

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年5月2日(02.05.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/062054 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/00 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/077627
- (22) 国際出願日: 2012年10月25日(25.10.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-238013 2011年10月28日(28.10.2011) JP
- (71) 出願人: サンスター技研株式会社(SUNSTAR ENGINEERING INC.) [JP/JP]; 〒5691134 大阪府高槻市朝日町3-1 Osaka (JP). サンスター・エンジニアリング・プライベート・リミテッド(SUNSTAR ENGINEERING PTE. LTD.) [SG/SG]; 117684 ザ アルファ シンガポール サイエンス パーク 1 I、 #04-27/28 サイエンス パーク ロード 10 Singapore (SG).
- (72) 発明者: 宮尾 悠(MIYAO, Haruka); 〒5691134 大阪府高槻市朝日町3-1 サンスター技研株式会社内 Osaka (JP). 安島 譲(AJIMA, Yuzuru); 〒

5691134 大阪府高槻市朝日町3-1 サンスター技研株式会社内 Osaka (JP). 岡 徹(OKA, Toru); 〒5691134 大阪府高槻市朝日町3-1 サンスター技研株式会社内 Osaka (JP). リャオ, デニー(LIAUW, Denny); 117684 ザ アルファ シンガポール サイエンス パーク 1 I、 #04-27/28 サイエンス パーク ロード 10 サンスター・エンジニアリング・プライベート・リミテッド内 Singapore (SG).

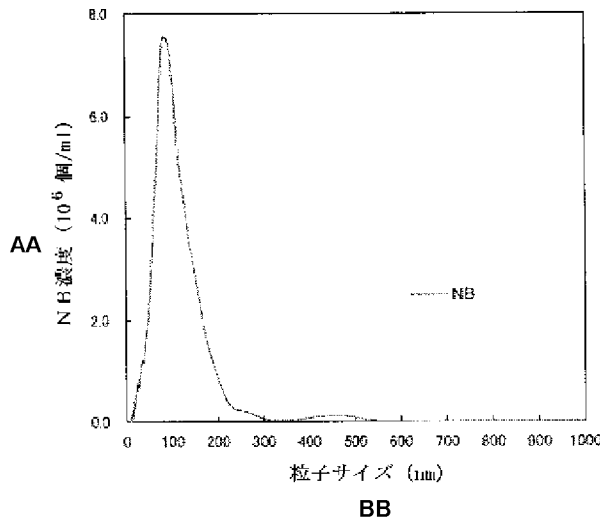
(74) 代理人: 伊藤 茂, 外(ITO, Shigeru et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目21-18 小澤ビルディング9F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 組成物およびその製造方法



AA NB concentration (10^6 per ml)
BB Particle size (nm)

(57) Abstract: [Problem] To provide a novel and stable protein composition, and a method for stabilizing the protein composition. [Solution] A composition that contains protein and water containing ultra-fine air bubbles having a modal particle diameter of 500nm or less, and a method for stabilizing a protein composition that involves mixing protein and water containing ultra-fine air bubbles having a modal particle diameter of 500nm or less.

(57) 要約: 【課題】 新規な安定したタンパク質の組成物、およびタンパク質組成物の安定化方法を提供すること。 【解決手段】 最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を含む組成物、および最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法。

WO 2013/062054 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：組成物およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡（ナノバブル、NBとも呼ぶ）を含む水とタンパク質を含む組成物および最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法に関する。

背景技術

[0002] 酵素、抗体、ペプチド等のタンパク質は、洗剤、工業、化粧品、食品加工、医薬品、診断・検査、バイオセンサーへ広く利用されている。タンパク質の水溶性製剤／形態は、粉末に比べ取り扱いに優れる等の点から酵素を大量に利用する業界で汎用されている。しかし、一般に水溶液中の酵素は粉末体と比べ著しく不安定で保存性が悪く、長期間生理活性を維持できないという問題がある。従来よりタンパク質の生理活性を低下させずに供給する方法として、凍結乾燥法などを利用して熱をかけずにタンパク質を精製、安定化させ製剤を供給する方法が知られていた。またタンパク質を水溶液中で安定化させる方法としては、ウリカーゼ、パーオキシダーゼの安定化剤としてグリセリン等の多価アルコールを含有させる方法（特許文献1：特開平6-70798）、コレステロールオキシダーゼを含む水溶液に、牛血清アルブミンやグルコース等の糖類あるいはリジン等のアミノ酸を添加する技術（特許文献2：特開平8-187095）、タンパク質は限定されないが、水溶液中に安定化剤としてグアニジン塩酸塩、尿素、ピリジン等の有機化合物を添加する技術（特許文献3：特開2011-67202）等が知られていた。

[0003] しかしながら、これらの公知技術にはいくつか課題があった。例えば、凍結乾燥法では脱水により変性するタンパク質には使用できないこと、および乾燥工程中に吸湿や酸化による変質が起こり易い等の課題があり、さらに酵素水溶液をその都度調整する必要があるため煩雑であった。タンパク質の水

溶液中での安定化技術では、ウリカーゼ、パーオキシダーゼの安定化に多価アルコールを用いる方法、およびコレステロールオキシダーゼ水溶液の安定化に牛血清アルブミンや糖類やアミノ酸を用いる方法があるが、いずれも特定のタンパク質を安定化させる方法であり汎用性に欠けるという課題があった。また、タンパク質水溶液の安定化にグアニジン塩酸塩などの有機化合物を用いる方法は、汎用性はあるが、酵素と他の混合製剤とした場合、有機化合物と反応するものが含まれると利用できないとの課題があり、また添加濃度も適正な濃度に調整しなければならず煩雑であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平6－70798

特許文献2：特開平8－187095

特許文献3：特開2011－67202

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は上記の課題を有しない、新規な安定したタンパク質の組成物、およびタンパク質の安定化方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題に因應べく、鋭意研究を重ねた結果、超微細気泡を含有する水とタンパク質を混合することにより、安定なタンパク質組成物が得られることを見だし、本発明をなすに至った。

本発明は、最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を含む組成物を提供する。また本発明は、超微細気泡の最頻粒子濃度が1mlあたり100万個以上である上記の超微細気泡を含む水とタンパク質を含む上記の組成物を提供する。さらには、本発明は粒子径1000nm以下の気泡の粒子濃度が1mlあたり5000万個以上である超微細気泡を含む水とタンパク質を含む上記の組成物を提供する。

[0007] さらに本発明は、最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法を提供する。また本発明は、最頻粒子径が500nm以下であり、超微細気泡の最頻粒子濃度が1mlあたり100万個以上である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法を提供する。さらには、本発明は最頻粒子径が500nm以下であり、粒子径1000nm以下の気泡の粒子濃度が1mlあたり5000万個以上であり、任意に超微細気泡の最頻粒子濃度が1mlあたり100万個以上であることができる超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法を提供する。

[0008] 本発明において前記超微細気泡内部は、これらに限定されるものではないが、空気、酸素、水素、窒素、炭酸ガス、アルゴン、ネオン、キセノン、フッ素化気体および不活性化ガスから選択される1種または2種以上の気体であることができる。

[0009] 本発明のタンパク質組成物において使用できるタンパク質としては、特に限定されないが、酵素、動物由来タンパク質、魚由来タンパク質、植物由来タンパク質、組み換えタンパク質、酵素、抗体、ペプチド等が挙げられ、たとえば以下のようなものを使用できる。

酵素類：酵素類としては、酸化還元酵素（コレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ等）；転移酵素（アシルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、トランスグルコシダーゼ等）；加水分解酵素（プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、等）；付加脱離酵素（ペクチンリアーゼ等）；異性化酵素（グルコースイソメラーゼ等）；合成酵素（脂肪酸シンターゼ、リン酸シンターゼ、クエン酸シンターゼ、ヒアルロン酸リアーゼ、炭酸デヒドラーゼ等）；が使用できる。

組み換えタンパク質：組み換えタンパク質としては、タンパク製剤（インタ

ーフエロン α 、成長ホルモン、インスリン、血清アルブミン)、ワクチン等が使用できる。

抗体：抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が使用できる。

ペプチド：ペプチドとしては、特にアミノ酸を限定するものではなく、ジペプチド、トリペプチド、ポリペプチド等が使用できる。

[0010] 好ましい態様においては、タンパク質は水溶性タンパク質であり、より好ましくはタンパク質は酵素であり、さらに好ましくはタンパク質は水溶性の酵素であり、最も好ましくはペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、およびリパーゼから選択される少なくとも1つであることができる。

[0011] 使用されるタンパク質の量は、タンパク質の種類、用途などにより変化する。好ましい量は実験により適宜決定することができるが、一般的には1 ng/mlから300 mg/ml、好ましくは10 ng/mlから100 mg/ml、さらに好ましくは30 ng/mlから50 mg/mlの範囲で使用するすることができる。

[0012] 本発明において使用される水は、これらに限定されるものではないが、水道水、精製水、イオン交換水、純水、超純水、脱イオン水、蒸留水、緩衝液、上水、天然水、ろ過水、高純水、飲料水および電解水から選択されることができる。

また水溶性溶媒、たとえばアルコール、グリコール、グリセリン、エーテル、ケトン、エステルなどを加えることもできる。

発明の効果

[0013] 本発明のタンパク質を含む組成物は安定性に優れ、特にpHの変化に対して安定であるpH安定性、温度の影響を低減する温度安定性、および光による影響を低減する光安定性に優れるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]超微細気泡を含む水中の気泡の粒径分布の測定結果を示す図である。

[図2]日本薬局方精製水中の気泡の粒径分布の測定結果を示す図である。

[図3]カタラーゼ安定性測定試験の結果を示す図である。

[図4]リパーゼ安定性測定試験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0015] 本発明において使用される超微細気泡は、最頻粒子径が500nm以下、好ましくは最頻粒子径が300nm以下、さらに好ましくは最頻粒子径が150nm以下であり、最も好ましくは最頻粒子径が100nm以下であり、最頻粒子径の気泡の粒子濃度は1ml当たり好ましくは100万個以上、さらに好ましくは300万個以上、さらに好ましくは500万個以上、さらに好ましくは700万個以上、さらに好ましくは1000万個以上、さらに好ましくは5000万個以上、さらに好ましくは9000万個以上、さらに好ましくは1億個以上、さらに好ましくは5億個以上、最も好ましくは9億個以上である。
- [0016] 本発明においては、総粒子濃度は1mlあたり好ましくは5000万個以上、さらに好ましくは7000万個以上、さらに好ましくは8000万個以上、さらに好ましくは1億個以上、さらに好ましくは6億個以上、さらに好ましくは10億個以上、さらに好ましくは30億個以上、さらに好ましくは50億個以上、さらに好ましくは70億個以上、さらに好ましくは100億個以上、さらに好ましくは200億個以上、さらに好ましくは500億個以上、最も好ましくは700億個以上であることができる。さらに好ましい態様では、1000nm以上の気泡はほとんど存在しない。
- [0017] 本発明で使用される超微細気泡の粒径は非常に小さいために通常の粒度分布測定装置では正確に測定することができない。そのため本明細書中では、ナノ粒子解析システム ナノサイトシリーズ (Nano Sight 社製) により測定した数値を利用している。ナノ粒子解析システム ナノサイトシリーズ (Nano Sight 社製) は、ナノ粒子のブラウン運動の速度を計測し、その速度から粒子径を算出する。最頻粒子径は、存在する粒子の粒子径分布から確認でき、個数が極大値となる時の粒子径をいう。

なお、本発明における超微細気泡の粒子径および個数は、組成物配合後、24時間の時点で測定した数値をいう。

[0018] なお、本願発明の組成物は、これらに限定されるものではないが、防腐剤および安定剤などの添加剤を含むことができる。防腐剤としては、これらに限定されるものではないが、たとえばポリヘキサメチレンビグアニドおよびパラベンなどが使用できる。また安定剤としては、これらに限定されるものではないが、たとえば糖類、抗生物質、アミノ配糖体、有機酸、補酵素、およびアミノ酸などが使用できる。また本願発明の組成物は界面活性剤を含むことができる。界面活性剤は水不溶性物質または水難溶性物質の添加剤を含む場合のみならず、水溶性の添加物を使用する場合でも、使用条件などに応じて適宜添加することができる。

[0019] 超微細気泡表面のゼータ電位は、気泡の安定性に影響を与える。本発明で使用される超微細気泡表面は帯電し、そのゼータ電位の絶対値は5 mV以上、好ましくは7 mV以上、より好ましくは10 mV以上、さらに好ましくは20 mV以上、さらに好ましくは25 mV以上、最も好ましくは30 mV以上である。また、ゼータ電位の絶対値は、溶液の粘性率／溶液の誘電率に比例するため、低温条件下で超微細気泡を含む水とタンパク質を混合するほど安定性は高くなると考えられている。

[0020] 本発明で使用される超微細気泡は、任意の公知の手段、たとえばスタティックミキサー式、ベンチュリ式、キャビテーション式、蒸気凝集式、超音波方式、旋回流方式、加圧溶解方式、微細孔方式で発生させることができる。好ましい気泡の発生方法は気液混合せん断方式である。

[0021] 気液混合せん断方式による超微細気泡の発生に有用な装置としては、たとえば特許第4118939号に開示されている装置があげられる。この装置においては、流体旋回室内に導入された気液混合流体の多くは、前述の従来装置におけるように単純に吐出口に向うのとは異なり、一旦、吐出口のある方向とは反対方向に旋回流として進む。そして、その旋回流は、第1端壁部材によって反転させられ該第1端壁部材から第2端壁部材に向けて進むこと

になるが、このときの旋回回転半径は第1端壁部材に向かうときに比べて小さくなるので、その流速は高速となり、従って、該液体内に含まれる気体への剪断力が大きくなり、その微細化が促進される。

[0022] タンパク質の水溶液を超微細気泡発生装置により処理し、水溶液中に超微細気泡を発生させることにより、タンパク質が水中に溶解している本発明の組成物を製造することができる。また、超微細気泡を含む水に、タンパク質を溶解することによっても本発明の組成物を製造することができる。前記の超微細気泡を含む水は、先に述べた通りの最頻粒子径および個数を有することができる。

[0023] 本明細書における本発明の説明および実施例の記述は本発明の様々な例示的な実施態様の詳細な説明のためにのみあり、当業者は本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された実施態様に様々な改良および変更を行うことができる。したがって、本明細書の記載は本発明の範囲を何ら制限するものではなく、本発明の範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ決定される。

実施例

[0024] 大気の超微細気泡を含む水の調整

気液混合せん断方式による超微細気泡発生装置である株式会社協和機設製の「BUVITAS」により、日本薬局方精製水を使用して、超微細気泡を発生させた。生成した超微細気泡の粒径をナノ粒子解析システム ナノサイトシリーズ（NanoSight社製）により測定した。測定結果を図1に示す。図の横軸はnm単位での粒子径を、縦軸は1ml当たりのNB粒子数（ナノバブル粒子数）（ 10^6 個/ml）を示す。また図2に、日本薬局方精製水についての微細気泡の測定結果を示す。

生成した超微細気泡を含む水の最頻粒子径は86nm、最頻粒子径における粒子濃度は 7.57×10^6 個/ml、総粒子濃度は 6.86×10^8 個/mlであった。

日本薬局方精製水については、粒子濃度が非常に少なく、正規分布が見ら

れないことから測定結果はノイズであると判断された。

以下の実施例においては、大気の超微細気泡を含む水は上記と同様に調整され、ブランクの比較例としては、大気の超微細気泡を含む水の代わりに、日本薬局方精製水を使用したものを用いた。

[0025] 1. ペルオキシターゼの20℃、50℃における10日間の安定性

ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを大気の超微細気泡を含む水に50 ng/mlになるように加え、チューブに1.0 mlずつ分注し、20、50℃の条件で1、3および10日間密栓保存した。次に、保存したストレプトアビジン ペルオキシダーゼ水溶液100 μlに、下記の通り調整した基質液を100 μl加え発色させた。

(基質液の調整方法)

下記組成からなる試薬を混合して基質液を得た。

o-フェニレンジアミン タブレット (SIGMA-ALDRICH社製)
): 1個

70 mMクエン酸緩衝液 (クエン酸-リン酸ナトリウム; pH 5.0) :
12.5 ml

過酸化水素液: 5 μl

(酵素濃度および酵素活性残存率の算出方法)

サンプルに4 N H₂SO₄溶液を50 μl加え、発色反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製) で492 nmにおける吸光度 (A₄₉₂) を測定した。酵素濃度は、ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを用いて作成した検量線から求めた。また、サンプルの初期酵素活性をA、保存後の酵素活性をBとし、次式から「酵素活性残存率」を算出した。

$$\text{酵素活性残存率 (\%)} = (1 - (A - B) / A) \times 100$$

なお最頻粒子径における濃度は、最頻粒子径における濃度測定値 (10⁶個/ml) ×測定時の希釈倍率として計算された。また総粒子濃度は、総粒子濃度における濃度測定値 (10⁸個/ml) ×測定時の希釈倍率として計算さ

れた。

結果を下記の表 1 および表 2 に示す。

[0026] [表1]

		比較例1	比較例2	比較例3	実施例1	実施例2	実施例3
試験条件	熱処理温度(°C)	20	20	20	20	20	20
	熱処理時間(日)	1	3	10	1	3	10
	最頻粒子径(nm)	—	—	—	86	86	86
	最頻粒子径における濃度(10^6 個/ml)	—	—	—	7.57	7.57	7.57
	総粒子濃度(10^8 個/ml)	—	—	—	6.86	6.86	6.86
酵素活性	酵素残存率(%)	100.0	104.7	77.9	112.0	123.6	98.1

[0027] [表2]

		比較例4	比較例5	比較例6	実施例4	実施例5	実施例6
試験条件	熱処理温度(°C)	50	50	50	50	50	50
	熱処理時間(日)	1	3	10	1	3	10
	最頻粒子径(nm)	—	—	—	86	86	86
	最頻粒子径における濃度(10^6 個/ml)	—	—	—	7.57	7.57	7.57
	総粒子濃度(10^8 個/ml)	—	—	—	6.86	6.86	6.86
酵素活性	酵素残存率(%)	54.2	34.3	11.3	108.7	104.5	75.1

[0028] 実施例 1－3 は 20℃ で 1 日、3 日および 10 日保存した時の結果を示し、実施例 4－6 は 50℃ で 1 日、3 日および 10 日保存した時の結果を示す。20℃ における比較では酵素残存率が著しく向上したことが示されている。また 50℃ における結果も非常に優れたものであった。

[0029] 2. 酵素の熱（80℃）に対する安定性

（酵素液の調整）

ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを大気中の超微細気泡を含む水に 50 ng/ml になるように加え、チューブに 1.0 ml ずつ分注し、80℃ の条件で 30 分間密栓保存した。このとき、超微細気泡を含む水の最頻粒子濃度を、それぞれ 1 ml あたり 10^6 個（実施例 7 および 8）、 10^7 個（実施例 9 および 10）、 10^8 個（実施例 11 および 12）になるように調整した。

次に、保存したストレプトアビジン ペルオキシダーゼ水溶液 100 μ l に、調整した下記試薬（基質液）を 100 μ l 加え発色させた。

（基質液の調整）

下記組成からなる試薬を混合して基質液を得た。

o-フェニレンジアミン タブレット (SIGMA-ALDRICH社製)
): 1個

70 mMクエン酸緩衝液 (クエン酸-リン酸ナトリウム pH 5.0):
12.5 ml

過酸化水素液: 5 μ l

(酵素濃度および酵素活性残存率の算出方法)

サンプルに4 N H_2SO_4 溶液を50 μ l加え、発色反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製) で492 nmにおける吸光度を測定した。酵素濃度は、ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを用いて作成した検量線から求めた。また、サンプルの初期酵素活性をA、保存後の酵素活性をBとし、次式から「酵素活性残存率」を算出した。

$$\text{酵素活性残存率 (\%)} = (1 - (A - B) / A) \times 100$$

結果を下記の表3に示す。

総粒子濃度の増大がより優れた結果を提供することが示されている。

なお、実施例8において酵素残存率は0.0%であり、実施例10においては酵素残存率は15.2%となっている。比較例と比較して結果は向上しているものの、80℃で80分という条件下では実施例12におけるように数億個の最頻粒子径濃度と数百億個の総粒子濃度が望ましいと考えられる。

[0030] [表3]

		比較例7	比較例8	実施例7	実施例8	実施例9 (粒子濃度 換算値)	実施例10 (粒子濃度 換算値)	実施例11 (粒子濃度 換算値)	実施例12 (粒子濃度 換算値)
試験条件	熱処理温度(℃)	80	80	80	80	80	80	80	80
	熱処理時間(分)	30	80	30	80	30	80	30	80
	最頻粒子径(nm)	-	-	79	79	76	76	76	76
	最頻粒子径における濃度(10^6 個/ml)	-	-	1.13	1.13	91.5	91.5	915	915
	総粒子濃度(10^6 個/ml)	-	-	0.89	0.89	70.8	70.8	708	708
酵素活性	酵素残存率(%)	0.73	0.0	24.7	0.0	76.2	15.2	95.5	57.6

[0031] 3. 酵素のpHに対する安定性

大気の超微細気泡を含む水を用いて、クエン酸緩衝液 (pH 4.6)、酢酸緩衝液 (pH 5.7)、リン酸緩衝液 (pH 7.0)、ホウ酸緩衝液 (p

H 8. 9) を調整し、それぞれに、ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを 50 ng/ml になるように加えた。これをチューブに 1.0 ml ずつ分注し、 80°C の条件で 20 分間密栓保存した。ストレプトアビジン ペルオキシダーゼ水溶液 $100 \mu\text{l}$ に、調整した下記試薬（基質液）を $100 \mu\text{l}$ 加え発色させた。

（基質液の調整）

下記組成からなる試薬を混合して基質液を得た。

o-フェニレンジアミン タブレット（SIGMA-ALDRICH 社製）：1 個

70 mM クエン酸緩衝液（クエン酸 - リン酸ナトリウム $\text{pH} 5.0$ ）： 12.5 ml

過酸化水素液： $5 \mu\text{l}$

（酵素濃度および酵素活性残存率の算出）

サンプルに 4 N H_2SO_4 溶液を $50 \mu\text{l}$ 加え、発色反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）で 492 nm における吸光度を測定した。酵素濃度は、ストレプトアビジン ペルオキシダーゼを用いて作成した検量線から求めた。また、サンプルの初期酵素活性を A、保存後の酵素活性を B とし、次式から「酵素活性残存率」を算出した。

$$\text{酵素活性残存率 (\%)} = (1 - (A - B) / A) \times 100$$

結果を下記の表 4 に示す。

本発明により広範な pH 範囲において優れた安定性が提供されることが示されている。

[0032] [表4]

		比較例9	比較例10	比較例11	比較例12	実施例13	実施例14	実施例15	実施例16
試験条件	熱処理温度($^\circ\text{C}$)	80	80	80	80	80	80	80	80
	熱処理時間(分)	20	20	20	20	20	20	20	20
	緩衝液	クエン酸	酢酸	リン酸	ホウ酸	クエン酸	酢酸	リン酸	ホウ酸
	pH	4.6	5.7	7.0	8.9	4.6	5.7	7.0	8.9
	最頻粒子径(nm)	-	-	-	-	86	86	86	86
	最頻粒子径における濃度(10^8 個/ml)	-	-	-	-	7.57	7.57	7.57	7.57
酵素活性	総粒子濃度(10^8 個/ml)	-	-	-	-	6.86	6.86	6.86	6.86
	酵素残存率(%)	24.3	66.0	62.4	42.6	75.5	83.0	95.3	72.6

[0033] 4. プロテアーゼの熱（80℃）安定性

（酵素液の調整）

プロテアーゼを大気の超微細気泡を含む水に10mg/mlになるように加え、80℃で30分間放置した後、チューブに990μlずつ分注した。アゾカゼイン トリス-Cl（Azocasein Tris-Cl）（1.3M）、CaCl₂（20mM）溶液を0.05（w/v）%になるように10μl加え、60℃に設定したヒーティングブロック（ヤマト科学株式会社製）で30分間密栓保存した。

次に10%（w/v）トリクロロ酢酸を1.1ml添加し25～27℃の室温下で30分間待ち、反応を停止させた。沈殿したタンパク質を分離するため、13000×gで10分間遠心し、上清1mlを別の1M NaOHが1ml入ったチューブに発色させた。

（酵素活性および酵素活性残存率の算出方法）

調整した酵素液を用いて、マイクロプレートリーダー（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製）で450nmにおける吸光度（A450）を測定した。また、ブランクにおいても上記と同様に450nmにおける吸光度（A450b）を測定し、次式を用いて「酵素活性」として算出した。

$$\text{酵素活性 (U/ml)} = (A450 - A450b) / (0.001 \times 30)$$

*1 unit (U) のプロテアーゼ活性は、「450nmにおける吸光度が1分あたり0.001増加すること」と定義する。

次に、サンプルの初期酵素活性をA、30分保存したサンプルの酵素活性をBとし、次式から「酵素活性残存率」を算出した。

$$\text{酵素活性残存率 (\%)} = (1 - (A - B) / A) \times 100$$

結果を下記の表5に示す。

本発明によりプロテアーゼについても優れた熱安定性が得られることが示されている。

[0034] [表5]

		比較例13	実施例17 (粒子濃度 換算値)
試験条件	熱処理温度(°C)	80	80
	熱処理時間(分)	30	30
	最頻粒子径(nm)	-	99
	最頻粒子径における濃度(10^6 個/ml)	-	303
	総粒子濃度(10^8 個/ml)	-	215
酵素活性	酵素活性残存率(%)	24.8	65.0

[0035] 5. カタラーゼの安定性

(試験方法)

(1) カタラーゼを精製水または超微細気泡を含む水（最頻粒子径；100nm、最頻粒子濃度； 8.77×10^6 /ml、粒子径1000nm以下の総粒子濃度； 6.18×10^8 /ml）にて1mg/ml（3809Unit/ml）水溶液に調整した。

(2) マイクロチューブに分注したカタラーゼ水溶液1mlをサーモシェイカー（500rpm）にて62.5°C×所定の時間（20、30、40、50分）インキュベートした。その後、遠心分離器（14000rpm×5分間）にて沈殿処理した。

(3) 処理したカタラーゼ水溶液の上清100μL、3%過酸化水素水200μL、リン酸緩衝液（500Mm・pH5.8）200μLと精製水100μLをチューブに取り室温×15分間反応させた。

(4) 反応させた後、酵素を完全に失活するために100°C×5分間熱処理した。

(5) 反応液を100μL分取し、290nmにおける吸光度を測定した。測定した吸光度より検量線を用い過酸化水素分解率を算出した。

結果を図3に示す。

[0036] 6. リパーゼの安定性

(試験方法)

(1) リパーゼを精製水または超微細気泡を含む水（最頻粒子径；113nm、最

頻粒子濃度； $36.4 \times 10^6 / \text{ml}$ 、粒子径1000nm以下の総粒子濃度； $20.9 \times 10^8 / \text{ml}$ ）にて0.02mg/ml（23.52Unit/ml）水溶液に調整した。

（2）調整したリパーゼ水溶液を70℃にて5分間インキュベートした。

（3）処理したリパーゼ水溶液50μL、以下に記載された方法で調整された基質液100μL、トリス塩酸緩衝液（pH8.2）50μLを所定の時間×室温で反応させた。

反応液を分取し、410nmにおける吸光度を測定した。

結果を図4に示す。

（基質液の調整）

精製水100mlに0.0135gのp-ニトロフェニルラウレート、0.017gのドデシル硫酸ナトリウム、1.0gのTriton X-100を混合し、65℃にて水溶させた後、冷却した。

請求の範囲

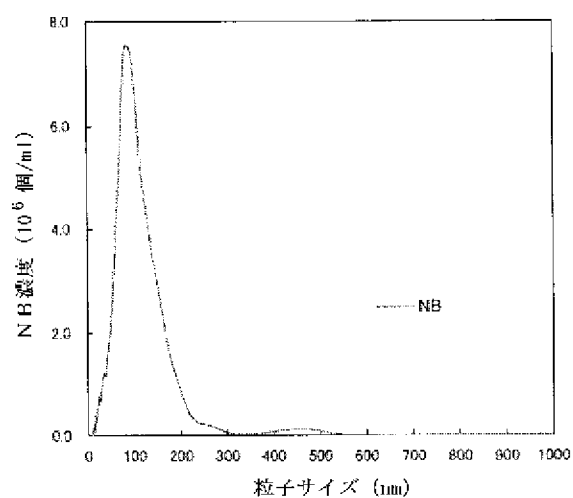
- [請求項1] 最頻粒子径が500nm以下の超微細気泡を含む水とタンパク質を含む組成物。
- [請求項2] 超微細気泡の最頻粒子濃度が1mlあたり100万個以上である、請求項1に記載の超微細気泡を含む水とタンパク質を含む組成物。
- [請求項3] 粒子径1000nm以下の気泡の粒子濃度が1mlあたり5000万個以上である、請求項1ないし2に記載の超微細気泡を含む水とタンパク質を含む組成物。
- [請求項4] 前記超微細気泡が空気、酸素、水素、窒素、炭酸ガス、アルゴン、ネオン、キセノン、フッ素化気体および不活性化ガスから選択される1種または2種以上の気体でなる、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。
- [請求項5] 前記タンパク質が酵素である、請求項1ないし4のいずれかに記載の組成物。
- [請求項6] 前記酵素が、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、またはリパーゼである請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 最頻粒子径が500nm以下である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法。
- [請求項8] 最頻粒子径が500nm以下であり、最頻粒子濃度が1mlあたり100万個以上である超微細気泡を含む水とタンパク質を混合することを含む、タンパク質組成物の安定化方法。
- [請求項9] 請求項7または8に記載のタンパク質組成物の安定化方法であって、超微細気泡を含む水の粒子径1000nm以下の気泡の粒子濃度が1mlあたり5000万個以上である、タンパク質組成物の安定化方法。
- [請求項10] 前記超微細気泡が空気、酸素、水素、窒素、炭酸ガス、アルゴン、ネオン、キセノン、フッ素化気体および不活性化ガスから選択される1種または2種以上の気体を内包する、請求項7ないし9のいずれか

に記載のタンパク質組成物の安定化方法。

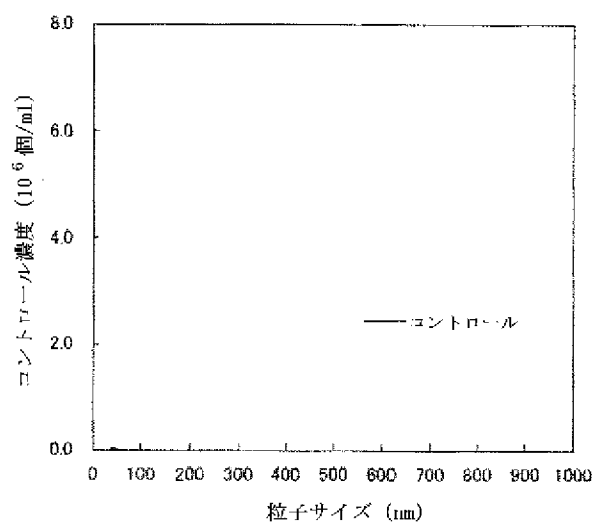
[請求項11] 前記タンパク質が酵素である、請求項7ないし10のいずれかに記載のタンパク質組成物の安定化方法。

[請求項12] 前記酵素が、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、またはリパーゼである、請求項11記載のタンパク質組成物の安定化方法。

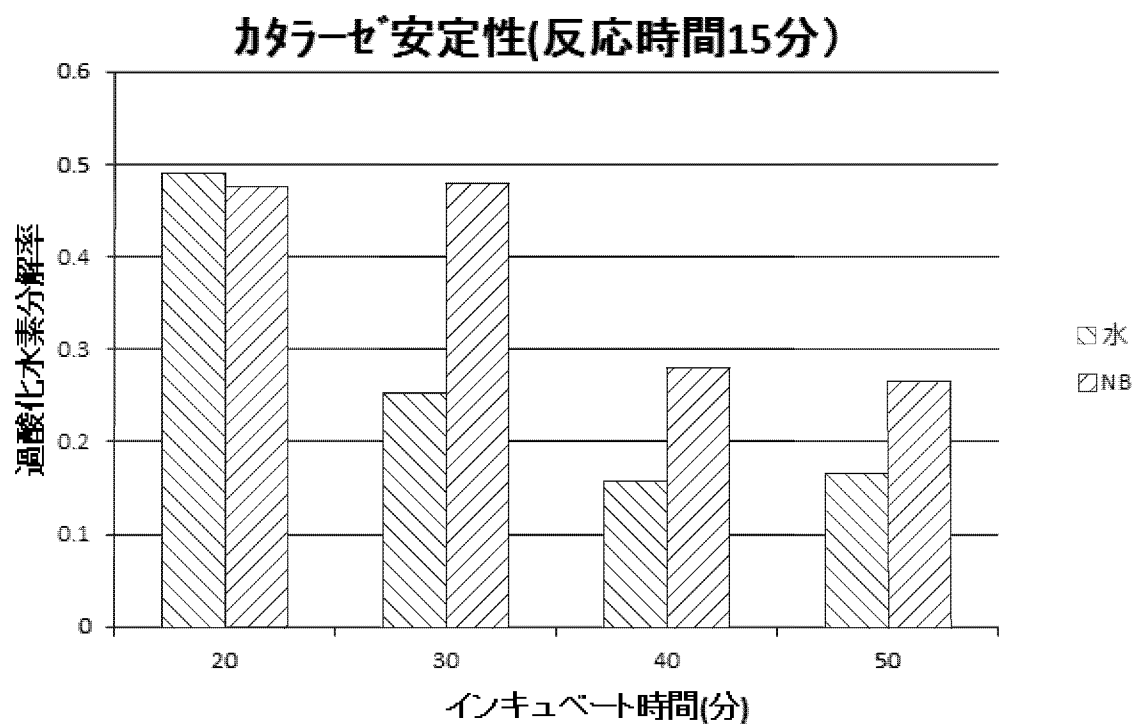
[図1]



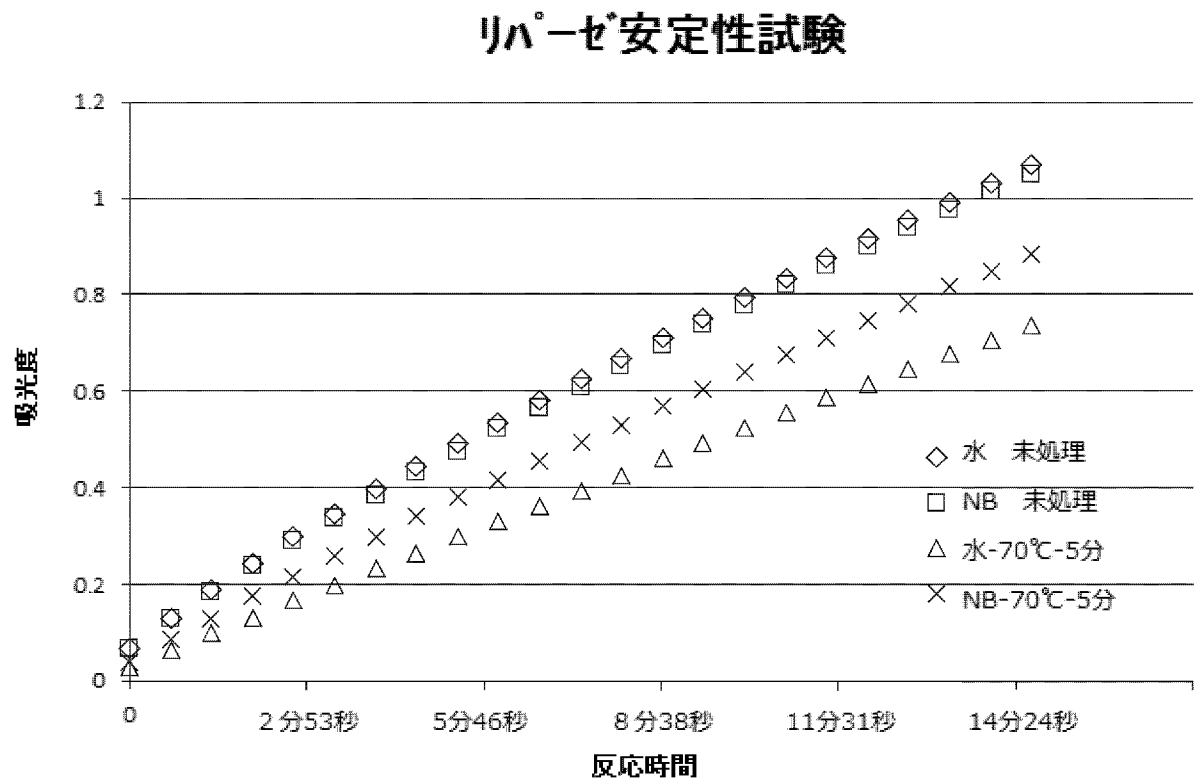
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N9/14(2006.01)i, C12N9/96(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N9/00, C12N9/02, C12N9/14, C12N9/96

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shuichi YAMAMOTO, "Enzyme inactivation in drying : relation between enzyme heat stability and water content", New Food Industry, 1994, vol.36, no.8, pages 71 to 87	1-12
X	JP 2009-225748 A (MIKASA Corp.), 08 October 2009 (08.10.2009), (Family: none)	1-6
X	JP 2003-71472 A (Mineral Soken Yugen Kaisha), 11 March 2003 (11.03.2003), (Family: none)	1-6
X	WO 2008/081948 A1 (Takai Tofu & Soymilk Equipment Co.), 10 July 2008 (10.07.2008), & US 2010/0086660 A1 & KR 10-2009-0102774 A	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November, 2012 (22.11.12)

Date of mailing of the international search report

04 December, 2012 (04.12.12)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-49243 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 06 March 2008 (06.03.2008), (Family: none)	1-6
X	JP 2007-105677 A (MIKASA Corp.), 26 April 2007 (26.04.2007), (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N9/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N9/14(2006.01)i, C12N9/96(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N9/00, C12N9/02, C12N9/14, C12N9/96			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	山本修一, 乾燥時の酵素失活: 酵素熱安定性と水分濃度の関係, New Food Industry, 1994, Vol.36, No.8, p.71-87	1-12	
X	JP 2009-225748 A (株式会社ミカサ) 2009.10.08, (ファミリーなし)	1-6	
X	JP 2003-71472 A (ミネラル総研有限会社) 2003.03.11, (ファミリーなし)	1-6	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 22.11.2012		国際調査報告の発送日 04.12.2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2008/081948 A1 (株式会社高井製作所) 2008.07.10, & US 2010/0086660 A1 & KR 10-2009-0102774 A	1-6
X	JP 2008-49243 A (三菱瓦斯化学株式会社) 2008.03.06, (ファミリーなし)	1-6
X	JP 2007-105677 A (株式会社ミカサ) 2007.04.26, (ファミリーなし)	1-6