分子タンニンが縮合型タンニンである前記(1)に記載の方法。

(3) 縮合型タンニンがカキタンニンである前記(2)に記載の方法。

(4) ペルオキシダーゼ1mg当たり過酸化水素2.4～4.8mM用いる前記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法によって得られる高粘性溶液。

(6) 前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法によって得られるゲル。

(7) 前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法によって得られる樹脂。

50

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、高分子タンニンの特性を生かした高粘性溶液、ゲル及び樹脂を温和な条件で作成することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

タンニンは、植物の幹、皮、葉、実等から抽出される天然物であり、環境に優しい物質である。タンニンには、ピロガロール系の加水分解型タンニンとカテコール系の縮合型タンニンがある。

10

【0013】

本発明に用いる高分子タンニンとは、植物の幹、皮、葉、実等から熱水やアルコール等で抽出されるポリフェノール重縮合体であり、渋みを呈し、多くのタンパク質と強く結合して沈殿を生じるものをいい、通常分子量は約2千～約100万であり、好ましくは分子量1万以上のものを用いる。本発明においては、加水分解型及びカテコール系の縮合型のいずれの高分子タンニンを用いてもよいが、カテコール系の縮合型タンニンが好ましい。高分子タンニンとしては、例えばケブラチョタンニン、ミモザタンニン、ワットルタンニン等の心材や樹皮に含まれる高分子タンニン；バナナ、リンゴ、カキ等の未熟果実に含まれる高分子タンニン；キャロブ豆、ブドウ等の未熟なサヤや種子に含まれる高分子タンニンが挙げられる。

20

【0014】

一般に「タンニン」と呼ばれる緑茶や紅茶に含まれるカテキン等のポリフェノールは低分子であるため、皮の鞣し作用はほとんどなく、タンパク質との結合も弱く、分子量もカテキンが290で、大きなものでも400から500であり、本発明に用いる高分子タンニンとは異なる。

【0015】

前記タンニンは、原料から抽出後、通常は乾燥して粉末として用いられる。下記の実施例では、前記粉末のタンニンを水に溶解したものを前記タンニン水溶液として用いたが、原料からの抽出液をそのままタンニン水溶液として用いてもよい。

【0016】

高分子タンニンの原材料（例えば、カキタンニンでは柿渋）には、高分子タンニン以外に有機酸、アミノ酸等が含まれているため、必要に応じて精製して、これらの不純物を除去したものをを用いてもよい。

30

【0017】

本発明において、高分子タンニン水溶液における高分子タンニン濃度は、通常0.5～10重量%、好ましくは1～4重量%、更に好ましくは1.5～3重量%であり、pHは、通常4～10、好ましくは5～9、更に好ましくは5.5～7である。必要に応じて、緩衝液や、薄い塩酸、硫酸、酢酸、クエン酸等の酸、又は薄い水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、アンモニア等の塩基によりpHを調整してもよい。

【0018】

本発明においては、高分子タンニン水溶液を過酸化水素及びペルオキシダーゼで処理することにより、高粘性溶液、ゲル又は樹脂を製造することができる。

40

【0019】

本発明に用いるペルオキシダーゼは、 $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + A$ （ AH_2 は電子供与体）の反応を触媒する酸化還元酵素であり、動物や植物、微生物由来のもの、また遺伝子工学的手段により得られたものが利用できる。本発明においてペルオキシダーゼは、過酸化水素を酸化剤として、高分子タンニンのフェノール性水酸基を酸化する反応を触媒する。低分子ポリフェノールに関する一般的な反応においては、ペルオキシダーゼによりフェノール性水酸基が酸化されてキノンが形成され、この反応性の高いキノンが周辺のベンゼン環やフェノール性水酸基と反応するため架橋が起こると推察されており、高分子タ

50

ンニンにおいては、主に同様の反応が起こっていると推測されるが、詳細は検討中である。ペルオキシダーゼの反応溶液中の濃度は、反応溶液 1 ml 当たり、通常 0.01 ~ 100 mg、好ましくは 0.1 ~ 10 mg である。

【0020】

過酸化水素は、通常 0.01 ~ 1 M 水溶液として用いられる。過酸化水素の反応溶液中の濃度は、ペルオキシダーゼ 1 mg 当たり、通常 15 ~ 100 mM、好ましくは 20 ~ 40 mM である。

【0021】

処理温度は、通常 0 ~ 70 °C、好ましくは 10 ~ 70 °C、更に好ましくは 20 ~ 40 °C、最適温度は 30 °C 付近であり、処理時間は、通常 30 秒 ~ 48 時間、好ましくは 30 分 ~ 24 時間である。

10

【0022】

反応は、静置反応及び攪拌反応のいずれでもよいが、収率の点で、静置反応が好ましい。

【0023】

高分子タンニンの水溶液中の濃度や架橋の程度を調節することにより、目的に応じて、高分子タンニンの高粘性溶液、ゲル又は樹脂を適宜製造することができる。

【0024】

通常、数%以下の高分子タンニン水溶液中の高分子タンニンの分子間を軽度架橋すると分子サイズが更に大きくなるため、粘度が高くなる。本発明において、高粘性溶液とは、ゲル化や沈殿が生じない状態で水溶液のままであるものをいう。

20

【0025】

高粘性溶液の状態に近いもので、高分子タンニンの分子間を中程度に架橋すると、豆腐、コンニャク、寒天のように、水溶液がもとの体積をほぼ維持したまま全体が固化し、水分含量が高いままの状態をゲルという。架橋が引き金となり、分子間で水素結合、疎水結合、イオン性相互作用、ファンデルワールスの相互作用などが働き、固化すると考えられる。

【0026】

高分子タンニンの濃度も高く、分子間の架橋程度も高いと、水分含量が低く、密度の高い物質が生じるが、本発明において、これを樹脂という。多くの場合は架橋反応が進むと水に対する溶解度が低下するため、水が分離して、沈殿となる。

30

【0027】

本発明には、必要に応じ本発明の効果を損なわない範囲で、各種添加剤を用いることができる。

【実施例】

【0028】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0029】

以下の実施例において、カキタンニンとしては丸善製薬株式会社（尾道、広島県）から入手した、精製したカキタンニン粉末を用い、ペルオキシダーゼとしては西洋わさびペルオキシダーゼを用いた。

40

【0030】

（実施例 1）過酸化水素量による反応生成物量の変化

精製したカキタンニン溶液、0.36 M 過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って反応を行い、反応生成物（生じた沈殿物あるいはゲルの乾燥物）の量を測定した。結果を図 1 に示す。

（a）タンニン濃度：終濃度 4 %

（b）過酸化水素量：終濃度を 0 mM ~ 96 mM に変化させた。

（c）ペルオキシダーゼ量：1 mg / 2 ml

50

(d) 反応液：総量 2 ml

(e) pH：リン酸緩衝液を用いて 5.8 に調整した。

【0031】

(実施例 2) ペルオキシダーゼ量による反応生成物量の変化

過酸化水素量の終濃度を 36 mM とし、ペルオキシダーゼ量を 0.25 mg / 2 ml ~ 2 mg / 2 ml に変化させた以外は、実施例 1 と同様に処理した。

結果を図 2 に示す。

【0032】

(実施例 3) タンニン濃度による反応生成物量の変化

過酸化水素量の終濃度を 36 mM とし、タンニン濃度を終濃度 1.25% ~ 10.0% に変化させた以外は、実施例 1 と同様に処理した。 10

結果を図 3 に示す。

【0033】

(実施例 4) 濁度測定による反応生成物量の比較

ペルオキシダーゼ量の異なる以下の 4 種類のサンプルを用いて、実施例 2 と同様に処理し、高分子タンニンのゲル化又は樹脂化を行った。初期反応を濁度の増加で追跡した結果を図 4 に示す。反応液をろ過後、ろ紙上の沈殿物あるいはゲルを乾燥して、その乾物重を測定することにより、以下のサンプル 1 ~ 4 における反応生成物の量を比較した。

サンプル 1：ペルオキシダーゼ量 2 mg / 2 ml

サンプル 2：ペルオキシダーゼ量 1 mg / 2 ml 20

サンプル 3：ペルオキシダーゼ量 0.5 mg / 2 ml

サンプル 4：ペルオキシダーゼ量 0.25 mg / 2 ml

【0034】

(実施例 5) 静置反応及び攪拌反応

精製したカキタンニン溶液、0.36 M 過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って反応を行い、タンニン及び過酸化水素の基質にペルオキシダーゼを加えて反応を開始する際に、反応液を回転子を用いて緩やかに攪拌しながら反応させたときと、何もせずに静置したときの反応生成物の量を比較した。結果を図 5 に示す。

(a) タンニン濃度：終濃度 1.6%

(b) 過酸化水素量：終濃度 36 mM 30

(c) ペルオキシダーゼ量：0.5 mg / 3 ml ~ 2 mg / 3 ml に変化させた。

(d) 反応液：総量 3 ml

(e) pH：50 mM リン酸緩衝液を用いて 5.6 に調整した。

(f) 反応温度：30

(g) 反応時間：1 日

【0035】

(実施例 6) 過酸化水素量による反応生成物量の変化

精製したカキタンニン溶液、0.18 M 過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って反応を行い、反応生成物（生じた沈殿物あるいはゲルの乾燥物）の量を測定した。結果を図 6 に示す。図 6 右上の写真は、左から順に、過酸化水素量の終濃度が、0 mM（番号 1）、6 mM（番号 2）、12 mM（番号 3）、24 mM（番号 4）、36 mM（番号 5）、48 mM（番号 6）のときの反応生成物の状態を示す。 40

(a) タンニン濃度：終濃度 1.6%

(b) 過酸化水素量：終濃度を 0 mM ~ 50 mM に変化させた。

(c) ペルオキシダーゼ量：1 mg / 3 ml

(d) 反応液：総量 3 ml

(e) pH：50 mM リン酸緩衝液を用いて 5.6 に調整した。

(f) 反応温度：30

(g) 反応時間：1 日

【0036】 50

(実施例7) pHの影響

精製したカキタンニン溶液、0.18 M過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って反応を行い、反応生成物（生じた沈殿物あるいはゲルの乾燥物）の量を測定した。結果を図7に示す。図7右上の写真は、上（番号5）がpH6、下（番号6）がpH7のときの反応生成物の状態を示す。ゲルの形成が認められる。

(a) タンニン濃度：終濃度1.6%

(b) 過酸化水素量：終濃度2.4 mM

(c) ペルオキシダーゼ量：1 mg / 3 ml

(d) 反応液：総量3 ml

(e) pH：2～9に変化させた。

(f) 反応温度：30

(g) 反応時間：1日

【0037】

(実施例8) 反応温度の影響

精製したカキタンニン溶液、0.18 M過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って反応を行い、反応生成物（生じた沈殿物あるいはゲルの乾燥物）の量を測定した。結果を図8に示す。図8右上の写真は、上が反応温度40、下が反応温度30のときの反応生成物の状態を示す。

(a) タンニン濃度：終濃度1.6%

(b) 過酸化水素量：終濃度2.4 mM

(c) ペルオキシダーゼ量：1 mg / 3 ml

(d) 反応液：総量3 ml

(e) pH：5.0 mMリン酸緩衝液を用いて6.7に調整した。

(f) 反応温度：30～70に変化させた。

(g) 反応時間：1日

【0038】

(実施例9) ペルオキシダーゼ反応の温度安定性

精製したカキタンニン溶液、0.18 M過酸化水素水溶液及びペルオキシダーゼを用いて、以下の条件に従って、反応前に各温度でペルオキシダーゼだけを1時間インキュベーションした後、基質（カキタンニン及び過酸化水素）を加えて、30で1日間反応を行い、反応生成物（生じた沈殿物あるいはゲルの乾燥物）の量を測定した。結果を図9に示す。図9右上の写真は、左から順に、前処理温度が、40、50、60、70、80のときの反応生成物の状態を示す。

(a) タンニン濃度：終濃度1.6%

(b) 過酸化水素量：終濃度2.4 mM

(c) ペルオキシダーゼ量：1 mg / 3 ml

(d) 反応液：総量3 ml

(e) pH：5.0 mMリン酸緩衝液を用いて5.8に調整した。

(f) 前処理温度：40～80に変化させた。

(g) 反応温度：30

(h) 反応時間：1日

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明の方法によって得られる高粘性溶液は、紙や木材への塗料として、又は糸や布への染料などとして利用でき、従来のタンニン水溶液を用いた場合よりも耐久性に優れたものができる。また、防水、防虫、静菌、耐摩耗性、消臭効果などが期待されることから、各種容器へのコーティング剤としても利用できる。

【0040】

本発明の方法によって得られるゲルは、抗菌性、抗酸化性、消臭性、抗ウイルス、抗ダニ性ゲルとして利用できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

本発明の方法によって得られる樹脂は、タンパク質、重金属、アルカロイドの吸着樹脂として利用できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 2 】

【 図 1 】 過酸化水素量による反応生成物量の変化を示す図である。

【 図 2 】 ペルオキシダーゼ量による反応生成物量の変化を示す図である。

【 図 3 】 タンニン濃度による反応生成物量の変化を示す図である。

【 図 4 】 ペルオキシダーゼ量の異なる 4 種類のサンプルを用いて、高分子タンニンのゲル化又は樹脂化を行ったときの初期反応を濁度の増加で追跡した結果を示す図である。

【 図 5 】 静置反応及び攪拌反応の反応生成物量を比較した結果を示す図である。

【 図 6 】 過酸化水素量による反応生成物量の変化を示す図である。

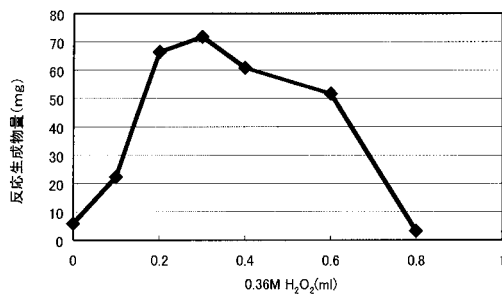
【 図 7 】 架橋反応に対する pH の影響を示す図である。

【 図 8 】 架橋反応に対する反応温度の影響を示す図である。

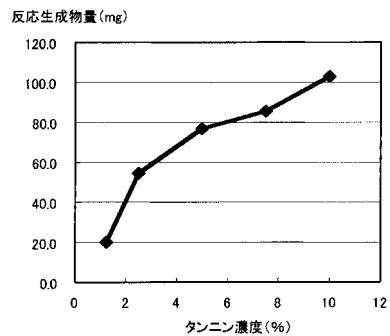
【 図 9 】 ペルオキシダーゼ酵素の温度安定性を示す図である。

10

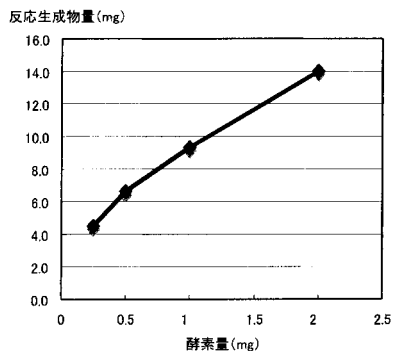
【 図 1 】



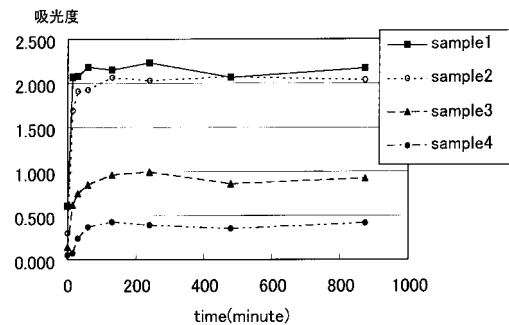
【 図 3 】



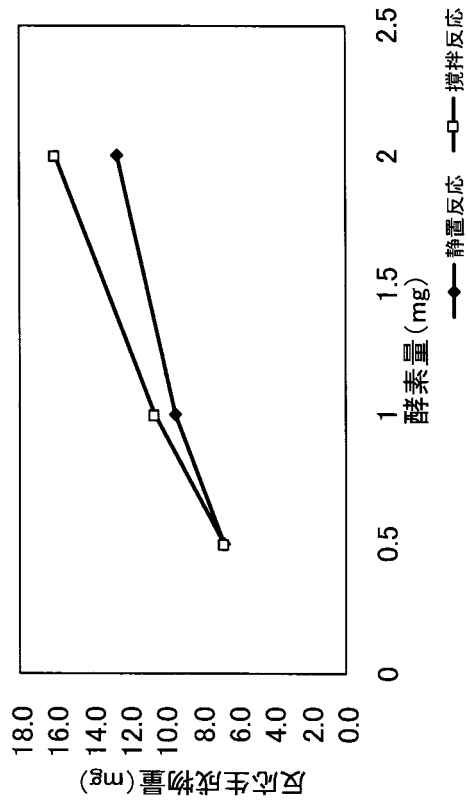
【 図 2 】



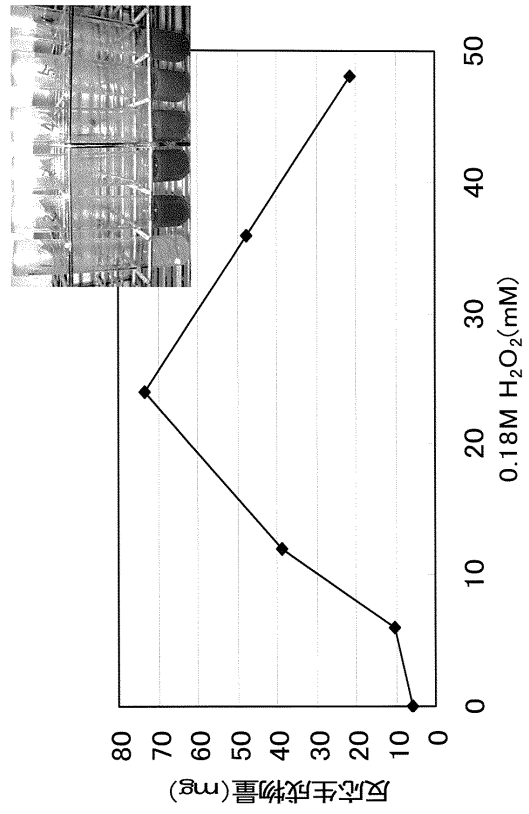
【 図 4 】



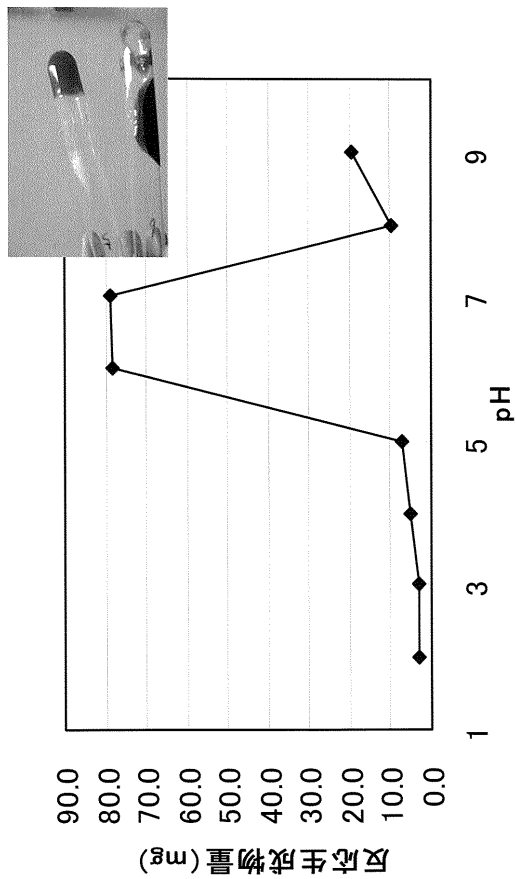
【图 5】



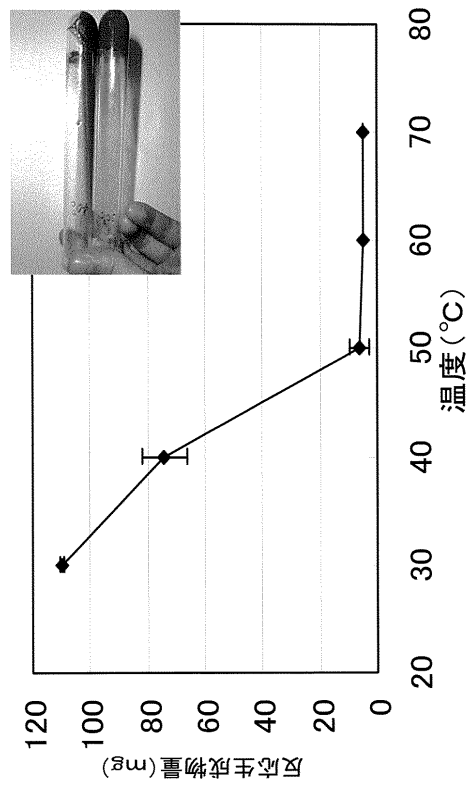
【图 6】



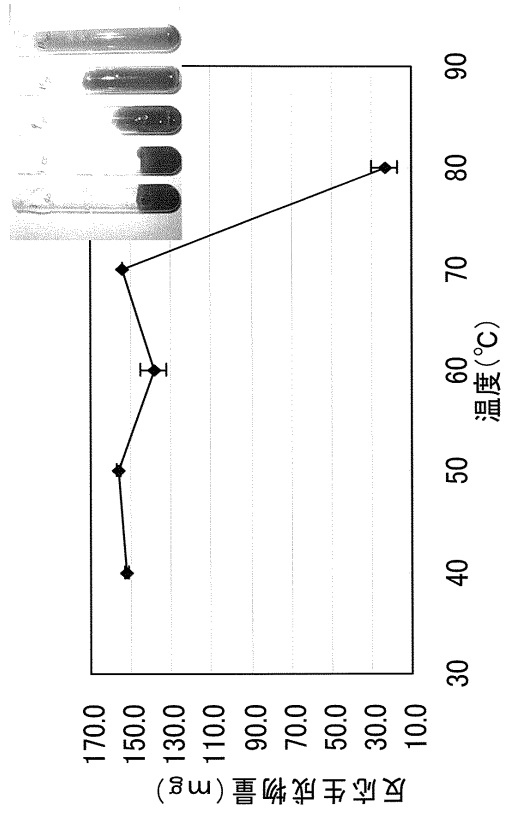
【图 7】



【图 8】



【 図 9 】



フロントページの続き

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開昭61-062573(JP,A)
農業および園芸, 2000年, Vol.75, No.1, p.3-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P 17/06
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JST7580(JDreamII)