

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5526416号
(P5526416)

(45) 発行日 平成26年6月18日 (2014. 6. 18)

(24) 登録日 平成26年4月25日 (2014. 4. 25)

| | |
|---------------------------|---------------------|
| (51) Int. Cl. | F 1 |
| A 2 3 L 1/30 (2006. 01) | A 2 3 L 1/30 B |
| A 6 1 K 31/445 (2006. 01) | A 2 3 L 1/30 Z |
| A 6 1 P 43/00 (2006. 01) | A 6 1 K 31/445 |
| A 6 1 P 3/10 (2006. 01) | A 6 1 P 43/00 1 1 1 |
| | A 6 1 P 3/10 |

請求項の数 4 (全 8 頁)

| | | | |
|-----------|------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2010-206162 (P2010-206162) | (73) 特許権者 | 501174550 |
| (22) 出願日 | 平成22年9月14日 (2010. 9. 14) | | 独立行政法人国際農林水産業研究センター |
| (65) 公開番号 | 特開2012-60902 (P2012-60902A) | | 茨城県つくば市大わし1-1 |
| (43) 公開日 | 平成24年3月29日 (2012. 3. 29) | (74) 代理人 | 100082876 |
| 審査請求日 | 平成25年7月5日 (2013. 7. 5) | | 弁理士 平山 一幸 |
| 早期審査対象出願 | | (74) 代理人 | 100109807 |
| | | | 弁理士 篠田 哲也 |
| | | (72) 発明者 | 荻澤 悟 |
| | | | 茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政 法人国際農林水産業研究センター内 |
| | | (72) 発明者 | 森 ▲隆▼ |
| | | | 茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政 法人国際農林水産業研究センター内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-グルコシダーゼ阻害活性を有する食品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

炭水化物を含む作物をバチラス・アミノリクエファシエンス菌で30で一日、4で一晚発酵処理して得られる、-グルコシダーゼ阻害活性を有する食品。

【請求項2】

前記炭水化物を含む作物が、穀類及び豆類から選ばれる1つ以上の作物である、請求項1に記載の-グルコシダーゼ阻害活性を有する食品。

【請求項3】

前記穀類が米、小麦及びトウモロコシから選ばれる1つ以上の穀物である、請求項2に記載の-グルコシダーゼ阻害活性を有する食品。

【請求項4】

前記バチラス・アミノリクエファシエンス菌が、バチラス・アミノリクエファシエンス3022 (NBRC3022菌株)、バチラス・アミノリクエファシエンス14141 (NBRC14141菌株)又はバチラス・アミノリクエファシエンス15535 (NBRC15535菌株)である、請求項1~3のいずれかに記載の-グルコシダーゼ阻害活性を有する食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、-グルコシダーゼ阻害活性成分を含有する機能性食品、 -グルコシダー

ゼ阻害活性成分の製造方法及び 1 - デオキシノジリマイシンの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

- グルコシダーゼは小腸に存在する酵素であり、炭水化物を単糖類に分解する消化酵素である。したがって、- グルコシダーゼの働きを抑えることによって、食後の血糖の急激な上昇を抑えることができる。

特許文献 1 及び 2 には、豆類又は穀類を糸状菌であるアスペルギルス属微生物やモナカス属微生物で発酵して - グルコシダーゼ阻害剤を製造することが記載されている。

【0003】

また、- グルコシダーゼ阻害剤に関しては、いくつかの特定成分が知られているが、天然成分として、桑葉に含まれるアルカロイドである 1 - デオキシノジリマイシンが知られており、桑葉から 1 - デオキシノジリマイシンを抽出する方法が知られている（例えば、特許文献 3 参照）。また、桑葉からの抽出以外にも、大豆をバチラス・サブチルスにより発酵し、発酵物から 1 - デオキシノジリマイシンを製造することが報告されている（特許文献 4）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2004 - 166628 号

【特許文献 2】特開 2009 - 227587 号

【特許文献 3】特開平 9 - 140351 号

【特許文献 4】特開 2008 - 222701 号

20

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】J Food Sci. vol. 75, 246-50 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

桑葉から 1 - デオキシノジリマイシンを抽出する方法では、大量に - グルコシダーゼ阻害成分を得ることが難しく、様々な食物と組み合わせた機能性食品を大量に製造することは難しい。

30

【0007】

本発明は、微生物の培養物から - グルコシダーゼ阻害成分を製造する方法及び - グルコシダーゼ阻害成分を含有する機能性食品を提供することを目的とする。

【0008】

本発明者らは、- グルコシダーゼ阻害成分を含有する発酵物について研究を行っていたところ、バチラス・アミノリクエファシエンス菌を用いて得られた発酵物に - グルコシダーゼ阻害成分が含まれていることを見出し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の機能性食品は、炭水化物を含む作物をバチラス・アミノリクエファシエンス菌で発酵処理して得られるものである。

40

【0010】

また、本発明の機能性食品は、バチラス・アミノリクエファシエンス菌が生産する - グルコシダーゼ阻害活性成分と担体とからなることを特徴とする。

【0011】

本発明の - グルコシダーゼ阻害成分を製造する方法は、バチラス・アミノリクエファシエンス菌に属し、- グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有する菌株を培養し、培養物から - グルコシダーゼ阻害活性成分を抽出することを特徴とする。

【0012】

50

本発明の - 1 - デオキシノジリマイシンを製造する方法は、バチラス・アミノリクエファシエンス菌に属し、1 - デオキシノジリマイシンを含む - グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有する菌株を培養し、培養物から1 - デオキシノジリマイシンを抽出することを特徴とする。

【発明の効果】

【0013】

本発明の機能性食品は炭水化物を含む作物を原料とした - グルコシダーゼ阻害活性成分を含む発酵食品であるため、炭水化物を含む食物を摂取しながら、食後の血糖の急激な上昇を抑えることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明の実施例1で得られた発酵物の上澄み液の陰イオン交換クロマトグラフィーを示すチャート図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[実施形態1]

本実施形態の機能性食品は、炭水化物を含む作物をバチラス・アミノリクエファシエンス菌で発酵処理して得られる発酵食品である。

【0016】

炭水化物を含む作物とは、穀類、豆類又はイモ類から選ばれる1以上の農作物又はそれら農作物の粉加工品である。

穀類としては、あわ、えんばく、大麦、きび、小麦、米、餅米、そば、とうもろこし、ひえ、もろこし、ライ麦、鳩麦等が挙げられ、また、穀類を加工した、精白粒、オートミール、精麦、麦こがし、薄力粉、中力粉、強力粉、玄米、半つき米、七部つき米、精白米、胚芽精米、強化米、米、上新粉、白玉粉、全層粉、コーンミル、コーングリップツ、コーンフラワー、ライ麦粉等であってもよい。

【0017】

豆類としては、大豆、アズキ、ササゲ、インゲン豆、落花生、ソラマメ等が挙げられ、また、豆類の粉製品であってもよい。

イモ類としては、ジャガイモ、サツマイモ、サトイモ、キクイモ等が挙げられ、イモ類の粉製品であってもよい。

【0018】

炭水化物を含む作物の発酵は、炭水化物を含む作物に水分を加え加熱処理した後、 - グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有する菌株を添加して、発酵処理すればよい。なお、 - グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有する菌株は、1 - デオキシノジリマイシンを生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株であることが好ましい。

【0019】

1 - デオキシノジリマイシンを生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株は、バチラス・アミノリクエファシエンス3022 (NBRC3022菌株)、バチラス・アミノリクエファシエンス14141 (NBRC14141菌株)及びバチラス・アミノリクエファシエンス15535 (NBRC15535菌株)から選ばれる菌株が好ましい。

【0020】

発酵物は納豆又は米麹のように、そのまま食する機能性食品としてもよく、加工して、豆腐、シリアル、餅、パン、麺類等の機能性食品としてもよい。

【0021】

以上述べたように、本実施形態の機能性食品に対しては、 - グルコシダーゼ阻害活性成分又は1 - デオキシノジリマイシンを添加する必要が無い。また、本実施形態の機能性

10

20

30

40

50

食品は、バチラス・サブチルスを利用した発酵食品より強いグルコシダーゼ阻害活性を示すため、炭水化物摂取時の - グルコシダーゼの働きを効果的に抑制することができる。

【 0 0 2 2 】

[実施形態 2]

本実施形態は、 - グルコシダーゼ阻害活性成分の製造方法であって、バチラス・アミノリクエファシエンス菌に属し、 - グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有する菌株を培養し、培養物から - グルコシダーゼ阻害活性成分を抽出することを特徴とする。

【 0 0 2 3 】

バチラス・アミノリクエファシエンス菌は、実施形態 1 で述べた、 - グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株であればよく、好ましくは、1 - デオキシノジリマイシンを生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株である。

【 0 0 2 4 】

1 - デオキシノジリマイシンを生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株を培養する場合には、培養物から 1 - デオキシノジリマイシンを得ることができる。

【 0 0 2 5 】

- グルコシダーゼ阻害活性成分を生産する能力又は 1 - デオキシノジリマイシンを生産する能力を有するバチラス・アミノリクエファシエンス菌株は、実施形態 1 で述べた、バチラス・アミノリクエファシエンス 3 0 2 2 (N B R C 3 0 2 2 菌株)、バチラス・アミノリクエファシエンス 1 4 1 4 1 (N B R C 1 4 1 4 1 菌株) 及びバチラス・アミノリクエファシエンス 1 5 5 3 5 (N B R C 1 5 5 3 5 菌株) から選ばれる菌株が好ましい。

【 0 0 2 6 】

培地は特に限定されるものではなく、バチラス・アミノリクエファシエンスが生育できる液体培地、固体培地を用いることができる。また、培地は実施形態 1 で述べた炭水化物を含む農作物であってもよく、培地成分として炭水化物を含む農作物を含んでいてもよい。

【 0 0 2 7 】

バチラス・アミノリクエファシエンス菌が生産する - グルコシダーゼ阻害活性成分は、バチラス・アミノリクエファシエンス菌の培養物中に含まれる - グルコシダーゼ活性を阻害する化合物であればよい。好ましくは、1 - デオキシノジリマイシンである。

【 0 0 2 8 】

バチラス・アミノリクエファシエンスの培養物は、バチラス・サブチルスの培養物に比べ、高い - グルコシダーゼ阻害効果を示す。

【 0 0 2 9 】

- グルコシダーゼ阻害活性成分は、食用に適する担体に添加して使用する。担体は、例えば、パン、麺、アルファー米、豆腐、ハム、チーズ等の加工食品、即席麺等のインスタント食品、レトルト食品、味噌や醤油等の調味料、菓子類、飲料又はガム等である。

【 0 0 3 0 】

- グルコシダーゼ阻害活性成分の添加量は、特に限定されるものではなく、機能性食品中に 0 . 0 1 以上 1 0 % の範囲で含まれていればよい。

【 0 0 3 1 】

以下に、本発明に係る機能性食品及び - グルコシダーゼ阻害活性成分の製造方法を実施例に基づき説明するが本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 3 2 】

食品素材をバチラス・アミノリクエファシエンス菌株により発酵処理して得られた発酵物の - グルコシダーゼ阻害を測定した。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

食品素材には白米粒、小麦粒、トウモロコシ粒及び大豆を用い、独立行政法人製品評価技術基盤機構から入手した3種類のバチラス・アミノリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) の菌株：NBRC 3022 菌株、NBRC 14141 菌株、NBRC 15535 菌株を用いた。

なお、対照として、市販の納豆より単離した菌株（市販納豆菌）及び独立行政法人製品評価技術基盤機構から入手したバチラス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) (NBRC 13719 菌株) を用いた。

【0034】

また、上記バチラス・アミノリクエファシエンス菌株をLB (Luria-Bertani) 液体培地及びLB寒天培地で培養し、得られた培養物の - グルコシダーゼ阻害を測定した。

10

【0035】

[白米粒の発酵処理]

(1) 白米に等量の水を加え、121、30分間オートクレイブした。これを滅菌済みのシャーレに移し、LB液体培地で30、一晚培養したバチラス・アミノリクエファシエンス培養液を加え混合し、30で1日間、つづいて4で一晚発酵させた。

【0036】

[小麦粒の発酵処理]

小麦粒を3倍量の水に一晚浸漬した。次に、浸漬した小麦粒に等量の水を加え、121、30分間をオートクレイブした。これを滅菌済みのシャーレに移し、LB液体培地で30、一晚培養したバチラス・アミノリクエファシエンス培養液を加えて混合し、30

20

【0037】

[トウモロコシ粒の発酵処理]

トウモロコシ粒に等量の水を加え、121、30分間をオートクレイブした。これを滅菌済みのシャーレに移し、LB液体培地で30、一晚培養したバチラス・アミノリクエファシエンス培養液を加え混合し、30で1日間、つづいて4で一晚発酵させた。

【0038】

[大豆の発酵処理]

大豆を3倍量の水に一晚浸漬した。次に、浸漬した大豆に等量の水を加え、121、30分間をオートクレイブした。これを滅菌済みのシャーレに移し、LB液体培地で30

30

【0039】

[LB液体培地での培養]

バチラス・アミノリクエファシエンスをLB液体培地で30、250rpmで回転させ、一晚培養した。

[LB寒天培地での培養]

バチラス・アミノリクエファシエンスをLB寒天培地で30、一晚培養させた。

【0040】

上記発酵物0.2gをそれぞれ水1mL(リットル)に懸濁し、これを15,000rpmで遠心分離したのち、上澄みを酵素活性測定用の試料溶液とした。LB液体培地培養物は15,000rpmで遠心分離したのち、上澄みを試料溶液とした。さらに、LB寒天培地培養物40mgを水0.4mLに懸濁し、これを15,000rpmで遠心分離したのち、上澄みを試料溶液とした。

40

【0041】

[酵素活性測定]

50mM(モル)のリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.7)80μL、試料溶液50μL、10mMの4-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド水溶液20μL及び25mg/mLラット小腸アセトンパウダー(Intestinal acetone powders from rat, SIGMA-ALDRICH社製)水溶液50μLをこの順序で混合し、30、1時間インキ

50

ュベートした。次に、1.2 Mの炭酸ナトリウム水溶液100 μ Lを加え酵素反応を停止させたのち、405 nmの吸光度を測定した。

ラット小腸アセトンパウダーに含まれる α -グルコシダーゼが4-ニトロフェニル-D-グルコピラノシドを加水分解し、4-ニトロフェノールを生じる。4-ニトロフェノールはアルカリ溶液中で黄色を呈するので、405 nmの吸光度の増加を測定することにより α -グルコシダーゼ活性の強さを測定することが出来る。

【0042】

表1に、ブランクとして水を用い、ブランクの吸光度を100%としたときの、それぞれの試料の相対活性を示した。

すなわち、 α -グルコシダーゼ活性が100%とは、試料溶液中に α -グルコシダーゼ阻害活性が全くないことを示す。一方、相対活性の数値が低くなるほど試料溶液中に強い α -グルコシダーゼ阻害活性があることを示す。

【0043】

【表1】

| 菌株 | α -グルコシダーゼ活性 (%) | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-----|--------|-----|--------|--------|
| | 米 | 小麦 | トウモロコシ | 大豆 | LB液体培地 | LB寒天培地 |
| 市販納豆菌 | 100 | 98 | 100 | 100 | 98 | 100 |
| <i>B. subtilis</i> 13719 | 94 | 91 | 100 | 97 | 97 | 99 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 3022 | 14 | 8.6 | 28 | 6.4 | 21 | 36 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 14141 | 5.9 | 8.2 | 15 | 7.9 | 6.4 | 26 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 15535 | 6.6 | 8.8 | 43 | 6.9 | 10 | 7.5 |

【0044】

なお、米、小麦、トウモロコシ、大豆及びLB寒天培地の α -グルコシダーゼ活性は、重量あたりの値、LB液体培地の α -グルコシダーゼ活性は体積あたりの値である。

【0045】

酵素活性測定の結果、パチラス・アミノリクエファシエンスを用いた発酵物及び培養物では、相対活性が2.9~36%を示し、いずれもパチラス・サブチルスによる発酵物より強い α -グルコシダーゼ阻害活性を示した。

【実施例2】

【0046】

高性能陰イオン交換クロマトグラフィーにより、発酵物に含まれる1-デオキシノジリマイシンを分取した。なお、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーは、非特許文献1に記載された桑葉の1-デオキシノジリマイシンの同定に記載された方法である。

【0047】

パチラス・アミノリクエファシエンス14141と大豆を用いて製造した発酵物1gに蒸留水1mLを加え、攪拌したのち、15,000rpmで10分間遠心分離し、上澄み液を得た。上澄み液に終点濃度が0.2Mになるように水酸化ナトリウムを加えた。これを、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、1-デオキシノジリマイシン画分を分取した。高性能陰イオン交換クロマトグラフィーにはDionex社製のDX-300 System、長さ250mm、直径4mmのCarboPac MA-1カラム、パルスドアンペロメトリック電気化学検出器PAD-2を使用した。カラムは0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液で平衡化した。

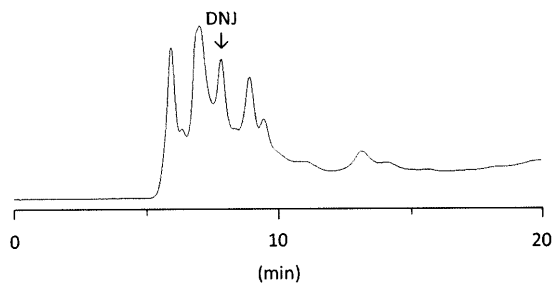
なお、大豆発酵物の上澄み液に水酸化ナトリウムを添加したのち、0.2Mから1Mの水酸化ナトリウム濃度勾配により、上述の条件で1-デオキシノジリマイシンを溶出した

。

【 0 0 4 8 】

図 1 に高性能陰イオン交換クロマトグラフィーのチャートを示す。図中の D N J で示すピークが 1 - デオキシノジリマイシンのピークである。このことから、バチラス・アミノリクエファシエンスを用いた発酵物又は培養物には 1 - デオキシノジリマイシンが含まれることがわかる。

【 図 1 】



フロントページの続き

(72)発明者 吉橋 忠

茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内

(72)発明者 李 里特

茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特開昭53-079097(JP,A)

特開2008-222701(JP,A)

NBRC Culture Catalogue [online], NBRC No. NBRC 15535, [検索日:2013年11月18日], URL
, <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00015535>

日本農芸化学会大会講演要旨集, 2010年 3月 5日, Vol.2010, p.34

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23L 1/27-1/308

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)