

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6800950号
(P6800950)

(45) 発行日 令和2年12月16日 (2020. 12. 16)

(24) 登録日 令和2年11月27日 (2020. 11. 27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 1/04 (2006. 01)	C 1 2 P 1/04 Z N A Z
A 2 3 L 33/135 (2016. 01)	A 2 3 L 33/135
C 1 2 N 9/12 (2006. 01)	C 1 2 N 9/12
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 Z
C 1 2 N 15/11 (2006. 01)	C 1 2 N 15/11 Z
請求項の数 4 (全 13 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2018-504929 (P2018-504929)	(73) 特許権者	517428355
(86) (22) 出願日	平成29年2月17日 (2017. 2. 17)		カンウォン ナショナル ユニバーシティー
(65) 公表番号	特表2018-525988 (P2018-525988A)		ーインダストリー コーポレーション フ
(43) 公表日	平成30年9月13日 (2018. 9. 13)		ァウンダーション
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/001753		大韓民国 2 4 3 4 1 カンウォンード
(87) 国際公開番号	W02017/222141		チュンチョンーシ カンウォンテハクーギ
(87) 国際公開日	平成29年12月28日 (2017. 12. 28)		ル 1
審査請求日	平成30年1月30日 (2018. 1. 30)	(74) 代理人	100079049
(31) 優先権主張番号	10-2016-0079632		弁理士 中島 淳
(32) 優先日	平成28年6月24日 (2016. 6. 24)	(74) 代理人	100084995
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 加藤 和詳
		(72) 発明者	イ、ヘイク
			大韓民国 2 4 2 2 9 カンウォンード
			チュンチョンーシ セチョンマルーギル
			2 6 1 0 1 - 7 0 2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血栓溶解酵素の高生産のパチルス・サブチリス菌株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の 1 6 s R N A を含み、血栓溶解酵素を高生産するパチルス・サブチリス G D N 菌株 (B a c i l l u s s u b t i l i s G D N、受託番号 K C T C 1 3 0 2 0 B P) を用いて発酵させたおから発酵物であって、3 4 0 0 ~ 4 3 0 0 f i b r i n o l y t i c u n i t / g の血栓溶解酵素の活性を示すおから発酵物。

【請求項 2】

前記おから発酵物に含まれる前記血栓溶解酵素が納豆キナーゼである、請求項 1 に記載のおから発酵物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のおから発酵物を含む食品組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のおから発酵物を用いる段階を含む、血栓溶解酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、血栓溶解酵素を高生産するパチルス・サブチリス菌株に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

血栓溶解酵素である納豆キナーゼ (nattokinase) は、納豆の発酵に關与する菌であるバチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) 及びその類縁菌によって生産されるセリントリプトシン加水分解酵素 (serine protease) の一種である。納豆キナーゼは、大豆発酵食品である韓国の清麴醬、日本の納豆などで容易に確認でき、強力なフィブリン (fibrin) 分解活性を有するので、血栓の溶解に有効であると知られて、清麴醬と納豆との重要な機能性を示す成分の1つとして脚光を浴びている。

【0003】

前記バチルス・サブチリスは、大豆を培地で培養した場合以外にも、差はあるが、多様な物質を基質として培地中に血栓溶解酵素を蓄積する。したがって、バチルス・サブチリスを多様な培養方法で培養すれば、血栓溶解酵素の量産が可能なので、納豆キナーゼ製品を安価で供給するために努力している (特許文献1、特許文献2)。

10

【0004】

最近、食品として簡便に摂取することができる納豆の血栓溶解酵素の活性を高めるための多様な方法に関する研究が進められている。

【0005】

納豆の血栓溶解酵素の活性は、発酵菌の種類、大豆の品種、培養条件などによって影響を受けると知られている。しかし、納豆製造時に、血栓溶解酵素の活性が高く示される大豆の品種を使用することは可能であるが、大豆の品種を制限する方法で同じ品質の納豆を量産するという側面では制限性がある。一例として、おからは、血栓溶解酵素の活性を高める培地の1つとして知られているが、おからを大豆と共に混ぜて発酵させることは、納豆の食感や外形に大きな影響を及ぼすので、望ましい方法ではない。また、培養時間、温度及び湿度などの培養条件を変化させる方法は、血栓溶解酵素の活性を高めることができるが、これは、納豆の味、香、外観のような嗜好性に多大な影響を及ぼすので、望ましい方法とは言えない。

20

【0006】

一方、既存の宮城野菌または高橋菌などの市販の納豆菌は、同じ培養条件で互いに異なる血栓溶解酵素の活性を示すと知られている。また、従来、市販の納豆菌に比べて、血栓溶解酵素 (特許文献3) の活性が2倍増加した新規菌株に関する技術内容が開示されており、血栓溶解酵素を量産するためには、活性が高い菌株の開発が最も効率的な方法であるということが分かる。

30

【0007】

しかし、血栓溶解を目的として納豆を摂取する場合には、納豆菌によって納豆に生成及び蓄積されるK2などのビタミンによる副作用を考慮しなければならない。納豆に含有されたビタミンK2は、メナキノーン7 (menaquinone-7) で血液凝固を促進し、骨形成を促進する因子として知られている。一般的に、納豆には、600~900 µg / 100 g のビタミンK2が含有されて、ビタミンK2高含量食品に分類されている。参考までに、成人1人当たり1日勧奨摂取量は、日本の場合、男性は75 µgであり、女性は60~65 µgであり (Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2007, Vol. 53, 464-470)、米国の場合、男性は120 µg、女性は90 µg (J Am Diet Assoc., 1996, vol. 96, 149-154) である。したがって、40~50 g の内容量で包装されて販売される通常の納豆1ケース (case) を摂食する場合、算術的に300~450 µg に相当する相当量のビタミンK2が同伴摂取される。また、血栓形成抑制剤の1つであるワーファリンを服用する患者の場合に、ビタミンK2がワーファリンの作用を抑制するので、納豆の摂取を制限している。前記のように、納豆に含まれたビタミンK2の問題点を解消するために、従来、エタノールなどの有機溶媒を用いて納豆に含まれたビタミンK2を除去する精製段階を導入して納豆を生産しているが (特許文献2、特許文献1)、前記のような精製段階は、工程が複雑であって、製造コストが増加するという問題がある。

40

50

【0008】

前記のように、納豆の摂取は、食品本来の味と香とを楽しみながらも、精製した酵素よりは十分な量の血栓溶解酵素を安価で提供されうるという長所があるが、ビタミンK2の含量が問題点として台頭しつつあり、従来に知られた納豆菌などは、おからを培地として活用する場合、嗜好性が落ちるといった短所があって、このような問題点を解決することができる方法についての研究が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2001-299277（公開日：2001.10.30）

10

【特許文献2】特開2006-325538（公開日：2006.12.07）

【特許文献3】日本登録特許3564121（公開日：2004.08.12）

【特許文献4】韓国公開特許10-2014-0123847（公開日：2014.10.23）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の発明者らは、血栓溶解酵素の活性が高い納豆の製造を目標として鋭意研究した結果、従来に開発された納豆菌株よりも血栓溶解酵素の高生産能を有する新たな菌株であるバチルス・サブチリスGDN菌株（*Bacillus subtilis* GDN）の分離に成功し、当該菌株をおからで培養したおから発酵物の場合、血栓溶解酵素の活性が大豆発酵物に比べて、さらに増加するという事実を確認して、固体培養を通じて、血栓溶解酵素を効率的に生産可能であるということが分かった。

20

【0011】

これにより、本発明では、血栓溶解酵素である納豆キナーゼを高生産するバチルス・サブチリスGDN菌株に対する技術内容を提供しようとする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記のような技術的課題を果たすために、本発明は、血栓溶解酵素を高生産するバチルス・サブチリスGDN菌株（*Bacillus subtilis* GDN、受託番号KC TC13020BP）を提供する。

30

【0013】

また、前記菌株が、配列番号1の16sRNAを含むことを特徴とする。

【0014】

また、本発明は、前記菌株を用いて発酵させた培養物を提供する。

【0015】

また、前記培養物は、納豆であり、前記培養物に含まれた血栓溶解酵素が、納豆キナーゼであり得る。

【0016】

また、前記培養物は、おから発酵物であり、前記おから発酵物は、3400～4300 fibrinolytic unit/gの血栓溶解酵素の活性を示すことを特徴とする。

40

【0017】

また、本発明は、前記培養物を含む食品組成物を提供する。

【0018】

また、本発明は、前記菌株を用いて発酵させる段階を含む血栓溶解酵素の製造方法を提供する。

【0019】

また、前記発酵が、納豆の発酵であることを特徴とし、前記納豆の発酵によって納豆キナーゼが製造されることを特徴とする。

【0020】

50

また、前記発酵が、生おからの発酵であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0021】

本発明によるバチルス・サブチリスGDN菌株は、宮城野菌のような従来の納豆菌に比べて、血栓溶解酵素の生産能が顕著に高く、本発明のバチルス・サブチリスGDN菌株で製造した納豆を摂取する場合、従来の納豆菌によって製造した納豆を摂取する場合に比べて、納豆の摂取量を5分の1程度に減らしても、血栓溶解酵素の活性は同様に保持し、ビタミンK2の摂取量は、1日勧奨量の限界値内に調節することができて、前記バチルス・サブチリスGDN菌株は、血栓溶解を目的とした多様な食品の製造のために効果的に活用が可能である。

10

【0022】

また、本発明によるバチルス・サブチリスGDN菌株を培養したおから発酵物の場合、大豆発酵物に比べて、血栓溶解酵素の活性が1.5倍以上高い特性を示して、追加的な処理なしに固体培養を通じて効率的に血栓溶解酵素を生産し、培地から簡単な操作を通じて血栓溶解酵素を容易に精製することができて、血栓溶解酵素の生産コストを画期的に節減することができるだけでなく、産業廃棄物であるおからをリサイクルできるという点で環境に優しい。

【0023】

また、前記菌株は、大豆類または生おからなどを発酵時に、血糖降下に効果がある α -グルコシダーゼ阻害剤を多量生成して、成人病の予防にも効果的な食品製造が可能であるだけでなく、味、粘質物の強度、外形などの官能特性に優れた納豆を製造することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】バチルス・サブチリスGDN菌株の電子顕微鏡写真である。

【図2】バチルス・サブチリスGDN菌株の分類学上の位置を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0026】

本発明は、血栓溶解酵素を高生産するバチルス・サブチリスGDN菌株(Bacillus subtilis GDN、受託番号KCTC13020BP)を提供する。

30

【0027】

前記菌株は、稲わら及び乾草から耐熱性胞子を形成する菌を分離し、大豆類または生おからの発酵時に、高含有の血栓溶解酵素を生産する菌株を選別することで得られる。選別された前記菌株は、血栓溶解酵素、特に、納豆キナーゼを高含有で生産し、納豆の発酵において、一般菌株を使用した場合に比べて、5倍以上に高い血栓溶解酵素の活性を有する納豆を生産することができる。

【0028】

これにより、本発明のバチルス・サブチリスGDN菌株で製造した納豆を摂取する場合、従来の納豆菌によって製造した納豆を摂取する場合に比べて、納豆の摂取量を5分の1程度に減らしても、血栓溶解酵素の活性は同様に保持し、ビタミンK2の摂取量は、1日勧奨量の限界値内に調節することができて、前記バチルス・サブチリスGDN菌株は、血栓溶解を目的とした多様な食品の製造のために活用が可能である。

40

【0029】

また、本発明によるバチルス・サブチリスGDN菌株を培養したおから発酵物の場合、大豆発酵物に比べて、血栓溶解酵素の活性が1.5倍以上高い特性を示して、追加的な処理なしに固体培養を通じて効率的に血栓溶解酵素を生産し、培地から簡単な操作を通じて血栓溶解酵素を容易に精製することができて、血栓溶解酵素の生産コストを画期的に節減することができるだけでなく、産業廃棄物であるおからをリサイクルできるという点で環

50

境に優しい。

【0030】

前記菌株は、大豆類または生おからなどを発酵時に、血糖降下に効果がある α -グルコシダーゼ阻害剤を多量生成して、成人病の予防にも効果的な食品製造が可能であるだけでなく、味、粘質物の強度、外形などの官能特性に優れた納豆を製造することができる。

【0031】

前記菌株は、下記の配列番号1の16sRNAを有することを特徴とする。

【0032】

配列番号1：

```
G T G A C A G G T G G T G C A T G G T T G T C G T C A G C T C G T G T C G T G A 10
G A T G T T G G G T T A A G T C C C G C A A C G A G C G C A A C C C T T G A T C
T T A G T T G C C A G C A T T C A G T T G G G C A C T C T A A G G T G A C T G C
C G G T G A C A A A C C G G A G G A A G G T G G G G A T G A C G T C A A A T C A
T C A T G C C C C T T A T G A C C T G G G C T A C A C A C G T G C T A C A A T G
G A C A G A A C A A A G G G C A G C G A A A C C G C G A G G T T A A G C C A A T
C C C A C A A A T C T G T T C T C A G T T C G G A T C G C A G T C T G C A A C T
C G A C T G C G T G A A G C T G G A A T C G C T A G T A A T C G C G G A T C A G
C A T G C C G C G G T G A A T A C G T T C C C G G G C C T T G T A C A C A C C G
C C C G T C A C A C C A C G A G A G T T T G T A A C A C C C G A A G T C G G T G 20
A G G T A A C C T T T T A G G A G C C A G C C G C C G A A G G T G G G A C A G A
T G A T T G G G G T G A A G T
```

【0033】

また、本発明は、前記バチルス・サブチリスGDN菌株を用いて発酵させた培養物を提供する。

【0034】

望ましくは、前記培養物は、生おからに前記菌株を接種して発酵させたおから発酵物であり、前記おから発酵物は、 $3400 \sim 4300 \text{ fibrinolytic unit/g}$ の優れた血栓溶解酵素の活性を示すことができる。

【0035】

また、前記培養物は、大豆類に前記菌株を接種して発酵させた大豆類の培養物であり、望ましくは、納豆であり得る。前記菌株を接種して発酵させた納豆は、 $2300 \sim 2500 \text{ fibrinolytic unit/g}$ の血栓溶解酵素の活性を示して、宮城野菌のような従来の納豆菌を接種して発酵させた納豆($400 \sim 500 \text{ fibrinolytic unit/g}$)に比べて、血栓溶解酵素の活性が5倍以上優れている。

【0036】

また、本発明は、前記培養物を含む食品組成物を提供する。

【0037】

また、本発明は、前記菌株を用いて発酵させる段階を含む血栓溶解酵素の製造方法を提供する。前記血栓溶解酵素の製造方法では、生おからを発酵させておから発酵物を製造し、各種の大豆類を発酵させて納豆などの大豆発酵物を製造し、前記大豆発酵物は、血栓溶解酵素として納豆キナーゼを含みうる。

【0038】

また、前記おから発酵物は、優れた血栓溶解酵素の活性を示し、前記血栓溶解酵素の製造方法は、産業廃棄物であるおからを用いて追加的な処理なしに固体培養を通じて効率的に血栓溶解酵素を生産し、培地から簡単な操作を通じて血栓溶解酵素を容易に精製することができて、血栓溶解を目的とする多様な食品製造のために活用可能である。

【0039】

以下、本発明を実施例を挙げてより詳しく説明する。

【0040】

提示された実施例は、本発明の具体的な例示であり、本発明の範囲を制限するためのもの

ではない。

【実施例】

【0041】

1. 菌株の探索

【0042】

韓国、中国、日本、米国など世界各地から収集した約500余点の稲わら及び乾草を試料として微生物を分離した。各試料を滅菌食塩水に少量加えて懸濁させた後、80℃恒温水槽で30分間熱処理して得た孢子液を2%寒天を含有するLB平板培地（1%トリプトン、0.2%砂糖、0.5%酵母抽出物及び0.5%NaCl、pH7.0）に塗抹し、37℃の培養器で1日間培養した後、菌集落を形成する菌体を分離した。

10

【0043】

血栓溶解酵素の生産量を調査するために、分離された菌株を5mlの5%大豆粉を懸濁した培地に接種し、37℃で24時間振盪培養した。培養液を遠心分離して、上澄み液から血栓溶解酵素の活性をフィブリン平板法（fibrin plate method）で測定した。

【0044】

前記フィブリン平板法は、下記に示した方法で行った。

【0045】

まず、1.2%のフィブリノーゲン溶液（fibrinogen solution）2.5ml、20unit/mlのトロンビン（thrombin）500μl、1%のアガロース溶液（agarose solution）7mlが溶解された0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.5）をペトリディッシュ（petri dish）に入れ、均一に開かれた状態で固化させてフィブリン平板（fibrin plate）を製造した。パストールピペットを用いてフィブリン平板に一定間隔で空隙を形成させた。それぞれの菌株を培養して作った試料2μlを空隙に注入して37℃で培養し、形成されたクリアゾーン（clear zone）の面積から血栓溶解酵素の活性を測定した。

20

【0046】

前記の過程を通じて、活性が強い順に80種の菌株を分離して、血栓溶解酵素生産菌で1次選抜した後、簡易同定法（The prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria, vol. 2, p. 1668, 1992, Springer-Verlag）で血栓溶解酵素の活性が高い5種の菌株を2次選抜した。分離した5種の菌株は、16sRNA塩基配列分析を通じてバチルス・サブチリスに同定になり、配列番号1の塩基配列を有するという事実を確認した。血栓溶解酵素の活性が最も高い1種の菌株をバチルス・サブチリスGDN（Bacillus subtilis GDN）と名付け、韓国生命工学研究院生物資源センター（KCTC）に2016年5月3日付で寄託した（寄託番号：KCTC13020BP）。

30

【0047】

配列番号1：

GTGACAGGTTGGTGCATGGTTGTCTCGTCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGGATCAGCATGCGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACACCGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGT

40

50

【0048】

また、分離した菌株を顕微鏡で観察し（図1参照）、形態学的特性を分析して、下記の表1に示した。

【0049】

【表1】

特性	バチルス・サブチリスGDN
グラム染色	陽性
形態及びサイズ	棒状、 $0.6 \sim 0.7 \times 1.4 \sim 1.6 \mu\text{m}$
孢子及び位置	形成、中央
成長温度	$20 \sim 40^\circ\text{C}$
7%NaClでの成長	陽性
好氣的条件での成長	陽性
嫌氣的条件での成長	陰性
フォーゲスプロスカウエル試験	陽性
硝酸塩還元	陽性
インドール形成	陰性
カタラーゼ	陽性
澱粉分解	陽性
カゼイン分解	陽性

10

20

表1に示すように、分離した菌株は、グラム陽性であり、細胞のサイズは、ほぼ $0.6 \sim 0.7 \times 1.4 \sim 1.6 \mu\text{m}$ であることを確認することができ、前記結果を総合して、バチルス・サブチリスGDN菌株の分類学上の位置を図2に示した。

【0050】

また、分離した菌株の生化学的特性の分析結果を下記の表2に示した。

【0051】

【表 2】

Test	Result	Strip	Result
control	-	esculin ferric citrate	+
glycerol	+	salicin	-
erythritol	-	D-cellobiose	-
D-arabinose	-	D-maltose	+
L-arabinose	+	D-lactose	-
D-ribose	+	D-melibiose	-
D-xylose	-	D-saccharose	+
L-xylose	-	D-trehalose	+
D-adonitol	-	inulin	+
methyl-β D-xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	-	D-raffinose	-
D-glucose	+	amidon(starch)	-
D-fructose	+	glycogen	-
D-mannose	+	xylitol	-
L-sorbose	-	gentiobiose	-
L-rhamnose	-	D-turanose	+
dulcitol	-	D-lyxose	-
inositol	+	D-tagatose	-
D-mannitol	+	D-fucose	-
D-sorbitol	+	L-fucose	-
methyl-α D-mannopyranoside	-	D-arabitol	-
methyl-α D-glucopyranoside	-	L-arabitol	-
N-acetylglucosamine	-	potassium gluconate	-
amygdalin	-	potassium 2-ketogluconate	-

【0052】

2. フィブリン溶液を用いた血栓溶解酵素の活性測定

希釈した試料100μlと0.1M Tris-HCl緩衝液200μl(10mM CaCl₂含む、pH7.8)、0.4%フィブリン溶液(pH7.0)200μlとを混合した後、37℃で30分間反応させた。反応終了後、反応停止液(0.22M酢酸ナトリウム、0.33M酢酸含有0.11Mトリクロロ酢酸)500μlを添加し、遠心分離して上澄み液を収得した。該収得した上澄み液に275nm波長の光を照射して吸光度を測定した(但し、血栓溶解酵素の活性1unitは、37℃で反応して1分間作り出す1μgのチロシン(tyrosine)の量と同じである)。

【0053】

3. 大豆発酵物の製造及び血栓溶解酵素の活性分析

洗浄した大豆を室温で一晩浸漬した後、121℃で40分間高圧蒸気滅菌(autoclave)して、煮た大豆を作った。煮た大豆50g当たりバチルス・サブチリスGDN菌株胞子液(10⁵胞子/ml)1mlの比率で煮た大豆が冷める前に接種して、発泡スチレン容器に入れ、被膜を行って、37℃で18時間培養した。その後、4℃で24時間熟成して、大豆発酵物を製造した。対照群としては、市販の宮城野菌を使用した。

【0054】

製造した大豆発酵物の血栓溶解酵素の活性を測定して、下記の表3にその結果を示した。

【0055】

【表 3】

菌株	fibrinolytic unit/g
対照群	449±12
パチルス・サブチリスGDN	2419±54

表 3 に示すように、大豆発酵物で血栓溶解酵素の活性の測定結果、実施例の GDN 菌で製造した大豆発酵物の血栓溶解酵素の活性は、対照群である宮城野菌に比べて、約 5 倍の酵素活性が増加したことを確認することができた。

【0056】

10

すなわち、実施例の GDN 菌は、従来の納豆菌に比べて、血栓溶解酵素の生産能が顕著に高いので、当該菌で製造した納豆は、一般的な納豆の摂取量の 5 分の 1 程度に減らして摂取しても、従来の納豆 1 ケースから期待することができる血栓溶解酵素を供給されうということを確認することができた。

【0057】

参考までに、ビタミン K₂ の 1 日勧奨量は、日本の場合、男性が 75 μg であり、女性が 60～65 μg であるが、従来の納豆菌で製造した納豆 1 ケースを摂取する場合、300～450 μg のビタミン K₂ が供給されるので、1 日勧奨量を約 5 倍超過する。しかし、実施例の GDN 菌株で製造した納豆は、前記従来の納豆の 1/5 程度の量を摂取しても、血栓溶解酵素の活性はそのまま保持し、ビタミン K の量を 1 日勧奨量の限界値内に調節することができるとい事実を確認することができた。

20

【0058】

3. 官能評価

前記の方法で得られた大豆発酵物について官能評価を行った。官能評価は、5 段階評価法で行い、5 点は非常に良好、4 点は良好、3 点は普通、2 点は不良、1 点は非常に不良として、下記の 5 項目について評価し、その結果を下記の表 4 に示した。

【0059】

【表 4】

品質特性	平均	パネル				
		I	II	III	IV	V
香（不快臭有無）	3.6	4	4	3	3	4
味（苦味、滋味）	4.4	4	5	4	4	5
粘質物強度（粘質物の量及び粘性）	4.8	5	5	4	5	5
食感（固い）	3.8	4	4	4	3	4
外形（菌の被覆状態、色）	4.4	5	4	5	4	4

30

表 4 に示すように、官能評価を行った結果、GDN 菌株で製造した大豆発酵物の官能評価は、3.6～4.8 点の高い点数が出て、納豆のような大豆発酵物で開発しても、立派な製品になりうということを確認することができた。

【0060】

40

4. おから発酵物の製造

当日製造された生おから（3 種）をそのまま 121℃で 40 分間高圧蒸気滅菌し、該滅菌したおから 50 g 当たり 10⁵ 孢子/ml の孢子液を 1 ml の比率で冷める前に接種して、37℃で 24 時間培養した。

【0061】

製造したおから発酵物（3 種）の血栓溶解酵素の活性を測定して、下記の表 5 にその結果を示した。

【0062】

【表 5】

培地	Fibrinolytic unit/g
おから-1	3541±104
おから-2	3458±111
おから-3	4104±109

表 3 に示すように、互いに異なる 3 つの工場で製造したおからを発酵して生成されたおから発酵物の血栓溶解酵素の活性を測定した結果、おから発酵物が大豆発酵物よりも酵素生産量がほぼ 1.5 倍高いと確認された。これを通じて、産業廃棄物であるおからを用いて追加的な処理なしに固体培養を通じて効率的に血栓溶解酵素の生産に用いられうるということを確認することができた。

10

【0063】

5. おから発酵物で血栓溶解酵素の精製

おからを 30 cm×24 cm×6 cm サイズのステンレストレー (stainless tray) に 500 g ずつ入れ、121℃で 40 分間高圧蒸気滅菌した。該滅菌したおから 1 kg 当たり 10^5 孢子/ml の孢子液 20 ml を冷める前に加えて接種し、ビニール被膜を行って、37℃で 24 時間培養して、おから発酵物を製造した。該製造したおから発酵物に 3 倍量の水を加え、よく攪拌して血栓溶解酵素を抽出した。これに CaCl_2 の最終濃度が 0.1 M になるように CaCl_2 粉末を加え、30 分間静置した後、遠心分離して沈殿を除去し、上澄み液であるおから抽出物を製造した。

20

【0064】

また、上澄み液に 2 倍量のエタノールを加え、遠心分離し、沈殿を凍結乾燥して、血栓溶解酵素粉末を製造し、血栓溶解酵素の活性を測定して、その結果を収率と共に下記の表 6 に示した。

【0065】

【表 6】

処理段階	総活性 (Fibrinolytic unit)	収率 (%)
カルシウム処理した おから抽出物	3,816,000	100
エタノール沈殿	3,287,000	86

30

表 6 に示すように、カルシウム (CaCl_2) 処理したおから抽出物の血清溶解酵素の活性が非常に高いと確認された。これを通じて、GDN 菌株のおから発酵物に重量に比べて、3 倍量の水を加えて均質化し、そこに最終濃度が 0.1 M になるように CaCl_2 粉末を加え、30 分間静置すれば、おからから由来した固形分が凝集して容易に沈殿で除去され、血栓溶解酵素は、清い上澄み液に残るので、簡単な操作によっても、血栓溶解酵素の精製が高収率でなされるという事実を確認することができた。

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明によるバチルス・サブチリス GDN 菌株は、血栓溶解酵素の生産能が顕著に高く、血栓溶解を目的とした多様な食品製造に活用されうる。

40

【受託番号】

【0067】

寄託機関名：韓国生命工学研究院韓国微生物資源センター (KCTC)

受託番号：KCTC13020BP

受託日：20160503

【0068】

(受託証)

출원인 : 강원대학교 산학협력단	국제출원번호 : PCT/KR2017/001793
파일 참조번호 : 17-KAN-000000-3	

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

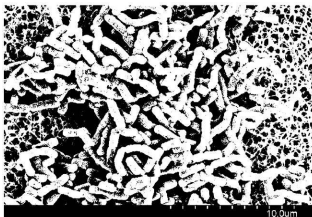
(특허법 제13조의2)

A. 타기의 표시사항은 발명의 설명 _____ 쪽, _____ 장에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징 _____ 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 한국생명공학연구원 한국생물자원센터(KRIC)	
기탁기관의 주소(수령번호 및 국적 포함) 대한민국 56212 전라북도 정읍시 칠성로 191 한국생명공학연구원(KRIBRI)	
기탁일자 2016년 5월 3일	기탁번호 KRIC 1902082
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) _____ 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
D. 표시사항에 자명하고 있는 것(표시사항이 모든 것(표시사항을 위한 사항이 아닌 경우) _____	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출) _____	
타기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일련적 성질을 특정할 것) _____	

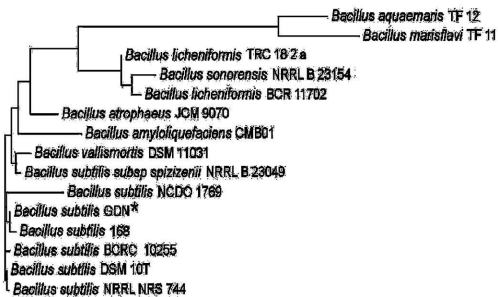
수령신청 사용권 ☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	국제사무국 사용권 ☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:
담당관	담당관

Form PCT/RL/134 (July 1996; revised January 2004)

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

0006800950000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01) C 1 2 N 1/20 A

(72)発明者 キム、 ヒウン
大韓民国 2 6 4 8 5 カンウォンード ウォンジューシ ナムウォンロー 4 9 6 1 0 3 - 5
0 2

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第01/036591 (WO, A1)
特開平10-265396 (JP, A)
特開平06-261744 (JP, A)
特開2004-222516 (JP, A)
韓国公開特許第10-2007-0032445 (KR, A)
特開2001-238667 (JP, A)
日本食品科学工学会誌, 1998, Vol.45, No.2, p.100-107
International Journal of Biology, 2010, Vol.2, No.2, p.120-125

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 P 1/04
A 2 3 L 33/135
C 1 2 N 1/20
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed