

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-191899

(P2012-191899A)

(43) 公開日 平成24年10月11日(2012.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B 0 1 8
<b>A 2 3 L</b> 1/30 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 Z	4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/445 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 5 4
C 0 7 D 211/46 (2006.01)	A 6 1 K 31/445	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-58857 (P2011-58857)  
 (22) 出願日 平成23年3月17日 (2011.3.17)

(71) 出願人 504157024  
 国立大学法人東北大学  
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号  
 (71) 出願人 505426945  
 株式会社プロジェクト・エム  
 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-4  
 O-307号  
 (71) 出願人 000116943  
 旭松食品株式会社  
 長野県飯田市駄科1008番地  
 (74) 代理人 100059281  
 弁理士 鈴木 正次  
 (74) 代理人 100108947  
 弁理士 涌井 謙一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アザ糖を生産する微生物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】アザ糖を含む食品、食品添加物、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品等を提供する。

【解決手段】培養液上清、あるいは、菌体破砕物を分析することによりアザ糖が検出される、アザ糖1-デオキシノジリマイシンを生産する微生物、特にパチルス属のBacillus a myloliquefaciens AS385株、またはBacillus subtilis B4株。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

培養液上清、あるいは、菌体破砕物を分析することによりアザ糖が検出されるアザ糖を生産する微生物。

## 【請求項 2】

バチルスに分類され、アザ糖の生産能を有する請求項 1 のアザ糖を生産する微生物。

## 【請求項 3】

前記アザ糖が 1 - デオキシノジリマイシンであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のアザ糖を生産する微生物。

## 【請求項 4】

16sRNA 遺伝子が、配列表の配列番号 1 および、配列番号 2 に記載の塩基配列で示されるものであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項記載の微生物アザ糖を生産する微生物。

## 【請求項 5】

前記微生物が、バチルス・アミロリクエファシエンス AS385 (*Bacillus amyloliquefaciens* AS385) 株 (FERMAP-22049) または、バチルス・サブティリス B4 (*Bacillus subtilis* B4) (FERMAP-22050) 株であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか一項記載のアザ糖を生産する微生物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は大豆発酵食品として食経験のある食品から得られた *Bacillus* 属の微生物とその生産物の提供に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アザ糖 (Azasugar) は、単糖の環内酸素原子をイミノ基で置換したイミノシクリトールの総称である。代表的なアザ糖としては、ノジリマイシン、マンノジリマイシン、ガラクトスタチンやそれらのデオキシ体が知られている。これらは、いずれもグルコシダーゼ、マンノシダーゼおよびガラクトシダーゼの阻害剤である。

## 【0003】

特に、グルコシダーゼの阻害剤は 2 型糖尿病において食後高血糖改善薬として注目を集めている。これらは小腸粘膜刷子縁の  $\alpha$ -グルコシダーゼに結合し小腸での糖質の分解、吸収を阻害、遅延することにより食後高血糖を抑えることができる。またいくつかの治療薬が認可され食後高血糖の改善薬としての位置づけが既に確立されている。

## 【0004】

アザ糖は、桑 (*Morus alba*)、ツクサ (*Commelina communis*) 中に存在すること、放線菌 (*Streptomyces subbrutilus*、*S. lavendulae*)、バチルス属の微生物 (*Bacillus subtilis*、*B. atrophaeus*) による生産が推定されている。

## 【0005】

また、豆チ (トウチ)、大徳寺納豆、浜納豆、清国醬などの食品がアザ糖を有効成分 (関与成分) として血糖値を下げると言われている。

## 【0006】

現在精力的に進められているのが桑を利用したものである。桑には強力な  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害剤である 1 - デオキシノジリマイシンが含まれている。製品としては、桑葉を乾燥させ打錠にしたもの、桑葉を茶にしたものがある。特に根皮は古くから漢方薬として利用されている。また技術としては抽出物を利用するものなどがある。

## 【0007】

1 - デオキシノジリマイシンは試験管内の実験では非常に強力な  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害を示すもののヒト試験において生体内では試験管内ほどの作用を示さないことも報告

10

20

30

40

50

されている。また食後血糖値の低下という点においては高濃度で有意な差が示されているものの、長期投与においては効果的な結果がまだ得られていない。

【0008】

一方、動物試験（ラット）においては効果的な結果が得られていることから、ヒトに投与することによって効果が期待できる量の1-デオキシノジリマイシンをはじめとするアザ糖の効率的な生産方法が望まれる。

【0009】

前述の桑葉を基にした生産物は天候、気温などの外的要因に影響に左右されることもあり、生育の時間が必要な他、葉を処理するにあたりいくつかの加工工程が必要になる。

【0010】

微生物での発酵生産では人為的に生産をコントロールすることが可能であり、特に乾燥、濃縮においてはスプレードライなどの簡便な方法も利用できる。

【0011】

放線菌、Bacillus属の細菌によるアザ糖の生産について、例は少ないもののいくつか報告されている（特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】特開2008-222701号公報

【特許文献2】特開2004-294384号公報

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Hardick D. J. et al: Tetrahedron Vol 48, NO. 30, pp 6285 - 6296 (1992)

【非特許文献2】Hardick D. J. et al: Tetrahedron Vol 49, NO. 30, pp 6707 - 6716 (1993)

【非特許文献3】Stein D.C. et al: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 48, No. 2, pp. 280-284 (1984)

【非特許文献4】Kojima M.: Journal of Fermentation and Bioengineering Vol 79, No. 4 pp391-394 (1995)

【非特許文献5】Kimura T. et al: J. Agric. Food Chem., 52, 1415-1418 (2004)

【非特許文献6】Kimura T. et al: J. Agric. Food Chem., 55, 8928-8933 (2007)

【非特許文献7】Nakagawa K. et al: Anal. Biochem., 404, 217-222 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

前述した特許文献1、非特許文献1～4の報告の中には1-デオキシノジリマイシンをはじめとするアザ糖の存在が示されていない、または定量的に示されていないので、推定にすぎない。

【0015】

本発明はアザ糖を含む食品、食品添加物、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品等を提供することを最終目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

請求項1記載の発明は、  
培養液上清、あるいは、菌体破砕物を分析することによりアザ糖が検出されるアザ糖を生産する微生物  
である。

【0017】

請求項2記載の発明は、

10

20

30

40

50

バチルスに分類され、アザ糖の生産能を有する請求項 1 のアザ糖を生産する微生物である。

【0018】

請求項 3 記載の発明は、

前記アザ糖が 1 - デオキシノジリマイシンであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のアザ糖を生産する微生物

である。

【0019】

請求項 4 記載の発明は、

16sRNA 遺伝子が、配列表の配列番号 1 および、配列番号 2 に記載の塩基配列で示されるものであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項記載の微生物アザ糖を生産する微生物

である。

10

【0020】

請求項 5 記載の発明は、

前記微生物が、バチルス・アミロリクエファシエンス AS385 (*Bacillus amyloliquefaciens* AS385) 株 (FERMAP-22049) または、バチルス・サブティリス B4 (*Bacillus subtilis* B4) (FERMAP-22050) 株であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか一項記載のアザ糖を生産する微生物

である。

20

【発明の効果】

【0021】

本発明により、食品、または経口摂取可能な食品、食品添加物などとして利用可能な、1 - デオキシノジリマイシンをはじめとするアザ糖を生産出来る微生物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図 1】実施例 1 の分離パターン (クロマトグラム) である。横軸は分析時間、縦軸は検出量を示す。

【図 2】実施例 2 の分離パターン (クロマトグラム) である。横軸は分析時間、縦軸は検出量を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0023】

1 - デオキシノジリマイシンをはじめとするアザ糖を含む食品、食品添加物、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品等を提供するという本発明の目的上、高い安全性が要である。本発明におけるアザ糖生産能を持つ微生物は、豆チ、大徳寺納豆、浜納豆、清国醬をはじめとする大豆発酵食品または、大豆由来原料を由来とする。これら食品は長い食経験を有することから、安全性については危惧するに及ばない。

【0024】

本発明においては、これらの食品中から単離された微生物を用いアザ糖の発酵生産、含有食品、添加物、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品の生産を行う。

40

【0025】

本発明は、大豆発酵食品より分離されたバチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens* AS385) 株 (寄託番号: FERMAP-22049) および、バチルス・サブティリス B4 (*Bacillus subtilis* B4) 株 (寄託番号: FERMAP-22050) を利用し、大豆発酵食品または、大豆由来原料を主成分とする培地を利用した発酵生産物、食品、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品等を生産するものである。

【0026】

本発明の微生物の単離源としては、豆チ、大徳寺納豆、浜納豆、清国醬をはじめとする大豆発酵食品などを使用できる。これらに限定するものではないが、長期にわたり食経験

50

がある物が良い。

【0027】

これら発酵食品を滅菌水に懸濁し、懸濁液の一部を、LB培地、標準寒天培地などに塗抹し、培地を37℃で培養、現れた集落から釣菌し候補株とする。

【0028】

得られた候補株を液体培地にて培養し、その培養上清についてα-グルコシダーゼの阻害活性について評価を行う。培養液としては、アザ糖が生産される培地であれば何であっても良く、具体的には、大豆煮汁(Brix 2% pH 7.3)を用いた培地やLB培地、2%大豆ペプトンなどが挙げられる。

【0029】

培養は37℃で3日間行い、13000rpmで5分間遠心分離を行ったあと、培養上清の一部を採取し、それを検体としてα-グルコシダーゼの阻害活性の測定を行う。

【0030】

α-グルコシダーゼ阻害活性評価を行う際は酵素としてパン酵母、ラット小腸、ウサギ小腸などの由来の物を使用し、基質としてはp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド、スクロース、マルトースなどを用いる。反応停止にはトリス塩酸系緩衝液、炭酸塩緩衝液などを用いる。

【0031】

本発明におけるα-グルコシダーゼとは糖のβ-グリコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素のことである。よってα-グルコシダーゼ阻害活性とは、スクロース、マルトースを分解したときに生成する遊離のグルコース、フルクトースの量、合成基質p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドにおいては遊離してくるp-ニトロフェノールの量を指標とし、検体溶液の添加反応時の生成量、または吸光度の増加を、検体溶液無添加反応時の生成量または吸光度の増加で割った値を阻害率とする。なお阻害率が50%を示したときの酵素反応時における検体濃度をIC50値として定義し、これをα-グルコシダーゼ阻害活性の尺度とする。

【0032】

α-グルコシダーゼ阻害活性の評価の良かった菌株について、再度培養し遠心分離後、培養上清を凍結乾燥した。

【0033】

上述して得た検体を、特許文献2および非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7などに記載されている方法(例えば、試料を親水性相互液体クロマトグラフィー(HILIC)で分離し、1-デオキシノジリマイシンを光散乱検出器で検出する方法)によりアザ糖の検出と定量を行った。

【0034】

このようにして、本発明者らは後述する実施例に準じてバチルス・アミロリクエファシエンスAS385株(Bacillus amyloliquefaciens AS385株)およびバチルス・サブティリスB4(Bacillus subtilisB4)株を単離し、2010年12月16日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託した。当該菌株はそれぞれFERM AP-22049、FERM AP-22050として寄託されている。

【0035】

以下、実施例に基づき本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0036】

スクリーニング

市販の納豆、浜納豆、稲藁、日本国内で輸入品の豆チおよび韓国国内の量販店で手に入れた清国醬を滅菌生理食塩水に懸濁した。懸濁液を培地1枚あたり100μl採取し、標準寒天培地上に塗抹、37℃にて24時間培養した。培養後、形成されたいくつかの集落より釣菌し取得菌株とした。それぞれ、5mlの2%大豆ペプトンにて37℃にて3日間振盪

10

20

30

40

50

培養した。培養液を13000 rpm、5分間遠心分離し、上清を採取し、試料とした。

【0037】

培養上清を試料として  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性評価を行った。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性評価の方法は下記の通りである。

【0038】

腸アセトンパウダー ラット由来 (SIGMA社) 0.125 g に 50 mM リン酸ナトリウム酸緩衝液 / 100 mM NaCl (pH 7.0) 5 mL を添加し、4℃にて2時間以上静置した。4℃ 13000 rpm で10分間遠心分離し、上清を酵素液とした。基質溶液として 1.0 mM p-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコピラノシド (50 mM リン酸ナトリウム酸緩衝液 / 100 mM NaCl (pH 7.0))、反応停止液として 0.3 M 炭酸ナトリウム溶液を用いた。

10

【0039】

検体液 50  $\mu$ l に対して酵素液 50  $\mu$ l を添加した。室温で10分間プレインキュベートしたあと、基質溶液を 100  $\mu$ l 添加した。120分間反応させ、反応停止液を 100  $\mu$ l 添加した。酵素反応前に予め反応停止液を添加した物をブランクとし、マイクロプレートリーダー (パイオラッド社製: Model 550) にて被検溶液の 405 nm における吸光度を測定した。

【0040】

以上の方法から得られた菌株を再度同様の方法で確認試験を行い再現性の得られた菌株について候補株とした。候補株のうち豆チから得られた菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号 2 となった。この株は *Bacillus subtilis* に分類されると結論づけ、この株をパチルス・サブティリス B4 (*Bacillus subtilis* B4) 株と命名した。そして本菌株を用いて液体培養を行った。

20

【0041】

次に 500 ml 容積の坂口フラスコにて、50 ml の 4% 大豆ペプトン (DIFCO Select Soytone: Becton, Dickinson and Company) と 2% の炭素源とした培地で候補株を 7 日間培養した。培養液を 1 日目、3 日目、7 日目で適量採取し、13000 rpm、10 分間遠心分離後、上清を凍結乾燥し、試料とした。

【0042】

試料に凍結乾燥前の上清と等量のエタノール:蒸留水 (1:1, V/V) 溶液を加え、を 45  $\mu$ m ポアサイズの PTFE メンブランで濾過し、そのうち 10  $\mu$ l に濾液にアセトニトリル:蒸留水:蟻酸 (50:49.9:0.1, V/V/V) を 990  $\mu$ l 加えた物を測定試料溶液とした。

30

【0043】

1-デオキシノジリマイシンの定量およびアザ糖の検出は、HILIC-タンデム質量分析法 (HILIC-MS/MS) 法で行った。HPLC は、島津製作所社製 (ポンプ: LC-20AD、カラム恒温槽: CTO-20A、オートサンプラー: SIL-20AC) を使用した。カラムは東ソー社製 TSK GEL Amide-80 (2.0  $\times$  100 mm) を使い、カラム温度 40℃、移動相はアセトニトリル (0.1% 蟻酸を含む) と水 (0.1% 蟻酸を含む)、流速 0.2 mL/min のグラジエント展開で溶出した。質量分析計はエービーサイエックス社製 API 3200 を使用した。桑葉 1-デオキシノジリマイシン量は、1-デオキシノジリマイシン標品を用いた検量線から算出した。

40

【0044】

その結果、表 1 中に示す 1-デオキシノジリマイシンの含有が培養上清中に確認された。また図 1 にクロマトグラムの例を示す。

【表 1】

1-デオキシノジリマイシン濃度(培地中)											
炭素源 2%	なし	ぶどう糖	果糖	シヨ糖	ソルビトール	ガラクトース	麦芽糖	ラフィノース	グリセリン	デンプン	
1日目	2.9	2.9	2.0	2.2	5.7	10.2	6.3	3.2	2.4	4.6	
3日目	4.9	6.5	5.0	6.3	32.4	23.4	20.4	8.4	6.4	13.0	
7日目	6.3	7.1	5.4	7.8	41.7	27.8	23.7	9.8	9.7	14.8	( $\mu\text{g/mL}$ )

## 【0045】

以上のことよりパチルス・サブティリスB4 (*Bacillus subtilis*B4) 株がデオキシノジリマイシンを含むアザ糖の生産能を有すると結論づけ独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託した(寄託番号: FERMAP-22050)。

10

## 【実施例 2】

## 【0046】

日本全国より収拾された稲藁および、韓国国内の量販店で手に入れた清国醬を滅菌生理食塩水に懸濁した。懸濁液を培地1枚あたり100 $\mu\text{l}$ 採取し、標準寒天培地上に塗沫、37 $^{\circ}\text{C}$ にて24時間培養した。培養後、形成されたいくつかの集落より釣菌し取得菌株とした。それぞれ、5mlの2%大豆ペプトンにて37 $^{\circ}\text{C}$ にて3日間振盪培養した。培養液を13000rpm、5分間遠心分離し、上清を採取し、試料とした。

## 【0047】

培養上清を試料として - グルコシダーゼ阻害活性評価を行った。 - グルコシダーゼ阻害活性評価の方法は実施例1と同様である。

20

## 【0048】

得られた候補株をLB液体培地で培養し、得られた培養液を滅菌水で1,000倍に希釈したものを種菌液とした。大豆発酵食品は納豆と同様の工程で試作を行った。次に大豆発酵食品の試作方法を示す。

## 【0049】

丸大豆をよく洗い、大豆重量の3倍量の水に一晩浸漬した。吸水した大豆の水を切り、121 $^{\circ}\text{C}$ で50分間オートクレーブして煮豆とした。この煮豆がさめてから種菌液を50gあたり1mlの割合で接種し、40 $^{\circ}\text{C}$ で17時間発酵させた。その後4 $^{\circ}\text{C}$ で3日間保存して熟成を行い、大豆発酵食品とした。得られた大豆発酵物を凍結乾燥し試料とした。

30

## 【0050】

得られた試料を粉末化し、当該粉末50mgにエタノール:蒸留水(1:1、V/V)1mLを加え、超音波洗浄機で10分間抽出を行い、3000rpmで遠心し、上清を0.45 $\mu\text{m}$ ポアサイズのRCメンブレンフィルターで濾過し、濾液を測定試料溶液として、実施例1と同様に1-デオキシノジリマイシン含量を測定した。

## 【0051】

1-デオキシノジリマイシンの定量およびアザ糖の検出は、実施例1同様HILIC-タンデム質量分析法で行った。

## 【0052】

その結果、表2中に示す、1-デオキシノジリマイシンの含有が大豆発酵物中に確認された。また図2にクロマトグラムの例を示す。

40

## 【表 2】

## 1-デオキシノジリマイシン濃度

株名	AS275	AS367	AS384	AS385	DSM704
DNJ濃度	0.014	N.D.	0.018	0.02	0.012

(w/w%)

## 【0053】

これら候補株より、1-デオキシノジリマイシンの生産量が一番高かったAS385株候の

50

16sRNA遺伝子の塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号1となった。この株は*Bacillus amyloliquefaciens*に分類されると結論づけ、この株をバチルス・アミロリクエファシエンスAS385 (*Bacillus amyloliquefaciens* AS385) 株と命名し、デオキシノジリマイシンを含むアザ糖の生産能を有すると結論づけ独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託した(寄託番号: FERMAP-22049)。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明によりアザ糖を生産する微生物(Azasugar-Producible Bacteria)を提供することができる。

【0055】

本発明の微生物を利用することにより、アザ糖の発酵生産が可能になる。本発明は、発酵食品、健康食品の原材料、動物又は魚類用飼料および医薬品、化粧品等に広く利用できる。

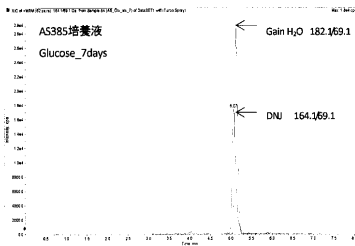
【受託番号】

【0056】

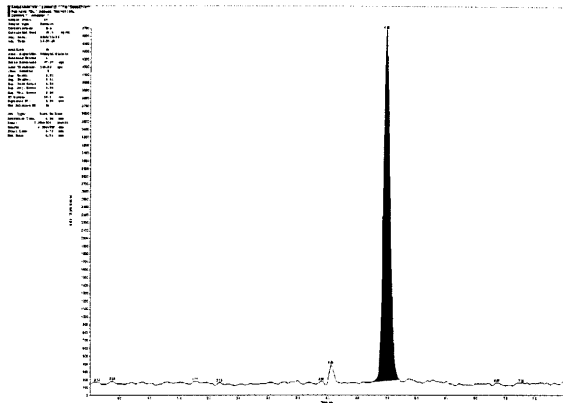
FERMAP-22049

FERMAP-22050

【図1】



【図2】





【配列表】

2012191899000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 D 211/46	
C 1 2 R 1/07 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1/125 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
	C 1 2 N 1/20	A
	C 1 2 R 1:07	
	C 1 2 R 1:125	
(74)代理人 100117086		
弁理士 山本 典弘		
(74)代理人 100124383		
弁理士 鈴木 一永		
(72)発明者 宮澤 陽夫		
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内		
(72)発明者 仲川 清隆		
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内		
(72)発明者 樋口 央紀		
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-40-307号 株式会社プロジェクト・エム内		
(72)発明者 池田 亮一		
長野県飯田市駄科1008番地 旭松食品株式会社内		
Fターム(参考) 4B018 LB04 LB10 MD27 MD79 ME14 MF13		
4B024 AA05 BA77 CA11 DA07		
4B065 AA15 AA19 AC14 AC20 CA41		
4C054 AA02 BB03 CC01 DD04 DD12 EE24 FF24		
4C086 AA02 BC21 MA01 MA04 MA52 ZC35		