

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第5795676号  
(P5795676)

(45) 発行日 平成27年10月14日(2015.10.14)

(24) 登録日 平成27年8月21日(2015.8.21)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 7/22
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/26</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 7/26
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/38</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 7/38
<b>C 1 2 P</b>	<b>17/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 17/06
<b>C 1 2 P</b>	<b>17/16</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 17/16

請求項の数 19 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-242164 (P2014-242164)	(73) 特許権者	305035369
(22) 出願日	平成26年11月28日(2014.11.28)		株式会社果実堂
審査請求日	平成27年1月27日(2015.1.27)		熊本県上益城郡益城町大字田原1155番地5
早期審査対象出願		(74) 代理人	100106002
			弁理士 正林 真之
		(74) 代理人	100120891
			弁理士 林 一好
		(72) 発明者	井出 博之
			熊本県上益城郡益城町田原1155-5
			株式会社果実堂内
		(72) 発明者	井出 剛
			熊本県上益城郡益城町田原1155-5
			株式会社果実堂内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発芽処理植物種子の製造方法、発芽誘導用原料種子の製造方法、発芽処理植物種子の抽出組成物、及び、スクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程を有する、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項2】

植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程を有し、

前記5時間以上の保持は、前記植物種子を浸漬することによるものでない、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項3】

植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程を有し、

前記前処理工程は、前記5時間以上の保持及び該保持の終了の組み合わせを2回以上行う、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項4】

植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程を有し、

前記前処理工程は、前記前処理工程後の前記植物種子中のグルタミン酸の質量が、前記前処理工程前の前記植物種子のグルタミン酸の質量に対して2.5倍以上となるように行

う、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 5】

前処理工程であって、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上100倍以下となるように植物種子を処理する前処理工程を有する、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 6】

前処理工程であって、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカル全体の質量が、前処理工程前の植物種子の全体ファイトケミカルの質量に対して2倍以上100倍以下となるように植物種子を処理する前処理工程を有する、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 7】

前処理工程であって、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカル全体の質量が、前処理工程前の植物種子の全体ファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように植物種子を処理する前処理工程を有し、

前記前処理工程は、前記前処理工程後の前記植物種子中のグルタミン酸の質量が、前記前処理工程前の前記植物種子のグルタミン酸の質量に対して2.5倍以上となるように行う、発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 8】

前処理工程前の前記植物種子のファイトケミカルの含有量が、0.1 mg / g 以上である、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 9】

前記植物種子が、ブドウ科、マメ科、ナス科、シソ科、又は十字花科の植物種子である、請求項 8 に記載の発芽誘導用原料種子の製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の発芽誘導用原料種子に微生物である病原体を接種し、前記発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程を有する、発芽処理植物種子の製造方法。

【請求項 11】

前記病原体は、食用微生物である、請求項 10 に記載の発芽処理植物種子の製造方法。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載の方法により製造された発芽処理植物種子の抽出組成物。

【請求項 13】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
被験植物種子を、400 ppm 以上の二酸化炭素濃度及び / 又は 19 容量 % 以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程と、

前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、

前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、

前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、を有する、スクリーニング方法。

【請求項 14】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
被験植物種子を、400 ppm 以上の二酸化炭素濃度及び / 又は 19 容量 % 以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程と、

前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、

前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、

前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、を有し、

前記5時間以上の保持は、前記被験植物種子を浸漬することによるものでない、スクリーニング方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
被験植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程と、  
前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、  
前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、  
前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、  
を有し、  
前記前処理工程は、前記5時間以上の保持及び該保持の終了の組み合わせを2回以上行う、スクリーニング方法。

10

## 【請求項 16】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
被験植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程と、  
前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、  
前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、  
前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、  
を有し、  
前記前処理工程は、前記前処理工程後の前記被験植物種子中のグルタミン酸の質量が、前記前処理工程前の前記被験植物種子のグルタミン酸の質量に対して2.5倍以上となるように行う、スクリーニング方法。

20

## 【請求項 17】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
前処理工程であって、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上100倍以下となるように被験植物種子を処理する前処理工程と、  
前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、  
前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、  
前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、  
を有する、スクリーニング方法。

30

## 【請求項 18】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
前処理工程であって、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカル全体の質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカル全体の質量に対して2倍以上100倍以下となるように被験植物種子を処理する前処理工程と、  
前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、  
前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、  
前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、  
を有する、スクリーニング方法。

40

## 【請求項 19】

標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、  
前処理工程であって、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように被験植物種子を処理する前処理工程と、  
前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、

50

前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、  
前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と  
、を有し、

前記前処理工程は、前記前処理工程後の前記被験植物種子中のグルタミン酸の質量が、  
前記前処理工程前の前記被験植物種子のグルタミン酸の質量に対して2.5倍以上となる  
ように行う、スクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、発芽処理植物種子の製造方法、発芽誘導用原料種子の製造方法、発芽処理植物種子の抽出組成物、及び、スクリーニング方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

植物は代謝の際に、医薬品や健康食品に使用可能な、ファイトケミカル等の有用な化合物を生成することが知られている。また、植物の代謝は、植物の生育環境に依存するため、植物の生育に関わる環境因子を変化させることで、植物の代謝により産生される化合物の種類や量が変化すると考えられている。そこで、植物の生育に関わる環境因子を変化させ、ファイトケミカル等の有用な化合物を植物に産生させる研究が従来より行われている。

【0003】

20

ファイトケミカルとしては、例えばポリフェノールが知られており、特許文献1には、植物種子を、2000ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は18容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下で保持し、かつ、発芽温度内の条件下で保持することにより、易水溶性のポリフェノール量が増加した発芽処理植物種子の製造方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2008-125515号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0005】

ところで、ファイトアレキシンは、通常の植物が産生しない二次代謝産物であり、生体機能に対して有効性を有することが知られているが、特許文献1の発芽処理植物種子の製造方法によると、易水溶性のポリフェノールを増やすのみにとどまり、十分な量のファイトアレキシンを製造することができない。

【0006】

本発明は以上の実情に鑑みてなされたものであり、多量のファイトアレキシンの産生に適した新規な発芽処理植物種子の製造方法、このような発芽処理植物種子の製造に用いられる発芽誘導用原料種子の製造方法、発芽処理植物種子の抽出組成物、及び、標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法を提供することを目的とする。 40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、植物種子に対して、発芽環境を制御する前処理を行い、かつ、その後に微生物である病原体を植物種子に接種することにより、発芽処理植物種子が、ファイトアレキシンを多量に産生できることを見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下のようなものを提供する。

【0008】

(1) 植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程を有する、発芽誘導用原料種子の製造方法。

50

## 【0009】

(2) 前処理工程であって、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように植物種子を処理する前処理工程を有する、発芽誘導用原料種子の製造方法。

## 【0010】

(3) 前処理工程前の前記植物種子のファイトケミカルの含有量が、 $0.1 \text{ mg/g}$ 以上である、(1)又は(2)に記載の発芽誘導用原料種子の製造方法。

## 【0011】

(4) 前記植物種子が、ブドウ科、マメ科、ナス科、シソ科、又は十字花科の植物種子である、(3)に記載の発芽誘導用原料種子の製造方法。

10

## 【0012】

(5) (1)から(4)のいずれかに記載の発芽誘導用原料種子に微生物である病原体を接種し、前記発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程を有する、発芽処理植物種子の製造方法。

## 【0013】

(6) 前記病原体は、食用微生物である、(5)に記載の発芽処理植物種子の製造方法。

## 【0014】

(7) (5)又は(6)に記載の方法により製造された発芽処理植物種子の抽出組成物。

20

## 【0015】

(8) 標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、被験植物種子を、 $400 \text{ ppm}$ 以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程と、前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、を有する、スクリーニング方法。

## 【0016】

30

(9) 標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、前処理工程であって、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように被験植物種子を処理する前処理工程と、前記前処理工程後に、前記被験植物種子に微生物である病原体を接種し、前記被験植物種子を発芽誘導可能でかつ前記病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、前記発芽誘導工程後の前記被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、前記検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、を有する、スクリーニング方法。

## 【発明の効果】

40

## 【0017】

本発明によれば、多量のファイトアレキシンの産生に適した新規な発芽処理植物種子の製造方法、このような発芽処理植物種子の製造に用いられる発芽誘導用原料種子の製造方法、発芽処理植物種子の抽出組成物、及び、標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0018】

【図1】(a)は、比較例1に係るブドウ種子の抽出組成物の、(b)は実施例1に係る発芽処理植物種子の抽出組成物の高速液体クロマトグラフィーによる分析結果をそれぞれ示す図である。

50

【図2】(a)は、比較例2に係るレッドクローバー種子の抽出組成物の、(b)は実施例2に係る発芽処理植物種子の抽出組成物の、(c)は、実施例3に係る発芽処理植物種子の抽出組成物のそれぞれの高速液体クロマトグラフィーによる分析結果を示す図である。

【図3】(a)は、比較例3に係るトマト種子の抽出組成物の、(b)は実施例4に係る発芽誘導用原料種子の抽出組成物のそれぞれの高速液体クロマトグラフィーによる分析結果を示す図である。

【図4】実施例5～7に係る発芽誘導用原料種子、比較例4～9に係る大豆の抽出組成物中における、ファイトケミカルであるイソフラボンの量のグラフを示す図である。

【図5】(a)は、比較例4～6に係る大豆の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示す図である。(b)は、比較例7～9に係る大豆の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示す図である。(c)は、実施例5～7に係る発芽誘導用原料種子の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示す図である。

【図6】実施例8～10に係る発芽処理植物種子、比較例10に係る種子の抽出組成物中における、ファイトアレキシンであるグリセオリンの量のグラフを示す図である。

【図7】実施例9に係る発芽処理植物種子について、麹菌の接種後からの時間経過(0～4日)と、グリセオリンI～Vの増えた割合との関係を示したグラフを示す図である。

【図8】実施例11に係る発芽誘導用原料種子、比較例11、12に係る種子の抽出組成物中における、アミノ酸の量のグラフを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明の具体的な実施形態について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。

【0020】

<発芽誘導用原料種子の製造方法>

本発明の発芽誘導用原料種子の製造方法は、植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程、又は、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように植物種子を処理する前処理工程を有する。

【0021】

(前処理工程)

本発明の発芽誘導用原料種子の製造方法における前処理工程は、植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程、又は、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように植物種子を処理する前処理工程を有する工程である。本発明において、「発芽誘導用原料種子」とは、主に後述の発芽処理植物種子の製造の原料として用いられる種子であり、前処理工程により、ファイトケミカルの量が増加された種子のことをいう。

【0022】

本発明において、「前処理」とは、後述する発芽処理植物種子の製造方法における発芽誘導工程の前段階で行う処理であって、種子中のファイトケミカルの量を増やす処理を行う工程である。このように、ファイトケミカルの量が増えることで、製造された発芽誘導用原料種子は、後述する発芽誘導用原料種子の製造方法における発芽誘導工程によって、ファイトアレキシンを多量に産生することができる。なお、後述の発芽処理植物種子の製造方法において発芽誘導が行われるが、本発明における「前処理」においても、発芽誘導が行われてもよい。

【0023】

10

20

30

40

50

また、本発明における前処理工程により、植物種子は、アミノ酸や糖等の産生量も増やすことができる。その理由は、植物種子は、発芽直後は従属栄養であり、光合成ができる独立栄養体にまでに成長するための栄養素が必要であるところ、植物種子は独立栄養体にまで成長するために種子内に貯蔵しているたんぱく質をアミノ酸に分解して窒素源にし、貯蔵しているデンプンを糖に分解し炭素源にするためであると推測される。このように、植物種子内にアミノ酸や糖が多く産生されることにより、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、ファイトアレキシンの産生量が多くなる。

**【0024】**

前処理は、植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持することによって行うことができる。上記で述べた特許文献1の方法においても、二酸化炭素濃度及び/又は酸素濃度の制御は行われていたが、保持が断続的であり、連続した保持時間が短いため、易水溶性ポリフェノールの量が増えるにとどまっていた。これに対し、本発明においては、植物種子を上記雰囲気下で保持時間が5時間以上と長くすることにより、種子中のファイトケミカルの量を著しく増やすことができる。

10

**【0025】**

二酸化炭素濃度及び/又は酸素濃度の連続保持時間は、5時間以上であれば特に限定されないが、種子中のファイトケミカルの産生量が増えやすくなることから、6時間以上であることが好ましく、6.5時間以上であることがより好ましく、7時間以上であることがより一層好ましく、8時間以上であることがさらに好ましく、10時間以上であることがよりさらに好ましく、12時間以上であることが最も好ましい。一方、保持時間が長すぎると、ファイトケミカルの量が多くなりすぎ、後述する発芽処理植物種子の製造方法において、微生物である病原体がファイトケミカルに対抗しにくくなり、結果として、ファイトアレキシンの産生量が少なくなる。このことから、保持時間は、72時間以下であることが好ましく、48時間以下であることがより好ましく、36時間以下であることがさらに好ましい。

20

**【0026】**

二酸化炭素濃度は、特に限定されないが、種子中のファイトケミカルの産生量が増えやすくなることから、2000ppm以上であることが好ましく、5000ppm以上であることがより好ましく、10000ppm以上であることがさらに好ましく、20000ppm以上であることが最も好ましい。また、二酸化炭素濃度の上限については、特に限定されないが、高くなりすぎると、結果として、酸素濃度が少なくなり、植物種子が嫌気呼吸して、種子のファイトケミカルの産生量が少なくなることから、10000ppm以下であることが好ましく、7500ppm以下であることがより好ましく、5000ppm以下であることがさらに好ましく、3500ppm以下であることが最も好ましい。

30

**【0027】**

酸素濃度は、特に限定されないが、種子中のファイトケミカルの産生量が増えやすくなることから、18容量%以下であることが好ましく、15容量%以下であることがより好ましく、12容量%以下であることがさらに好ましく、9容量%以下であることが最も好ましい。また、酸素の下限については、特に限定されないが、少なくなりすぎると、植物種子が嫌気呼吸して、種子のファイトケミカルの産生量が少なくなることから、3容量%以上であることが好ましく、4容量%以上であることがより好ましく、6容量%であることがさらに好ましく、7容量%以上であることが最も好ましい。

40

**【0028】**

二酸化炭素濃度、酸素濃度の保持は、特に限定されないが、例えば、密閉又は一部が密閉された容器内に植物種子を堆積することによって、種子の周囲の酸素濃度を減少させ、二酸化炭素濃度を上昇させることができる。そのため、このような状態を保持することで、二酸化炭素濃度、酸素濃度を所望の雰囲気条件化下に保持することができる。この保持を終了させるには、例えば、密閉状態を開放することによって行ってもよく、あるいは、

50

散水によって行うこともできる。また、容器の密閉の程度や、種子の堆積の程度によって、保持する二酸化炭素濃度、酸素濃度を調整することができる。

【0029】

本発明において、一度上記保持を終了させた後に、再び、植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持してもよい。本発明において、保持とその終了を行う回数は特に限定されず、例えば、1回以上(2回以上、3回以上、4回以上、5回以上、6回以上、8回以上、9回以上等)であってもよく、10回以下(9回以下、8回以下、7回以下、6回以下、5回以下、4回以下、3回以下、2回以下等)であってもよいが、1~10回行うことが好ましく、2~8回行うことがより好ましく、4~6回行うことがさらに好ましい。

10

【0030】

本発明において、二酸化炭素濃度、酸素濃度は、ガステック検知管/指示精度:CV=5%(CV:変動係数=標準偏差÷平均値×100)の条件で測定する。

【0031】

本発明における植物種子は、発芽可能な種子を使用することが好ましい。発芽可能な種子とは、休眠状態でない種子のことである。ただし、休眠状態の種子を用いる場合、前処理工程の前に、休眠状態の種子を加熱、水等により休眠状態を解除してから発芽可能な状態にして、その種子を前処理工程に用いることができる。

【0032】

本発明において、種子中のファイトケミカル量を増やす前処理工程は、植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持することによって行うことができるが、前処理はこれに限定されず、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して、例えば2倍以上となるように植物種子を処理する方法であれば、どのような方法であってもよい。なお、少なくとも1種以上のファイトケミカルの質量が2倍以上となるように処理を行ってもよく、ファイトケミカル全体の質量が2倍以上となるように処理を行ってもよい。

20

【0033】

ファイトケミカルの質量が2倍以上となるような植物処理は、特に限定されないが、上述の二酸化炭素濃度及び/又は酸素濃度の雰囲気条件を調整して保持する方法の他に、種子の周囲の温度、水、光、植物ホルモン、種子中のpH、イオン濃度、微生物、微生物シグナル等の種子の発芽に關与する環境因子を、単独で又は組み合わせて制御することによっても行うことができる。また、これらの環境因子の制御と、二酸化炭素濃度及び/又は酸素濃度の制御とを組み合わせることによっても行うことができる。

30

【0034】

温度は、特に限定されないが、例えば、10~45で行うことができる。しかし、種子中のファイトケミカルの量が増えやすくなることから、15~40であることが好ましく、20~35以上であることがより好ましく、25~35であることがさらに好ましい。また、温度の調整は、従来の公知のいずれの方法によっても行うことができるが、例えば、温度調節可能なインキュベータ、室温を調整可能な栽培室、ヒーター、冷却装置、空気制御装置、散水等によって行うことができる。温度を所望の条件下に保持する時間は、特に限定されず、例えば、二酸化炭素濃度等の他の環境因子に応じて適宜設定することができる。

40

【0035】

水の制御は、例えば、散水によって行うことができる。本発明において、散水する操作は、特に限定されないが、例えば、種子に水を吹き付けたり、水をかけたり、種子を水に浸漬させたりすることによって行うことができる。本発明において、水を制御することにより、種子の周りの湿度、温度、二酸化炭素濃度、酸素等を調整でき、これにより、種子中のファイトケミカル量を増加させることができる。水の制御は、湿度、温度、二酸化炭素濃度、酸素等に応じて、その保持時間や、散水等の回数を適宜設定することができる。

50

## 【 0 0 3 6 】

水には、例えば、10 ppm以上の殺菌剤を含ませてもよいが、前処理において微生物を用いる場合、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、菌の生育を妨げる恐れがあることから、殺菌剤を多く用いすぎない方が好ましい。この場合、殺菌剤の濃度は、9 ppm以下であることが好ましく、8 ppm未満であることが好ましく、5 ppm未満であることがさらに好ましい。殺菌剤は、従来の公知の殺菌剤を使用することができるが、例えば、次亜塩素酸ナトリウム等が挙げられる。

## 【 0 0 3 7 】

光の制御は、特に限定されないが、例えば、光強度が5 ~ 1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{日}$ の光を照射することによって行うことができる。また、光の照射時間は、特に限定されないが、0.5 ~ 2.4時間/日が好ましく、6 ~ 12時間/日がより好ましい。光の照射は、蛍光灯等の従来の公知の手段を用いることができる。

10

## 【 0 0 3 8 】

植物ホルモンの制御は、特に限定されないが、例えば、エチレンガス ( $\text{C}_2\text{H}_4$ )、ジベレリン等によって行うことができる。制御する植物ホルモンは、例えば、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシシン酸、エチレン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸類、フロリゲン、ストリゴラクトン等が挙げられる。

## 【 0 0 3 9 】

pHの制御は、特に限定されないが、例えば、pHを2.3 ~ 9.0に制御することによって行うことができる。pHを制御する方法は、従来の公知の手段を用いることができる。

20

## 【 0 0 4 0 】

イオン濃度の制御は、特に限定されないが、例えば、種子に散水する水におけるイオン(例えば、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 等)を、0.001 ppm ~ 100 ppmに調整することによって行うことができる。

## 【 0 0 4 1 】

微生物、又は微生物シグナルの制御は、特に限定されないが、例えば、コウジ菌等の微生物、又はグルカン等の微生物シグナルを制御することによって行うことができる。

## 【 0 0 4 2 】

前処理によりファイトケミカルを増やす量は、多い方が、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、病原体との相互作用により、多量のファイトアレキシンを産生しやすくなる。このことから、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して、5倍以上となるように植物種子を処理するのが好ましく、10倍以上となるように植物種子を処理するのがより好ましく、20倍以上となるように植物種子を処理するのがさらに好ましい。一方で、ファイトケミカルを多くしすぎると、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、病原体が死滅しやすくなり、ファイトアレキシンを多量に産生しにくくなる。このことから、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して、100倍以下となるように植物種子を処理するのが好ましく、80倍以下となるように植物種子を処理するのがより好ましく、60倍以下となるように植物種子を処理するのがさらに好ましい。

30

40

## 【 0 0 4 3 】

本発明において、使用される植物種子の種類は、特に限定されず、例えば、ブドウ科(カベルネ・ソーヴィニヨン、ピノ・ノアール等)、マメ科(ダイズ、レッドクローバー等)、ナス科(トマト(レッドペア等)等)キク科、十字花科、シソ科、カラタチ科、バラ科、イチヨウ科、イネ科、クワ科、タデ科、ツバキ科、モクセイ科、ヒイラギ科、ウリ科、ザクロ科の種子等が挙げられ、より具体的には、ブドウ、サンフラワー、カベルネ・ソーヴィニヨン、クローバー、ブラシカ、ゴマ、エゴマ、アマニ、シソ、ピーナツ、米、そば、コーン、小麦、ワイルドライス、大麦、アワ、ヒエ、コロハ、ローズマリー、タイム、セージ、ミント、アメリカンレッドチェリー、アブリコット、アーモンド、グレープ

50

ルーツ、オレンジ、プラム、セントジョンズワート、トマト、イチゴ、ニンジン、ピーマン、マンゴスティーン、マンゴ、ビワ、ゴボウ、カカオ等が挙げられる。植物種子は、ファイトケミカルの含有量が多い方が、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、ファイトアレキシンの産生量が多くなることから、ファイトケミカルの含有量が多い植物種子を用いることが好ましい。この観点で、前処理前の植物種子としては、ファイトケミカルの含有量が1 mg / g 以上であるものを用いることが好ましく、2 mg / g 以上であるものを用いることがより好ましく、4 mg / g 以上であるものを用いることがさらに好ましく、8 mg / g 以上であるものを用いることが最も好ましい。より具体的には、植物種子は、これらのうち、ブドウ科、マメ科、ナス科、シソ科、十字花科の種子は、種子の粒が大きく、ファイトケミカルの含有量が高いことから、好ましい、また、比較的安価で種子が入手できる点においても好ましい。特に、ブドウ、トマトの種子は、ワインやトマトジュース等を製造した際に発生する残渣を用いることができることから、未利用資源の有効活用という観点からも好ましい。

10

**【0044】**

本発明における「ファイトケミカル」とは、少なくとも1種以上のファイトケミカルを指す。ファイトケミカルとしては、従来公知のファイトケミカルであれば特に限定されないが、例えば、イソフラボン等のポリフェノール、リコペン等のテルペノイド、カプサイシン等の長鎖アルキルフェノール誘導体、サポニン等の糖関連化合物、スルフォラファン等の有機硫黄化合物が挙げられる。発芽処理植物種子の製造方法において、ファイトアレキシンの産生量が多くなることから、これらのファイトケミカルのうち、本発明の前処理によって、イソフラボンの量が増えることが好ましい。なお、本発明における「イソフラボン」とは、イソフラボンを基本骨格とするフラボノイドであるイソフラボン類のことを指す。また、本発明において、ファイトケミカルは、ファイトアレキシンであることもありうる。

20

**【0045】**

本発明において、種子中のファイトケミカルの質量は、高速液体クロマトグラフィーにより測定する。

**【0046】**

本発明における前処理工程により、アミノ酸や糖等の、後述の微生物である病原体の栄養素を種子が産生することができる。このアミノ酸や糖が多く産生されることにより、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、多量に産生することができる。アミノ酸は、特に限定されず、植物の栄養素となるものであれば特に限定されない。特に、アミノ酸のうち、グルタミン酸の量が、前処理後に、前処理工程により、質量比で2.5倍以上(3倍以上、3.5倍以上等)に増えることが好ましい。また、糖の量は、前処理前に対し、2.5倍以上に増えることが好ましい。このように、アミノ酸や糖の含有量が増えることにより、後述の発芽処理植物種子の製造方法において、微生物である病原体が死滅しにくくなるため、前処理によりファイトケミカルをより多量に増やすことができる。例えば、アミノ酸であるグルタミン酸の量が、前処理前に対して2.5倍以上の含有量になった場合、ファイトケミカルの量を、前処理前に対して30倍以下(25倍以下、20倍以下等)まで増やすことができる。

30

40

**【0047】**

本発明において、アミノ酸は、U H P L Cにより測定する。また、糖は、H P L Cにより測定する。

**【0048】**

< 発芽処理植物種子の製造方法 >

本発明の発芽処理植物種子の製造方法は、上記発芽誘導用原料種子に微生物である病原体を接種し、発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能かつ病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程を有する。

**【0049】**

( 発芽誘導工程 )

50

本発明の発芽処理植物種子の製造方法における発芽誘導工程は、発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能でかつ病原体を生育可能な環境下に置く工程である。本発明は、この工程により、多量のファイトアレキシンを産生可能な発芽処理植物種子を製造することができる。

【0050】

従来、病原体を用いて、発芽処理植物種子を作成することにより、イソフラボン類等のファイトアレキシンを産生する方法は知られているが (Simons R, Vincken JP, Roidos N, Bovee TF, van Iersel M, Verbruggen MA, Gruppen H. Increasing Soy Isoflavonoid Content and Diversity by Simultaneous Malting and Challenging by a Fungus to Modulate Estrogenicity. J. Agric. Food Chem., 2011, 59 (12), pp 6748 - 6758 参照)、従来の方法によると、病原体と接種してからの期間が9日間と長くかかるため、コストや細菌管理等の問題があり、実用的でなかった。しかしながら、本発明によると、微生物の接種後、9日の時間も要さない短い期間(例えば、1~5日)により、多量のファイトアレキシンを産生することができる。

10

【0051】

本発明における前処理が施された上記発芽誘導用原料種子は、ファイトケミカルの量が多く、このファイトケミカルは、ファイトアレキシンの原料となる。このファイトケミカルが多いため、微生物である病原体を接種しても、腐りにくく、結果として、長時間ファイトアレキシンを産生可能となるため、多量のファイトアレキシンを産生することができる。

20

【0052】

上述のとおり、本発明における前処理により種子中に栄養素であるアミノ酸や糖が大量に産生される。この栄養素により、病原体がファイトケミカルに対抗することができるため、病原体を接種した後に、ファイトケミカルの量が多い状態で病原体が長く生育できる。そして、その際に前処理後の発芽誘導用原料種子を発芽可能な条件下にしておくことで、病原体と前処理後の発芽誘導用原料種子間で相互に刺激が生じ、結果として種子中にファイトアレキシンが効率的に産生されるものと推測される。

30

【0053】

病原体の接種後、上記環境下に置く時間は、特に限定されず、例えば、6時間~7日等であってもよいが、長く置きすぎると、植物が腐りやすくなる恐れがあるため、5日以下が好ましく、4日以下がより好ましい。ただし、上記のとおり種子中のアミノ酸や糖の量が多くなった場合、病原体がより長く生育できるため、病原体の接種後、より長い時間、発芽誘導用原料種子を上記環境下に置くことができる。病原体の接種後、上記環境下に置く時間は、接種前の種子中のファイトアレキシンの量が、どの程度増えたかを基準にして決定してもよく、例えば、接種前の種子中のファイトアレキシンの質量が、1mg/g以上(5mg/g以上、10mg/g以上、15mg/g以上、20mg/g以上、25mg/g以上、30mg/g以上等)となるまで、上記環境下においてもよい。なお、この場合において、少なくとも1種以上のファイトアレキシンの質量が1mg/g以上等となるように上記環境下に置いてもよく、ファイトアレキシン全体の質量が1mg/g以上等となるように上記環境下に置いてもよい。

40

【0054】

本発明において、種子中のファイトアレキシンの質量は、四重極型質量分析器 LC/MS/MSにより測定する。

LCの条件は、以下のとおりである。

カラム: AQCUIY UPLC BEH Shield RP18 Column (1.7 μm, 2.1 mm. x 150 mm), AQCUIY UPLC BEH Shield RP18 Vanguard Pre-Column (1.7 μm, 2.

50

1 mm . x 5 mm )

【 0 0 5 5 】

本発明におけるファイトアレキシンとは、少なくとも1種以上のファイトアレキシンを指す。産生可能なファイトアレキシンは、種子の種類によって異なるが、例えば、ブドウ種子を用いた場合、パイシードやレスベラトロール等のスチルベンを産生可能であり、大豆を用いた場合、種々のグリセオリン（グリセオリンⅠ、グリセオリンⅡ、グリセオリンⅢ、グリセオリンⅣ等）を産生することができる。

【 0 0 5 6 】

本発明において、「病原体」とは、一般的に植物の病原体といわれるものを指しているが、本発明においては、ファイトアレキシンを種子に産生させるために用いられる。本発明における病原体は、微生物であれば特に限定されず、植物種子の種類に応じて、適切な病原体を当業者であれば選択できる。中でも、病原体は、食用微生物であることが好ましい。食用微生物は、特に限定されず、例えば、テンペ菌、麹菌、納豆菌、酵母、乳酸菌、キノコ等が挙げられる。これらのうち、テンペ菌、麹菌、納豆菌、酵母、乳酸菌が好ましく、テンペ菌、麹菌、酵母、乳酸菌がより好ましい。

10

【 0 0 5 7 】

本発明において、病原体の接種は、従来公知の方法により行うことができる。

【 0 0 5 8 】

本発明において、発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能でかつ病原体を生育可能な環境下は、特に限定されず、種子や病原体に応じて適宜設定することができる。

20

【 0 0 5 9 】

例えば、上記の前処理工程のうち同じような条件下にしてもよいが、そのような条件下のうち、発芽誘導可能であり、かつ、病原体が生育可能な条件下を選択する必要がある。発芽誘導可能な環境下とは、例えば、二酸化炭素濃度300～120000ppm、酸素濃度5～20容量%、温度10～45等の環境下が挙げられるが、このような環境下のうち、病原体に必要な二酸化炭素濃度、酸素濃度、温度を考慮して、環境を設定する。例えば、病原体が嫌気性微生物である場合、酸素濃度は低い方が好ましく、好気性微生物である場合、酸素濃度が高い方が好ましい。

【 0 0 6 0 】

<抽出組成物>

本発明の抽出組成物は、上記発芽誘導用原料種子の抽出組成物である。

30

【 0 0 6 1 】

本発明における抽出組成物の調製は、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができるが、例えば、発芽誘導用原料を容器に入れた状態で、水や有機溶媒（エタノール等）を加えて粉碎することによって、行うことができる。また、ファイトアレキシンのような有用物質をさらに精製、単離する工程があってもよい。

【 0 0 6 2 】

本発明における抽出組成物の用途は、特に限定されないが、本発明における抽出組成物には、ファイトアレキシン等の有用な化合物を含みうるので、そのような場合は、抽出組成物は、製剤化して、健康食品、医薬品等として用いるのに好適である。

40

【 0 0 6 3 】

<スクリーニング方法>

本発明のスクリーニング方法は、標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法であって、被験植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程、又は、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように被験植物種子を処理する前処理工程と、前処理工程後に、被験植物種子に微生物である病原体を接種し、発芽誘導用原料種子を発芽誘導可能でかつ病原体を生育可能な環境下に置く発芽誘導工程と、発芽誘導工程後の被験植物種子中の標的物質を検出する工程と、検出できた場合に、その検出結

50

果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程と、を有する。

【0064】

上述した、発芽誘導用原料種子の製造方法及び発芽処理植物種子の製造方法によると、多量のファイトアレキシンを得ることができるが、得られるファイトアレキシンは、植物の種類により様々である。そのため、特定の種類のファイトアレキシン等の有用な化合物を所望の場合、ある植物種子が所望の化合物を生成するか否かは、上述の発芽誘導用原料種子の製造方法及び発芽処理植物種子の製造方法を利用することで確かめることができる。すなわち、上述の発芽誘導用原料種子の製造方法及び発芽処理植物種子の製造方法を利用することで、標的物質の産生に用いることが可能な候補植物種子のスクリーニングが可能である。

10

【0065】

本発明において、標的物質は、特に限定されないが、例えば、本発明のスクリーニング方法においては、ファイトアレキシン等の二次代謝産物を標的物質とすることに適している。ファイトアレキシンの種類も特に限定されず、従来 of 公知のものいづれであってもよい。

【0066】

(前処理工程)

本発明のスクリーニング方法における前処理工程は、被験植物種子を、400ppm以上の二酸化炭素濃度及び/又は19容量%以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して5時間以上保持する前処理工程、又は、前処理工程後の被験植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の被験植物種子のファイトケミカルの質量に対して2倍以上となるように被験植物種子を処理する前処理工程である。かかる前処理工程は、上述した発芽誘導用原料種子の製造方法における前処理工程と同様の工程を用いることができる。

20

【0067】

被験植物種子は、特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができ、従来 of 公知の植物種子を使用することができるが、特に、発芽可能な種子等が好ましい。

【0068】

上述のとおり、本発明における前処理工程により、アミノ酸や糖等の、微生物である病原体の栄養素を種子が生成可能である。よって、前処理工程後に、アミノ酸や糖等を多量に生成可能な被験植物種子は、その後の発芽誘導工程において、ファイトアレキシン等の有用な化合物を産生するのに適している。そのため、本発明のスクリーニング方法においては、前処理工程後に被験植物種子中のアミノ酸や糖の量を測定し、確認する工程があってもよい。特に、アミノ酸のうち、グルタミン酸の量が、前処理後に、前処理工程により、質量比で2.5倍以上(3倍以上、3.5倍以上等)に増えることを確認することが好ましい。

30

【0069】

(発芽誘導工程)

本発明のスクリーニング方法における発芽誘導工程は、上述した発芽処理植物種子の製造方法における発芽誘導工程と同様の工程を用いることができる。

【0070】

(検出工程)

本発明のスクリーニング方法における発芽誘導工程は、発芽誘導工程後の被験植物種子中の標的物質を検出する工程である。

40

【0071】

検出は、従来 of 公知の検出手段を用いることができる。例えば、被験植物種子を破碎して抽出組成物を調製し、高速液体クロマトグラフィーにより検出してもよい。

【0072】

(選択工程)

選択工程は、上述の検出工程後、検出できた場合にその検出結果に基づいて、標的物質の産生に用いられる候補植物種子を選択する工程である。

50

## 【 0 0 7 3 】

選択方法は、特に限定されず、従来公知の選択方法により候補物質を選択すればよい。例えば、上記の検出結果により、目的とする標的物質が産生されたことを確認することによって、被験植物種子を候補植物種子として選択してもよい。あるいは、他の植物種子中の標的物質の量と比較することで、選択を行ってもよい。比較対象の具体例としては、例えば、前処理工程及び発芽誘導工程を行う前の同種の植物種子であってもよく、前処理工程を施し、発芽誘導工程を施していない同種の植物種子であってもよく、あるいは、標的物質を産生することが知られている他種の植物種子であってもよく、標的物質を産生しないネガティブコントロールの植物種子であってもよい。

## 【実施例】

10

## 【 0 0 7 4 】

< ブドウ種子を用いた試験 >

( 実施例 1 )

ブドウ種子 ( 品種 : カベルネ・ソーヴィニヨン ) を用いて、発芽処理植物種子を製造した。まず、前処理として、ブドウ種子 ( 3 0 0 g ) を、略密閉した容器に収容し、8 時間毎に散水 ( 1 分冠水後 / 1 分かけて排水 ) を行うことで、連続して 6 時間、平均の酸素濃度が 1 2 容量 %、二酸化炭素濃度が 2 0 0 0 0 p p m の雰囲気を保持した。散水は、合計 2 1 回行い、前処理工程は合計 7 日行った。なお、水温及び室温の条件は、2 8 とし、散水後の雰囲気化は、酸素濃度 2 0 容量 %、二酸化炭素濃度 3 0 0 ~ 3 9 0 p p m であった。この前処理により、実施例 1 に係る発芽誘導用原料種子を製造した。

20

## 【 0 0 7 5 】

実施例 1 に係る前処理後の発芽誘導用原料種子に酵母 ( 種名 : S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ) を接種してから、発芽誘導を行った。接種は、カリフォルニアワイン酵母 R P 1 5 スターターにより行った。接種後、酸素濃度 8 容量 %、二酸化炭素濃度 2 0 0 0 0 p p m、2 4 の環境下で発芽誘導を行いながら酵母の生育を 6 日行った。これにより、実施例 1 に係る発芽処理植物種子の製造を行った。

## 【 0 0 7 6 】

実施例 1 に係る発芽処理植物種子中のファイトアレキシンであるレスベラトロール及びレスベラトロール配糖体 ( パイシード ) の定量を行った。まず、実施例 1 に係る発芽処理植物種子の質量に対し 1 0 倍希釈となるようにエタノール及び水を加え、1 秒間粉碎し、0 . 5 m m 以下に粉碎した。粉碎後のブドウ種子を含む溶液を 1 5 m l 遠心管に秤取り、2 0 分間超音波処理を行い、抽出組成物を作製した。その後、この抽出組成物を用いて、組成物中の化合物の分析を行った。分析は、以下の条件で行った。

30

カラム : A Q C U I T Y U P L C B E H S h i e l d R P 1 8 C o l u m n ( 1 . 7 μ m , 2 . 1 m m . x 1 5 0 m m ) , A Q C U I T Y U P L C B E H S h i e l d R P 1 8 V a n G u a r d P r e - C o l u m n ( 1 . 7 μ m , 2 . 1 m m . x 5 m m ) / カラム温度 : 3 5 / 水 ( 0 . 1 % 酢酸 )、A C N ( 0 . 1 % 酢酸 ) : 0 - 1 0 m i n 1 5 % , 1 0 - 5 5 m i n 1 0 0 % , 5 5 - 6 0 m i n 1 0 0 % , 6 0 - 7 0 m i n 1 5 %

## 【 0 0 7 7 】

40

( 比較例 1 )

実施例 1 における前処理及び発芽処理を行う前のブドウ種子と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例 1 と同様に抽出組成物を作製し、組成物中の化合物の分析を行った。

## 【 0 0 7 8 】

( 分析結果 1 )

実施例 1、比較例 1 のそれぞれの分析の結果を図 1 に示す。図 1 の ( A ) の矢印が示すピークは、パイシードを示し、( B ) の矢印が示すピークは、レスベラトロールを示す。図 1 に示すとおり、比較例 1 に係るブドウ種子より、実施例 1 に係る発芽処理植物種子の方がパイシード、レスベラトロールが著しく多いことが確認された。また、比較例 1 に係るブドウ種子 ( 前処理前のブドウ種子 ) 中のファイトケミカル量は、1 0 m g / g であっ

50

たのに対し、実施例 1 に係る発芽誘導用原料種子（前処理後の発芽誘導用原料種子）中のファイトケミカル量は、25 mg / g であった。また、実施例 1 に係る発芽処理植物種子中に産生されたファイトアレキシンの量は、10 mg / g であった。

【0079】

< レッドクローバー種子を用いた試験 >

（実施例 2）

植物種子として、レッドクローバー種子を用い、2 日間前処理を行った以外は、実施例 1 と同様の条件で、発芽誘導用原料種子を製造した。

【0080】

実施例 2 に係る前処理後の発芽誘導用原料種子に麹菌（種名：Aspergillus oryzae）を接種してから、発芽誘導を行った。接種は、種麹（秋田今野社）により行った。接種後、酸素濃度 8 容量%、二酸化炭素濃度 20000 ppm、24 の環境下で発芽誘導を行いながら麹菌の生育を 5 日行った。これにより、実施例 2 に係る発芽処理植物種子の製造を行った。

【0081】

実施例 2 に係る発芽処理植物種子中の、ファイトアレキシンである種々のイソフラボンの分析を行った。抽出組成物の作製は、実施例 1 と同様の手順で行った。分析は、以下の条件で行った。

カラム：AQCUIITY UPLC BEH Shield RP18 Column (1.7 μm, 2.1 mm. x 150 mm), AQCUIITY UPLC BEH Shield RP18 VanGuard Pre-Column (1.7 μm, 2.1 mm. x 5 mm) / カラム温度：35 / 水 (0.1% 酢酸)、ACN (0.1% 酢酸) : 0 - 2 min 15 - 20%, 2 - 5 min 25%, 5 - 6 min 30%, 6 - 8 min 40%, 8 - 9 min 45%, 9 - 10 min 45%, 10 - 12 min 50%, 12 - 22 min 100%, 22 - 24 min 100%, 24 - 25 min 15%, 25 - 27 min 15%

【0082】

（実施例 3）

前処理を 4 日行った以外は、全て実施例 2 と同様の条件で、発芽誘導用原料種子の製造、発芽処理植物種子の製造、及びイソフラボンの定量を行った。なお、前処理前のレッドクローバー種子中のファイトケミカル量は、5 mg / g であったのに対し、前処理後の発芽誘導用原料種子中のファイトケミカル量は、40 mg / g であった。

【0083】

（比較例 2）

実施例 2 における前処理及び発芽処理を行う前のレッドクローバー種子と同様の種子（比較例 2 に係る種子）を準備し、これを用いて、実施例 2 と同様に抽出組成物を作製し、組成物中の化合物の分析を行った。

【0084】

（分析結果 2）

実施例 2、3、比較例 3 のそれぞれの分析結果を、図 2 に示す。図 2 中、(A) の矢印が示すピークはトリフォルリジン (Trifolirhizin) を示し、(B) の矢印が示すピークはフォルモノネチン (Formononetin glucoside Malonate) を示し、(C) の矢印が示すピークは、ビオカニン A (Biochanin A glucoside Malonate) を示す。また、図 2 中のトリフォルリジン、フォルモノネチン、及びビオカニン A についての各ピークエリアの面積比を以下の表 1 に示す。

【0085】

10

20

30

40

【表 1】

サンプル 化合物	比較例 2	実施例 2	実施例 3
トリフォーリリジン	73,345(8%)	403,027(47%)	865,862(100%)
フォルモノネチン	27,218(6%)	115,428(27%)	420,822(100%)
ピオカニン A	2,579(3%)	39,649(43%)	92,768(100%)

10

## 【0086】

図 2、表 1 に示すように、何の処理も施していない比較例 2 に係る種子に対し、実施例 2 及び 3 に係る発芽処理植物種子においては、トリフォーリリジン、フォルモノネチンの量が増えていることが確認された。特に、4 日間前処理を行った実施例 3 に係る発芽処理植物種子は、比較例 2 に係る種子に対して、トリフォーリリジンが 11.80 倍、フォルモノネチンが 15.46 倍、ピオカニン A が 35.90 倍に増えていることが確認された。なお、比較例 2 に係るレッドクローバー種子（前処理前のレッドクローバー種子）中のファイトケミカル量は、5 mg / g であったのに対し、実施例 2 に係る発芽誘導用原料種子（前処理後の発芽誘導用原料種子）中のファイトケミカル量は、20 mg / g であった。また、実施例 3 に係る発芽誘導用原料種子（前処理後の発芽誘導用原料種子）中のファイトケミカル量は、上述のとおり 40 mg / g であり、実施例 3 に係る発芽処理植物種子中に産生されたファイトアレキシンの量は、30 mg / g であった。

20

## 【0087】

< トマト種子を用いた試験 >

（実施例 4）

植物種子として、トマト（品種：レッドベア）種子を用いた以外は、実施例 1 と同様の条件で、発芽誘導用原料種子を製造した。

## 【0088】

実施例 4 に係る発芽処理植物種子の抽出組成物を調製し、ファイトケミカルの分析を行った。分析は、以下の条件で行った。

30

分析機器：日立高速液体クロマトグラフ（HPLC）/ 検出器：UV 検出器 / カラム：ジューエルサイエンス ODS（6.0 mm I.D. x 150 mm）/ カラム温度：35 / 水（0.1% 酢酸）、ACN（0.1% 酢酸）：0 - 10 min 15%，10 - 55 min 100%，55 - 60 min 100%，60 - 70 min 15%

## 【0089】

（比較例 3）

実施例 4 における前処理を行う前のトマト種子と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例 4 と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルの分析を実施例 4 と同様の条件で行った。

40

## 【0090】

（分析結果 3）

実施例 4、比較例 3 のそれぞれの分析した結果を図 3 に示す。図 3 に示すとおり、ファイトケミカルが変化したことが確認された。具体的には、ファイトケミカルのうち、特にナリンゲニカルコンが増えたことが確認された。図 3 における、（A）の矢印のピークが、ナリンゲニカルコンを示す。また、比較例 3 に係るトマト種子（前処理前のトマト種子）中のファイトケミカル量は、4 mg / g であったのに対し、実施例 4 に係る発芽誘導用原料種子中のファイトケミカル量は、16 mg / g であった。

## 【0091】

< 大豆を用いた試験 >

50

## (実施例 5)

植物種子として、大豆(品種:オオツル)を用い、また、保持の際の酸素濃度を10容量%、二酸化炭素濃度を40000ppmの雰囲気とし、1日間前処理を行った以外は、実施例1と同様の条件で前処理工程を行い、発芽誘導用原料種子を製造した。

## 【0092】

実施例5に係る発芽誘導用原料種子を破砕して、抽出組成物を調製し、ファイトケミカルであるイソフラボンの分析を行った。分析は、以下の条件で行った。

分析機器:島津高速液体クロマトグラフ(UHPLC)/検出器:フォトダイオードアレイ検出器/カラム:Shim-pack XR-ODSIII(2.0mm I.D. × 150mm)/カラム温度:35 /水(0.1%酢酸)、ACN(0.1%酢酸):  
0-2min15-20%, 2-5min25%, 5-6min30%, 6-8min40%, 8-9min45%, 9-10min45%, 10-12min50%, 12-22min100%, 22-24min100%, 24-25min15%, 25-27min15%

10

## 【0093】

## (実施例 6)

大豆の品種として、アキタミドリを用いた以外は、実施例5と同様の条件で、発芽誘導用原料種子を製造した。

## 【0094】

実施例6に係る発芽誘導用原料種子を破砕して、抽出組成物を調製し、ファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

20

## 【0095】

## (実施例 7)

大豆の品種として、クロセンゴクを用いた以外は、実施例5と同様の条件で、発芽誘導用原料種子を製造した。

## 【0096】

実施例7に係る発芽誘導用原料種子を破砕して、抽出組成物を調製し、ファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

## 【0097】

## (比較例 4)

実施例5における前処理を行う前の大豆(品種:オオツル)と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例5と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

30

## 【0098】

## (比較例 5)

実施例6における前処理を行う前の大豆(品種:アキタミドリ)と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例6と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

## 【0099】

## (比較例 6)

実施例7における前処理を行う前の大豆(品種:クロセンゴク)と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例7と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

40

## 【0100】

## (比較例 7)

実施例5における保持の際の酸素濃度を20容量%、二酸化炭素濃度を390ppmとした以外は、実施例5と同様の条件により、抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例5と同様の条件で行った。

## 【0101】

## (比較例 8)

50

実施例 6 における保持の際の酸素濃度を 20 容量%、二酸化炭素濃度を 390 ppm とした以外は、実施例 6 と同様の条件により、抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例 5 と同様の条件で行った。

【0102】

(比較例 9)

実施例 7 における保持の際の酸素濃度を 20 容量%、二酸化炭素濃度を 390 ppm とした以外は、実施例 7 と同様の条件により、抽出組成物を作製し、組成物中のファイトケミカルであるイソフラボンの分析を実施例 5 と同様の条件で行った。

【0103】

(分析結果 4)

実施例 5 ~ 7、比較例 4 ~ 9 についてのファイトケミカルであるイソフラボンの量を図 4 に示す。図 4 中、「before germination」は、発芽を誘導する処理を何ら行っていない種子(比較例 4 ~ 6 に係る大豆)を示し、「germination / aerobic condition」は、好気条件下で発芽を誘導する処理を行った種子(比較例 7 ~ 9 に係る大豆)を示し、「germination / micro-aerobic condition」は、嫌気条件下で発芽を誘導する前処理を行った種子(実施例 5 ~ 7 に係る発芽誘導用原料種子)を示す。図 4 に示すとおり、何ら処理を行ってない比較例 4 ~ 6 に係る大豆や、酸素容量 20% の好気条件の雰囲気条件下において処理された比較例 7 ~ 9 に係る大豆に対し、実施例 5 ~ 7 に係る発芽誘導用原料種子中のファイトケミカルであるイソフラボンが、2.8 ~ 3.0 倍高かったことが確認された。この結果からも、本発明における前処理により、植物種子中のファイトケミカル量が上昇することが確認された。

【0104】

また、実施例 5 ~ 7 に係る発芽誘導用原料種子、比較例 4 ~ 9 に係る大豆中に含まれる、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量を、図 5 に示す。図 5 中、(a) は、比較例 4 ~ 6 に係る大豆の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示し、(b) は、比較例 7 ~ 9 に係る大豆の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示し、(c) は、実施例 5 ~ 7 に係る発芽誘導用原料種子の抽出組成物中における、ファイトケミカルである種々のイソフラボンの量のグラフを示す図である。図 5 に示すとおり、比較例 4 ~ 9 に係る大豆と比較して、実施例 5 ~ 7 に係る発芽誘導用原料種子は、特に、マロニル-ゲニスチン(malonyl-genistin)、マロニル-ダイジン(malonyl-daizinin)の量が著しく多かったことが確認された。

【0105】

(実施例 8)

実施例 5 と同様の条件により、植物種子として、大豆(品種:オオツル)を用い、また、保持の際の酸素濃度を 10 容量%、二酸化炭素濃度を平均で 40000 ppm の雰囲気とした以外は、実施例 1 と同様の条件で前処理工程を行い、発芽誘導用原料種子を製造した。

【0106】

実施例 8 に係る発芽誘導用原料種子を用いて、病原体として、テンペ菌(菌種:Rhizopus sp.)を用いた以外は、実施例 1 と同様の手順により実施例 2 に係る発芽処理植物種子の製造を行った。

【0107】

実施例 8 に係る発芽処理植物種子中の、グリセオリンの分析を行った。抽出組成物の作製は、実施例 1 と同様の手順で行った。分析条件は以下のとおりであった。

分析機器:島津高速液体クロマトグラフ(UHPLC)/検出器:フォトダイオードアレイ検出器/カラム:AQCUIITY UPLC BEH Shield RP18 Column (1.7 μm, 2.1 mm. x 150 mm), AQCUIITY UPLC BEH Shield RP18 Vanguard Pre-Column (1.7

10

20

30

40

50

μm, 2.1 mm. × 5 mm) / カラム温度: 35 / 水 (0.1% 酢酸)、ACN (0.1% 酢酸): 0 - 2 min 15 - 20%, 2 - 5 min 25%, 5 - 6 min 30%, 6 - 8 min 40%, 8 - 9 min 45%, 9 - 10 min 45%, 10 - 12 min 50%, 12 - 22 min 100%, 22 - 24 min 100%, 24 - 25 min 15%, 25 - 27 min 15%

【0108】

(実施例9)

病原体として、麹菌(菌種: *Aspergillus* sp)を用いた以外は、実施例8と同様の条件で、発芽誘導用原料種子の製造、発芽処理植物種子の製造、抽出組成物の調製、及びグリセオリンの分析を行った。

10

【0109】

(実施例10)

病原体として、乳酸菌(*Lactobacillus* sp.)を用いた以外は、実施例8と同様の条件で、発芽誘導用原料種子の製造、発芽処理植物種子の製造、抽出組成物の調製、及びグリセオリンの分析を行った。

【0110】

(比較例10)

病原体を用いない以外は、全て実施例8~10と同様の条件で、発芽誘導用原料種子の製造、発芽処理植物種子の製造、抽出組成物の調製、及びグリセオリンの分析を行った。

【0111】

(分析結果5)

実施例8~10、比較例10についてのグリセオリンの量を図6に示す。図6に示すとおり、病原体を接種していない比較例10に対して、実施例8~10に係る発芽処理植物種子においては、グリセオリンの量が著しく多いことが確認された。なお、実施例8に係る発芽処理植物種子中に産生されたファイトアレキシンの量は、25 mg/gであった。実施例9に係る発芽処理植物種子中に産生されたファイトアレキシンの量は、25 mg/gであった。実施例10に係る発芽処理植物種子中に産生されたファイトアレキシンの量は、25 mg/gであった。

20

【0112】

また、実施例9に係る発芽処理植物種子について、麹菌の接種後からの時間の経過とともに(0~4日)、グリセオリンI~Vがどの程度増えるかについて調べた。その結果を図7に示す。図7中、「I」~「V」は、それぞれ、「グリセオリンI~V」のことを示す。なお、図7中、最も質量が多いものを100%としている。図7に示すとおり、グリセオリンのうち、グリセオリンIIIとIVが、顕著に増えることが確認された。特に、グリセオリンIIIは、乳がんの抑制、美肌効果等の有効性が知られている。よって、植物種子として大豆を用い、本発明の方法により発芽処理植物種子を製造することで、グリセオリンの量が増えるだけでなく、有用なグリセオリンIIIの割合が増加することが示された。

30

【0113】

(実施例11)

植物種子として、大豆(品種: オオツル)を用いた以外は、実施例1と同様の条件で、発芽誘導用原料種子を製造した。

40

【0114】

実施例11に係る発芽誘導用原料種子を破碎して抽出組成物を調製し、アミノ酸について分析を行った。分析条件は以下のとおりであった。

島津高速液体クロマトグラフ(UHPLC) / 検出器: 蛍光検出器 / カラム: YMC Triart C18 1.9 mm (50 mm L. × 3.0 mm I. D.) / カラム温度: 35 / 水 (0.1% 酢酸)、ACN (0.1% 酢酸): 0 - 1.5 min 9.5%, 1.5 - 4.5 min 18.5%, 4.5 - 6.5 min 25%, 6.5 - 8.5 min 45%, 8.5 - 12 min 85%

50

## 【 0 1 1 5 】

( 比較例 1 1 )

実施例 1 1 における前処理を行う前の大豆と同様の種子を準備し、これを用いて、実施例 1 1 と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のアミノ酸の分析を実施例 1 1 と同様の条件で行った。

## 【 0 1 1 6 】

( 比較例 1 2 )

実施例 1 1 における前処理を行わず、かわりに通常の発芽処理（条件：酸素濃度 2 0 容量 %、二酸化炭素濃度 3 0 0 p p m の雰囲気、温度 2 6 の条件下）を行った以外は、実施例 1 1 と同様に抽出組成物を作製し、組成物中のアミノ酸の分析を実施例 1 1 と同様の条件で行った。

10

## 【 0 1 1 7 】

( 分析結果 6 )

実施例 1 1、比較例 1 1、1 2 のそれぞれの分析結果を図 8 に示す。図 8 より、実施例 1 1 に係る発芽誘導用原料種子は、何ら処理を行っていない比較例 1 1 に係る大豆、通常の発芽処理を行った比較例 1 2 に係る大豆と比較して、アミノ酸の量が増えていることが確認された。特に、グルタミン酸の量は、著しく増えていたことが確認された。

## 【 0 1 1 8 】

本発明における前処理によって、ファイトケミカルが増えるために、病原体を接種しても生育しにくくなる。しかしながら、このように、前処理により種子中に病原体にとっての栄養素であるアミノ酸が大量に増えるため、病原体がファイトケミカルに対抗することができる。そのため、微生物である病原体を接種した実施例においては、ファイトケミカルの量が多い状態で病原体が生育でき、その際に病原体と前処理後の発芽誘導用原料種子との間で相互に刺激が生じたために、結果として種子中にファイトアレキシンが大量に生成されたものであると推測される。

20

## 【 要約 】

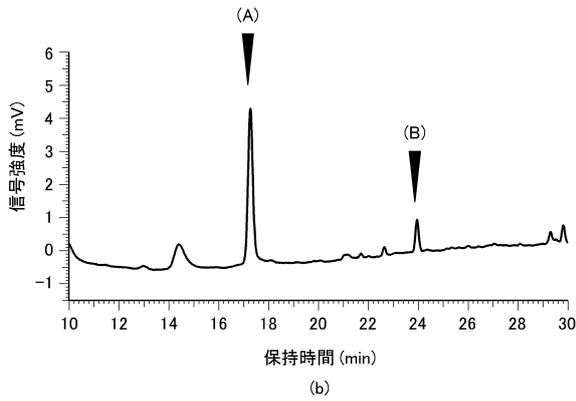
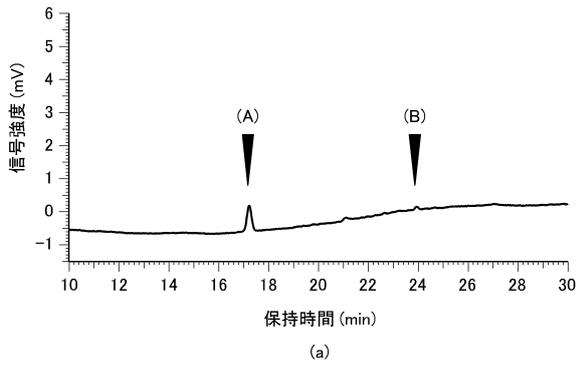
【課題】多量のファイトアレキシンの産生に適した新規な発芽処理植物種子の製造方法、このような発芽処理植物種子の製造に用いられる発芽誘導用原料種子の製造方法、発芽処理植物種子の抽出組成物、及び、標的物質の産生に用いられる候補植物種子のスクリーニング方法を提供する。

30

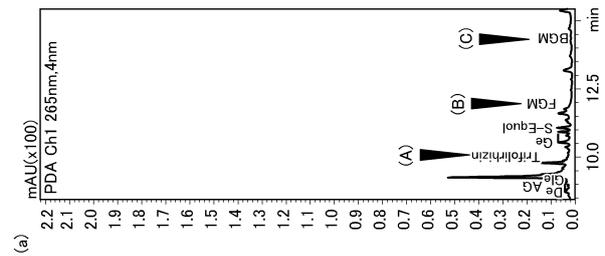
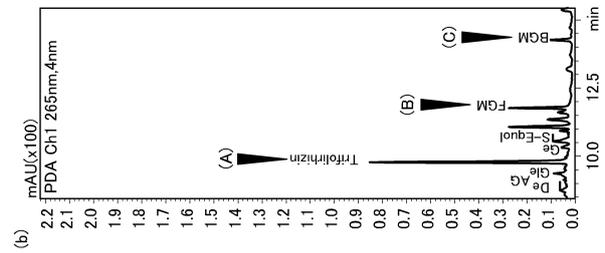
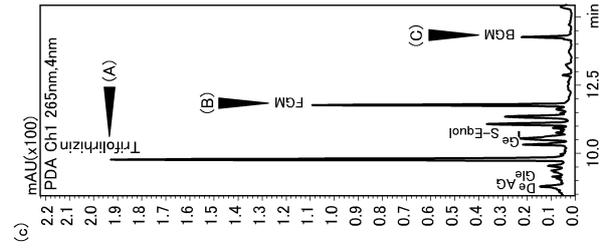
【解決手段】発芽誘導用原料種子の製造方法は、植物種子を、4 0 0 p p m 以上の二酸化炭素濃度及び / 又は 1 9 容量 % 以下の酸素濃度の雰囲気条件下に連続して 5 時間以上保持する前処理工程を有する。又は、発芽誘導用原料種子の製造方法は、前処理工程であって、前処理工程後の植物種子中のファイトケミカルの質量が、前処理工程前の植物種子のファイトケミカルの質量に対して 2 倍以上となるように植物種子を処理する前処理工程を有する。

## 【 選択図 】 図 1

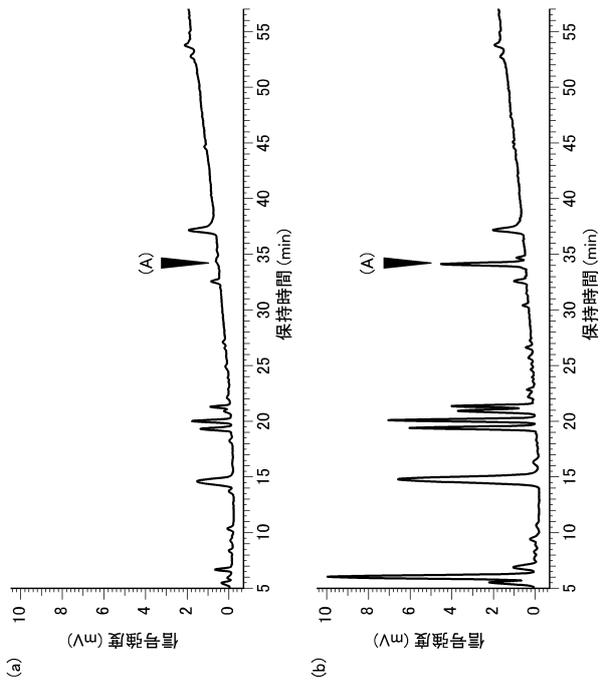
【 図 1 】



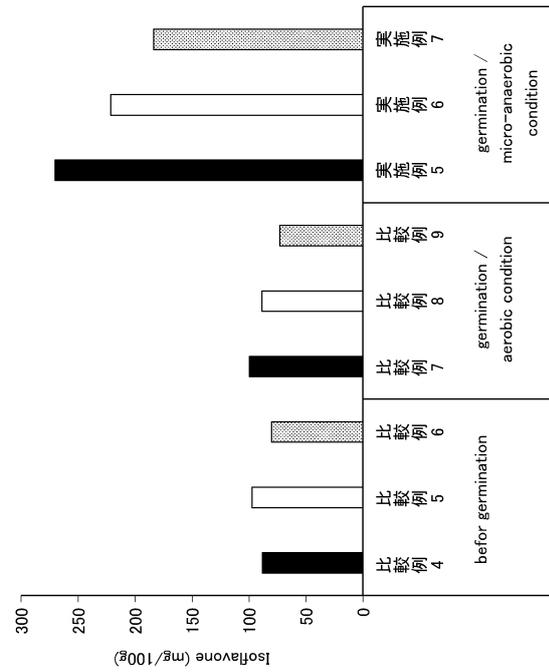
【 図 2 】



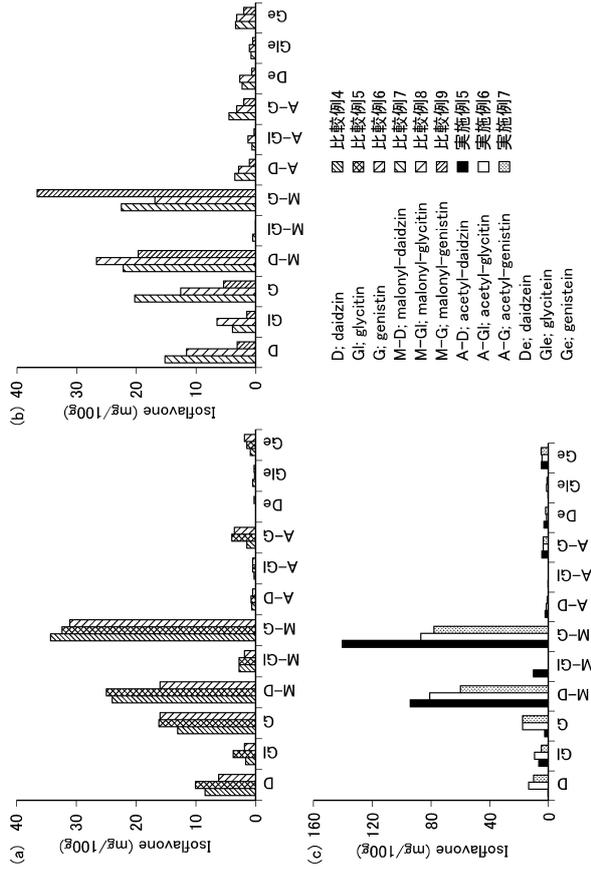
【 図 3 】



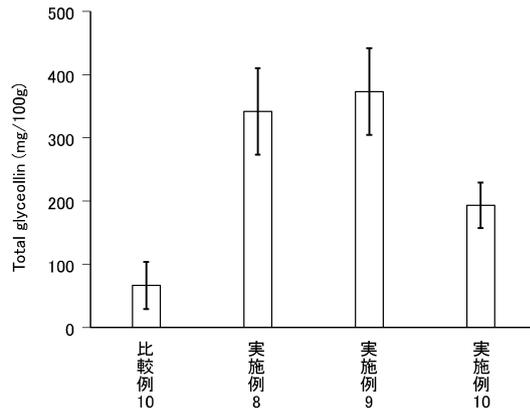
【 図 4 】



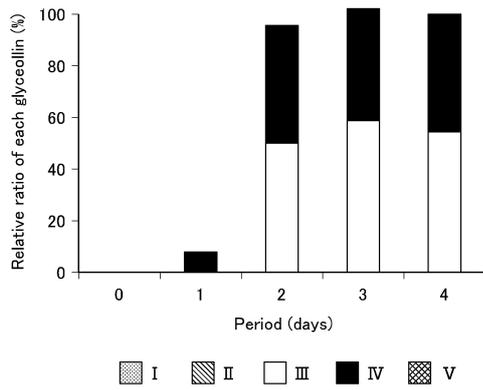
【 図 5 】



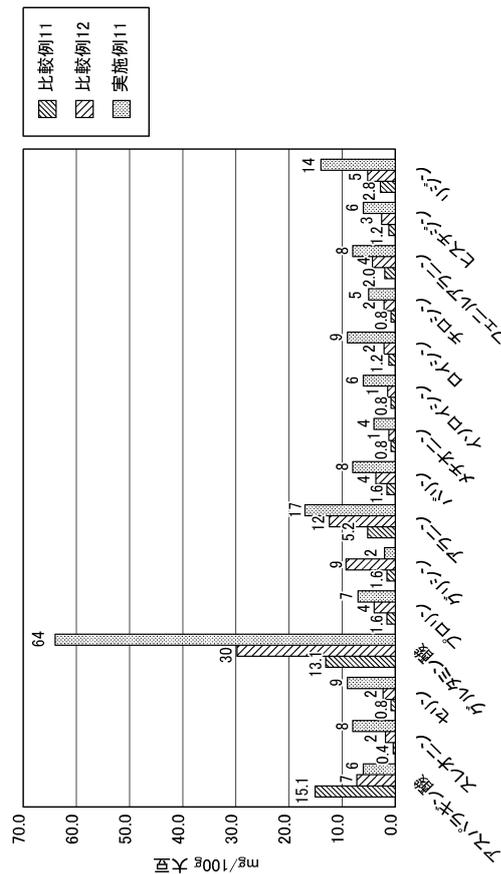
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 P	17/18	(2006.01)	C 1 2 P	17/18 D
C 1 2 P	19/02	(2006.01)	C 1 2 P	19/02
A 0 1 C	1/00	(2006.01)	A 0 1 C	1/00 A

(72)発明者 落合 孝次  
 熊本県上益城郡益城町田原 1 1 5 5 - 5 株式会社果実堂内

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 特開 2 0 0 8 - 1 2 5 5 1 5 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 2 - 5 2 1 7 4 6 ( J P , A )  
 特開 2 0 1 1 - 2 0 0 1 4 9 ( J P , A )  
 特開 2 0 0 1 - 3 2 2 9 0 6 ( J P , A )  
 特開 2 0 1 0 - 0 6 3 4 5 4 ( J P , A )  
 SIMONS, R., et al., J. Agric. Food Chem., 2 0 1 1 年, Vol.59, pp.6748-6758  
 CIMMINO, A., et al., Phytochem. Rev., 2 0 1 3 年, Vol.12, pp.653-672  
 DIXON, R.A., et al., Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1  
 9 8 3 年, Vol.55, pp.1-136  
 WU, Z., et al., J. Agric. Food Chem., 2 0 1 1 年, Vol.59, pp.5993-6003  
 PEDRAS, M.S.C., et al., J. Agric. Food Chem., 2 0 0 8 年, Vol.56, pp.9949-9961

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 1 9 / 6 4  
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 3 8  
 A 0 1 H 3 / 0 0 - 7 / 0 0  
 A 0 1 C 1 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )