

(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
2024年7月11日(11.07.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/147332 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 13/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/047149

(22) 国際出願日: 2023年12月28日(28.12.2023)

(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 2023-001182 2023年1月6日(06.01.2023) JP

(71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 日浦 恵太 (HIURA Keita); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP). 高橋 哲也 (TAKAHASHI Tetsuya); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: γ -AMINOBUTYRIC ACID GENERATING COMPOSITION, AND METHOD FOR PRODUCING γ -AMINOBUTYRIC ACID-CONTAINING COMPOSITION

(54) 発明の名称: γ -アミノ酪酸生成用組成物および γ -アミノ酪酸含有組成物の製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for highly efficiently producing γ -aminobutyric acid from a glutamic acid-containing material. The present invention pertains to a γ -aminobutyric acid generating composition containing a pineapple extract. The present invention also pertains to a method for producing γ -aminobutyric acid, the method comprising a step for causing a γ -aminobutyric acid generating composition to act on a material containing glutamic acid and/or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明は、グルタミン酸含有原料から高効率で γ -アミノ酪酸を生産する方法を提供することを課題とする。本発明は、パイナップル抽出物を含有する γ -アミノ酪酸生成用組成物に関する。また、本発明は、グルタミン酸又はその塩類を含む原料に γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含む、 γ -アミノ酪酸の製造方法に関する。



WO 2024/147332 A1

明 細 書

発明の名称：

γ-アミノ酪酸生成用組成物およびγ-アミノ酪酸含有組成物の製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、γ-アミノ酪酸生成用組成物およびγ-アミノ酪酸含有組成物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] γ-アミノ酪酸 (Gamma aminobutyric acid ; GABA) は神経伝達物質として作用を示すアミノ酸であり、生体内ではグルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamic acid decarboxylase ; GAD) によって、グルタミン酸から生合成される。グルタミン酸脱炭酸酵素は、植物や微生物、高等動物まで広く生物界に存在している。

[0003] γ-アミノ酪酸には血圧降下作用、精神の安定化作用（抗ストレス作用）等の生理作用が報告されており、高血圧から引き起こされる動脈硬化や心臓病、脳卒中の予防が期待され、注目されている。このため、近年は、γ-アミノ酪酸を含有する食品が数多く市販されている。例えば、γ-アミノ酪酸は、トマトジュース、チョコレート、漬物や味噌といった発酵食品など、身近な飲料や食品に含まれており、手軽に入手できるため消費者の関心も高まっている。

[0004] γ-アミノ酪酸を高効率に生産することを目的として、様々な技術が検討されている。例えば、特許文献1には、グルタミン酸或いはグルタミン酸塩を含む溶液或いは懸濁液に小麦胚芽とピリドキサルリン酸を添加して反応させ、溶液中のグルタミン酸と小麦胚芽中のグルタミン酸を小麦胚芽中のグルタミン酸脱炭酸酵素の酵素作用によりγ-アミノ酪酸とすることを特徴とするγ-アミノ酪酸の効率的生産方法が開示されている。また、特許文献2には、生パパイヤにグルタミン酸またはグルタミン酸塩を添加し、減圧乾燥機を使用して980～990hPaの圧力下で温度45～55℃で24～12

0時間乾燥し、水分含有量が5%未満かつγ-アミノ酪酸含有量が増加した乾燥パパイヤを製造することを特徴とする、γ-アミノ酪酸高富化乾燥パパイヤの調製方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2009-11228号公報

特許文献2：特開2019-50758号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、従来技術においてはγ-アミノ酪酸の生産効率に課題があり、改善が求められていた。

[0007] そこで本発明者らは、このような従来技術の課題を解決するために、グルタミン酸含有原料から高効率でγ-アミノ酪酸を生産する方法を提供することを目的として検討を進めた。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の具体的な態様の例を以下に示す。

[0009] [1] パイナップル抽出物を含有するγ-アミノ酪酸生成用組成物。

[2] γ-アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性がグルタミン酸1gあたり1U以上である、[1]に記載のγ-アミノ酪酸生成用組成物。

[3] プロテアーゼをさらに含有する、[1]又は[2]に記載のγ-アミノ酪酸生成用組成物。

[4] パイナップル抽出物が、パイナップルの非可食部抽出物である、[1]～[3]のいずれかに記載のγ-アミノ酪酸生成用組成物。

[5] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に[1]～[4]のいずれかに記載のγ-アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含む、γ-アミノ酪酸の製造方法。

[6] γ -アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性がグルタミン酸1gあたり1U以上である、[5]に記載の製造方法。

[7] タンパク質含有原料に[1]～[4]のいずれかに記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含む、 γ -アミノ酪酸含有組成物の製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、グルタミン酸含有原料から高効率で γ -アミノ酪酸を生産する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1には、薄層クロマトグラフィーにおける γ -アミノ酪酸生成の分析結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下において、本発明について詳細に説明する。以下に記載する構成要件の説明は、代表的な実施形態や具体例に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施形態に限定されるものではない。なお、本明細書において「～」を用いて表される数値範囲は「～」前後に記載される数値を下限值及び上限値として含む範囲を意味する。

[0013] (γ -アミノ酪酸生成用組成物)

本実施形態は、パイナップル(学名: *Ananas comosus*)抽出物を含有する γ -アミノ酪酸生成用組成物に関する。本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物はパイナップル抽出物とその他任意成分を含むものであってもよく、 γ -アミノ酪酸生成用組成物はパイナップル抽出物からなるものであってもよい。

[0014] γ -アミノ酪酸生成用組成物に含まれるパイナップル抽出物は、グルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換するグルタミン酸脱炭酸酵素を含む。グルタミン酸脱炭酸酵素は、グルタミン酸のカルボキシ基を脱炭酸し、 γ -アミノ酪酸を生成する酵素である。なお、 γ -アミノ酪酸生成用組成物に含まれるパイナップル抽出物は、水抽出物であることが好ましい。パイナップルを水で抽

出することにより、グルタミン酸脱炭酸酵素を包含し得る。なお、 γ -アミノ酪酸生成用組成物に含まれるパイナップル抽出物は、水で抽出したものを乾燥させ、粉末状としたものを用いてもよい。

[0015] 本実施形態においては、パイナップル抽出物を含有する γ -アミノ酪酸生成用組成物をグルタミン酸に作用させことで、グルタミン酸含有原料から高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）を生成することができる。また、本実施形態においては、グルタミン酸を高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）に変換することができる。例えば、以下の式を用いて算出されるグルタミン酸から γ -アミノ酪酸（GABA）への変換率は、30%以上であることが好ましく、35%以上であることがより好ましく、40%以上であることがさらに好ましく、45%以上であることが特に好ましい。なお、グルタミン酸から γ -アミノ酪酸（GABA）への変換率の上限値は特に限定されるものではなく、100%であってもよい。本実施形態では、グルタミン酸から γ -アミノ酪酸（GABA）への変換率が上記範囲内であれば、グルタミン酸を高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）に変換できると評価できる。

[0016] グルタミン酸から γ -アミノ酪酸（GABA）への変換率は、以下の式で算出することができる。

[数1]

$$\text{変換率 (\%)} = \frac{[\text{GABA}]}{[\text{GABA}]_{\text{max}}} = \frac{[\text{GABA}] - [\text{GABA}]_{\text{cont.}}}{[\text{Glu}]_{\text{cont.}} \times \frac{103.1}{147.1}} \times 100$$

[0017] 上記式において、 $[\text{GABA}]$ は γ -アミノ酪酸の生成濃度、 $[\text{GABA}]_{\text{max}}$ は γ -アミノ酪酸の最大生成濃度、 $[\text{GABA}]_{\text{cont.}}$ は γ -アミノ酪酸生成用組成物（パイナップル抽出物）の添加なしの溶液の γ -アミノ酪酸の濃度、 $[\text{Glu}]_{\text{cont.}}$ は γ -アミノ酪酸生成用組成物（パイナップル抽出物）の添加なしの溶液のグルタミン酸の濃度、103.1 は γ -アミノ酪酸の分子量、147.1 はグルタミン酸の分子量を表す。なお、 γ -アミノ酪酸の濃度やグルタミン酸の濃度はHPLC（高速液体クロマトグラフィー）

等で定量することができる。

[0018] 本実施形態で用いるパイナップル抽出物には、パイナップル由来のプロテアーゼやペプチダーゼが含まれていてもよい。このプロテアーゼやペプチダーゼの作用により、タンパク質含有原料中の遊離グルタミン酸の量を増やすことができ、タンパク質含有原料からも高効率で γ -アミノ酪酸を生産することができるものと考えられる。

[0019] 本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性（グルタミン酸脱炭酸酵素活性）は、グルタミン酸1gあたり0.1U以上であることが好ましく、0.5U以上であることがより好ましく、1U以上であることがさらに好ましく、5U以上であることが一層好ましく、10U以上であることがより一層好ましく、25U以上であることがさらに一層好ましく、50U以上であることがよりさらに一層好ましく、100U以上であることが特に好ましく、130U以上であることが最も好ましい。また、 γ -アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性は、グルタミン酸1gあたり100000U以下であることが好ましく、50000U以下であることがより好ましく10000U以下であることがさらに好ましく、5000U以下であることが一層好ましく、2000U以下であることが特に好ましい。

[0020] GABA生成酵素活性は50mMのL(+)-グルタミン酸を基質とし、1分間に1 μ molの γ -アミノ酪酸を生成する酵素量を1Uと定義する。具体的には、以下の方法で γ -アミノ酪酸の定量を行い、GABA生成酵素活性を算出する。まず、基質溶液（終濃度30mM リン酸二水素カリウム緩衝液（pH5.5）、終濃度50mM L(+)-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物）500 μ Lに、適当な濃度に希釈した γ -アミノ酪酸生成用組成物を500 μ L混合し、37℃で10分間静置し反応させる。反応後の溶液500 μ Lを分取し、500 μ Lのエタノールを混合して、12000rpmで10分間遠心分離する。遠心後の上清溶液を、メンブレンフィルターを用いてろ過し、適宜希釈して分析用サンプルとし、分析用サンプルについて、アミノ酸分析機器（Agilent社製HPLC）を用いて γ -ア

ミノ酪酸の定量を行う。

[0021] 本実施形態で用いるパイナップル抽出物はグルタミン酸脱炭酸酵素に加えて、プロテアーゼを含んでいてもよい。また、本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物には、パイナップル抽出物に含まれるプロテアーゼに加えて、別途プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼ等）が添加されていてもよい。このように、 γ -アミノ酪酸生成用組成物は、プロテアーゼ活性を有する組成物であることが好ましい。 γ -アミノ酪酸生成用組成物のプロテアーゼ活性は、1 UのGABA生成活性あたり0.0001~100 Uであることが好ましく、0.001~50 Uであることがより好ましく、0.005~10 Uであることがさらに好ましい。 γ -アミノ酪酸生成用組成物がプロテアーゼを含むことにより、タンパク質含有原料から高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）を生成することができる。なお、プロテアーゼ活性は0.5%カゼイン溶液（pH 7.0）を基質として、37℃で作用させたときに、1分間にチロシン1 μ gに相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を1単位（1 U）とする。具体的には第9版食品添加物公定書記載の方法に従って測定すればよい。

[0022] 本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物は、任意成分として、ピリドキサル-5-リン酸、ピリドキサミン-5-リン酸、ピリドキシン-5-リン酸、ビタミンB6（ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン）等を含むしてもよい。なお、ピリドキサル-5-リン酸等を含むしない態様も好ましい態様である。本実施形態においては、ピリドキサル-5-リン酸等を含むしなくても、 γ -アミノ酪酸を高効率に生成することができる。

[0023] γ -アミノ酪酸生成用組成物にピリドキサル-5-リン酸等が含まれる場合、ピリドキサル-5-リン酸等の含有量は、 γ -アミノ酪酸生成用組成物中に含まれるグルタミン酸脱炭酸酵素1 Uに対して、0.001 mg以上であることが好ましく、0.01 mg以上であることがより好ましく、0.05 mg以上であることがさらに好ましく、0.1 mg以上であることが

特に好ましい。また、ピリドキサルー５－リン酸等の含有量は、 γ －アミノ酪酸生成用組成物中に含まれるグルタミン酸脱炭酸酵素１Ｕに対して、１００ｍｇ以下であることが好ましく、１０ｍｇ以下であることがより好ましく、５ｍｇ以下であることがさらに好ましく、１ｍｇ以下であることが一層好ましく、０．５ｍｇ以下であることが特に好ましい。なお、ピリドキサルー５－リン酸等の含有量は、ピリドキサルー５－リン酸、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンー５－リン酸及びピリドキサミンー５－リン酸の合計含有量である。 γ －アミノ酪酸生成用組成物がピリドキサルー５－リン酸等を含むことにより、グルタミン酸をより高効率で γ －アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）に変換することができる。

[0024] 本実施形態の γ －アミノ酪酸生成用組成物が含み得るその他の任意成分としては、例えば、ｐＨ調整剤、防腐剤、安定化剤、増粘剤、酸化防止剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、溶解補助剤、増量剤、懸濁剤等が挙げられる。ｐＨ調整剤としては、酢酸バッファー、リン酸バッファー、ＭＥＳバッファー、ＨＥＰＥＳバッファー、ＰＩＰＥＳバッファー、Ｂｉｓ－ｔｒｉｓバッファー、ＭＯＰＳバッファー等が挙げられる。また、 γ －アミノ酪酸生成用組成物は、パイナップル以外の果実抽出物を含んでいてもよい。パイナップル以外の果実抽出物としては、例えば、パパイア、キウイ、バナナ、トマト等を挙げることができる。

[0025] 本実施形態の γ －アミノ酪酸生成用組成物ではグルテンを実質的に含んでいない構成とすることもできる。すなわち、本実施形態の γ －アミノ酪酸生成用組成物はグルテンフリーの組成物とすることもできる。そして、このような γ －アミノ酪酸生成用組成物を用いることで、グルテンフリーの γ －アミノ酪酸を生成することができる。また、本実施形態の γ －アミノ酪酸生成用組成物では、アレルゲンとして、小麦を含まない構成とすることもできるため、アレルゲンフリーの γ －アミノ酪酸を生成することもできる。

[0026] 本実施形態の γ －アミノ酪酸生成用組成物は粉末状、固形状、ゲル状、液状のいずれの形態であってもよい。中でも、 γ －アミノ酪酸生成用組成物は

液状又は粉末状であることが好ましい。

[0027] 本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物に含まれるパイナップル抽出物は、パイナップルの可食部抽出物であってもよく、パイナップルの非可食部抽出物であってもよい。例えば、パイナップル抽出物は、パイナップルの根、葉、茎、皮及び実よりなる群から選択される少なくとも1つからの抽出物であってもよい。中でも、パイナップル抽出物は、パイナップルの非可食部抽出物であることが好ましく、この場合、パイナップル抽出物は、パイナップルの葉、皮及び茎から選択される少なくとも1つからの抽出物であることが好ましく、茎からの抽出物であることが特に好ましい。このような抽出物の具体的な例として、天野エンザイム株式会社製の乾燥パイナップル抽出物を用いることができる。

[0028] (γ -アミノ酪酸生成用組成物の製造方法)

本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物の製造方法は、パイナップルから抽出物を得る工程を含む。パイナップルから抽出物を得る工程は特に限定されるものではないが、例えば、パイナップルの根、葉、茎、皮及び実よりなる群から選択される少なくとも1つを洗浄後、粉砕し、搾汁する工程を含むことが好ましい。搾汁工程の後には、固形分を沈降分離し、ろ過する工程を設けることが好ましい。ろ過工程では、例えば、メンブレンフィルターを用いたろ過を行った後に、限外ろ過を行うことが好ましい。

[0029] 本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物の製造方法は、パイナップル抽出物を乾燥させることで粉末状とする工程を有していてもよい。例えば、本実施形態の γ -アミノ酪酸生成用組成物の製造方法は、上述した工程で得られたパイナップル抽出物（パイナップル抽出液）を凍結乾燥する工程を有していてもよい。さらに、 γ -アミノ酪酸生成用組成物の製造方法は、凍結乾燥して得られたパイナップル抽出物を篩過し、賦形剤と混合する工程を有していてもよい。

[0030] γ -アミノ酪酸生成用組成物としては、市販品を用いることもできる。市販品としては、例えば、天野エンザイム株式会社製の乾燥パイナップル抽出

物等を用いることができる。

[0031] (γ-アミノ酪酸の製造方法)

本実施形態は、グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述したγ-アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含むγ-アミノ酪酸の製造方法に関する。グルタミン酸又はその塩類としては、例えば、グルタミン酸ナトリウム・グルタミン酸カリウム・グルタミン酸カルシウム・グルタミン酸マグネシウム等が挙げられる。

[0032] グルタミン酸又はその塩類を含む原料としては、グルタミン酸含有物が挙げられる。グルタミン酸含有物は、遊離のグルタミン酸又はその塩を含有する調味料やタンパク質含有食品等が挙げられる。このような食品としては、例えば、昆布エキスやその粉末・チキンエキスやその粉末等の天然調味料を挙げることができる。また、グルタミン酸又はその塩類を含む原料としては、グルタミン酸又はその塩類を別途添加した原料を用いてもよい。

[0033] グルタミン酸又はその塩類を含む原料はタンパク質含有原料であることも好ましい。すなわち、本実施形態は、タンパク質含有原料に、上述したγ-アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含むγ-アミノ酪酸の製造方法に関する。タンパク質含有原料としては、豆類、麦類、ナッツ類、菌類、野菜（ホウレンソウ、ニンジン、タマネギ、キャベツ、大根）等の植物性タンパク質含有食品、牛肉、鶏肉、豚肉、魚、昆虫等の動物性タンパク質含有食品等を挙げることができる。また、植物性タンパク質含有食品や動物性タンパク質含有食品を酸加水分解又は酵素分解して得られるアミノ酸やペプチド混合物を用いることもできる。さらに、植物性タンパク質含有食品や動物性タンパク質含有食品の発酵物を用いることもできる。

[0034] 中でも、グルタミン酸又はその塩類を含む原料の具体例としては、トマトペーストやトマトジュース、漬物、味噌、ヨーグルト、ホウレンソウ、ニンジン、タマネギ、キャベツ、大根、菌類等を用いることが好ましい。なお、上述したγ-アミノ酪酸生成用組成物は、上記食品に添加される用途に用いられるものであってもよく、グルタミン酸含有食品添加剤であってもよい。

[0035] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に含まれるグルタミン酸又はその塩類の含有量は、0.05 mM以上であることが好ましく、0.1 mM以上であることがより好ましく、0.5 mM以上であることがさらに好ましく、1.0 mM以上であることが特に好ましい。また、グルタミン酸又はその塩類を含む原料に含まれるグルタミン酸又はその塩類の含有量は、1 M以下であることが好ましく、0.8 M以下であることがより好ましく、0.5 M以下であることがさらに好ましく、0.2 M以下であることが一層好ましく、0.1 M以下であることがより一層好ましい。グルタミン酸又はその塩類を含む原料に含まれるグルタミン酸又はその塩類の含有量を上記範囲内とすることにより、グルタミン酸を高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）に変換することが容易となる。

[0036] グルタミン酸又はその塩類を含む原料の形態は特に限定されるものではなく、液状、粉状、固形状、スラリー状などであってもよい。中でも、グルタミン酸又はその塩類を含む原料は液状やスラリー状であることが好ましい。

[0037] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程では、ピリドキサール-5-リン酸が添加されてもよい。なお、ピリドキサール-5-リン酸が添加されない態様も好ましい態様である。本実施形態においては、グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程においてピリドキサール-5-リン酸が存在しなくても、 γ -アミノ酪酸を高効率に生成することができる。

[0038] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程において、ピリドキサール-5-リン酸が存在する場合、ピリドキサール-5-リン酸の含有量（添加量）は、グルタミン酸100質量部に対して、0質量部超であることが好ましく、0.001質量部以上であることがより好ましく、0.01質量部以上であることがさらに好ましく、0.1質量部以上であることが一層好ましく、0.5質量部以上であることがより一層好ましく。また、ピリドキサール-5-リン酸が存在

する場合、ピリドキサルー５－リン酸の含有量（添加量）は、グルタミン酸１００質量部に対して、１５０質量部以下であることが好ましく、１００質量部以下であることがより好ましく、５０質量部以下であることがさらに好ましく、２０質量部以下であることが一層好ましく、１０質量部以下であることがより一層好ましく、５質量部以下であることがさらに一層好ましい。

[0039] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程において、ピリドキサルー５－リン酸が存在する場合、グルタミン酸又はその塩類を含む原料（基質）とピリドキサルー５－リン酸（補酵素）を混合して基質溶液を調製する工程と、基質溶液に上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を混合する工程を設けてもよい。また、グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程では、グルタミン酸又はその塩類を含む原料（基質）に上述した γ -アミノ酪酸生成用組成物とピリドキサルー５－リン酸（補酵素）を同時に添加して混合してもよい。

[0040] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に、 γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させるための反応時間、温度、反応溶液のpHなどは特に限定されるものではない。反応温度は、例えば１０～８０℃であることが好ましく、２０～６０℃であることがより好ましく、３０～７０℃であることがさらに好ましい。反応溶液のpHは、例えば２～８であることが好ましく、３～７であることがより好ましい。反応時間は、例えば１０分～７２時間であることが好ましく、３０分～４８時間であることがより好ましい。以上のような反応条件を採用することでグルタミン酸を高効率で γ -アミノ酪酸（GABA）に変換することが容易となる。尚、最適な反応条件は予備実験等を通して決定すればよい。

[0041] 本実施形態の γ -アミノ酪酸の製造方法は、例えば、以下の（１）及び（２）の工程を有することが好ましく、さらに、（３）及び／又は（４）の工程を有していてもよい。

- (1) グルタミン酸又はその塩類を含む原料を準備する工程
- (2) 上記原料に γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程
- (3) 酵素を失活させる工程
- (4) γ -アミノ酪酸を回収する工程

[0042] さらに、本実施形態の γ -アミノ酪酸の製造方法においては、(1)の工程の後であって、(3)の工程の前に、プロテアーゼを作用させる工程を含んでもよい。プロテアーゼとしては、上述したプロテアーゼを適宜用いることができる。本実施形態の γ -アミノ酪酸の製造方法はプロテアーゼを作用させる工程を含むことにより、グルタミン酸又はその塩類を含む原料から γ -アミノ酪酸をより高効率に生成することができる。

[0043] (3)の工程では、パイナップル抽出物に含まれるグルタミン酸脱炭酸酵素を失活する工程を含んでもよい。グルタミン酸脱炭酸酵素を失活する工程では、例えば、パイナップル抽出物で処理した原料を80℃以上に加熱する方法を採用することができる。

[0044] (4)の工程では、反応物をそのまま回収し、そのまま飲食品として利用することもできる。また反応物を遠心分離や珪藻土ろ過や膜ろ過、限外ろ過し、脱塩や夾雑物を除き、濃縮した後、回収してもよい。なお、回収した γ -アミノ酪酸を、液状、粉状、錠剤等にさらに加工してもよい。

[0045] 本実施形態は、上記製造方法を経て得られる γ -アミノ酪酸含有物や γ -アミノ酪酸含有食品に関するものであってもよい。このような γ -アミノ酪酸含有物や γ -アミノ酪酸含有食品には、 γ -アミノ酪酸が高濃度で含まれていてもよい。また、本実施形態の好ましい形態では、 γ -アミノ酪酸含有物や γ -アミノ酪酸含有食品はグルテンフリーの系で製造されるため、グルテンを実質的に含まず、また、アレルギーを含まない食品とすることができる。

実施例

[0046] 以下に実施例と比較例を挙げて本発明の特徴をさらに具体的に説明する。

以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明

の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例により限定的に解釈されるべきものではない。

[0047] (GABA生成活性測定方法)

基質溶液(終濃度30mM リン酸二水素カリウム緩衝液(pH5.5)、終濃度50mM L(+)-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物、終濃度0.05mM ピリドキサル-5-リン酸一水和物)500 μ Lに、適当な濃度に希釈したパイナップル抽出液を500 μ L混合し、37℃で10分静置し反応させた。反応後の溶液500 μ Lを分取し、500 μ Lのエタノールを混合して、12000rpmで10分間遠心分離した。遠心後の上清溶液を、メンブレンフィルターを用いてろ過し、適宜希釈して分析用サンプルとした。分析用サンプルについて、アミノ酸分析機器(Agilent社製HPLC)を用いて γ -アミノ酪酸の定量を行った。50mMのL(+)-グルタミン酸を基質とし、1分間に1 μ molの γ -アミノ酪酸を生成する酵素量を1Uと規定した。

[0048] (実施例1)

γ -アミノ酪酸生成用組成物として、乾燥パイナップル抽出物(天野エンザイム株式会社製)を用いた。乾燥パイナップル抽出物はパイナップルの茎からの抽出物を主に含むものであり、そのGABA生成活性値は乾燥パイナップル抽出物1gあたり1100Uであった。乾燥パイナップル抽出物を水で溶解し、11U/mLのパイナップル抽出液を調製した。

また、基質溶液(80mM リン酸二水素カリウム(和光純薬工業株式会社製)緩衝液(pH5.5)、5mM L(+)-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物(和光純薬工業株式会社製)及び0.05mM ピリドキサル-5-リン酸一水和物(和光純薬工業株式会社製))を調製した。

反応溶液中の終濃度がグルタミン酸1gあたり1700Uになるように調製したパイナップル抽出液100 μ Lと、900 μ Lの基質溶液(グルタミン酸 終濃度4.5mM、ピリドキサル-5-リン酸終濃度 0.045mM)を混合し、37℃で21時間静置し反応させた。反応後の溶液を、薄

層クロマトグラフィープレート（シリカゲル 60 F₂₅₄）に 2 μ L 滴下し、展開溶媒（酢酸エチル：酢酸：メタノール：水＝12：3：3：2（v／v／v／v））で展開し、ニンヒドリン溶液（ニンヒドリン：酢酸：エタノール＝0.3：3：100（w／v／v））で発色させ、 γ -アミノ酪酸の生成を確認した。

さらに、反応後の溶液を 500 μ L 分取し、500 μ L のエタノールを混合して、12000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後の上清溶液を、メンブレンフィルターを用いて MFろ過し、適宜希釈して分析用サンプルを調製して、アミノ酸分析機器（Agilent 社製 HPLC）で γ -アミノ酪酸の定量を行った。

[0049] ＜HPLC（逆相）分析条件＞

カラム：HPH-C18 2.7 μ m, 3.0×100mm（Poroshell II）

流速：0.65 mL／分

移動相：（A液）20mM Na₂HPO₄（pH 8.2）

（B液）メタノール：アセトニトリル：水＝45：45：10

[0050] [表1]

プログラム

0－0.35分	A液：B液＝96：4
0.35－13.4分	A液：B液＝43：57
13.4－15.7分	A液：B液＝0：100
15.7－18分	A液：B液＝96：4

[0051] ＜Glu→GABA変換率＞

HPLCで定量した、GABA（ γ -アミノ酪酸）濃度とGlu（グルタミン酸）濃度から、以下の式を用いて変換率を算出した。

[数2]

$$\text{変換率 (\%)} = \frac{[\text{GABA}]}{[\text{GABA}]_{\text{max}}} = \frac{[\text{GABA}] - [\text{GABA}]_{\text{cont.}}}{[\text{Glu}]_{\text{cont.}} \times \frac{103.1}{147.1}} \times 100$$

[0052] 上記式において、 $[GABA]$ は γ -アミノ酪酸の生成濃度、 $[GABA]_{max}$ は γ -アミノ酪酸の最大生成濃度、 $[GABA]_{cont.}$ は γ -アミノ酪酸生成用組成物（パイナップル抽出物）の添加なしの溶液の γ -アミノ酪酸の濃度、 $[Glu]_{cont.}$ は γ -アミノ酪酸生成用組成物（パイナップル抽出物）の添加なしの溶液のグルタミン酸の濃度、 103.1 は γ -アミノ酪酸の分子量、 147.1 はグルタミン酸の分子量を表す。

[0053] （実施例 2）

基質溶液に、ピリドキサル-5-リン酸を添加しなかった以外は、実施例 1 と同様の操作を行った。

[0054] （比較例 1）

パイナップル抽出液を混合しなかった以外は、実施例 1 と同様の操作を行った。

[0055] （比較例 2）

パイナップル抽出液を混合しなかった以外は、実施例 2 と同様の操作を行った。

[0056] （結果）

薄層クロマトグラフィーにおける γ -アミノ酪酸生成の分析結果を図 1 に示す。コントロールの結果より、グルタミン酸の上方に γ -アミノ酪酸（GABA）のスポットが現れることが示されている。上記試験例 1 においてパイナップル抽出液と基質溶液を混合して得られた反応後の溶液について、分析した結果、パイナップル抽出物（ γ -アミノ酪酸生成用組成物）とピリドキサル-5-リン酸（PLP）の存在下で、グルタミン酸は脱炭酸され、 γ -アミノ酪酸が生成していることが確認された。また、ピリドキサル-5-リン酸を添加しなくても、 γ -アミノ酪酸のスポットが確認された。なお、パイナップル抽出物（ γ -アミノ酪酸生成用組成物）を基質溶液と混合しなかったサンプルにおいては、ピリドキサル-5-リン酸（PLP）の存在下及び非存在下において γ -アミノ酪酸の生成は確認されなかった。

[0057]

[表2]

		PLP	γ -アミノ酪酸濃度 (mM)	Glu濃度 (mM)	γ -アミノ酪酸の変換率 (%)
実施例 1	γ -アミノ酪酸生成用組成物 (+)	+	4.26	0.06	100
実施例 2		-	1.61	3.29	47
比較例 1	γ -アミノ酪酸生成用組成物 (-)	+	0.00	4.81	0
比較例 2		-	0.00	4.93	0

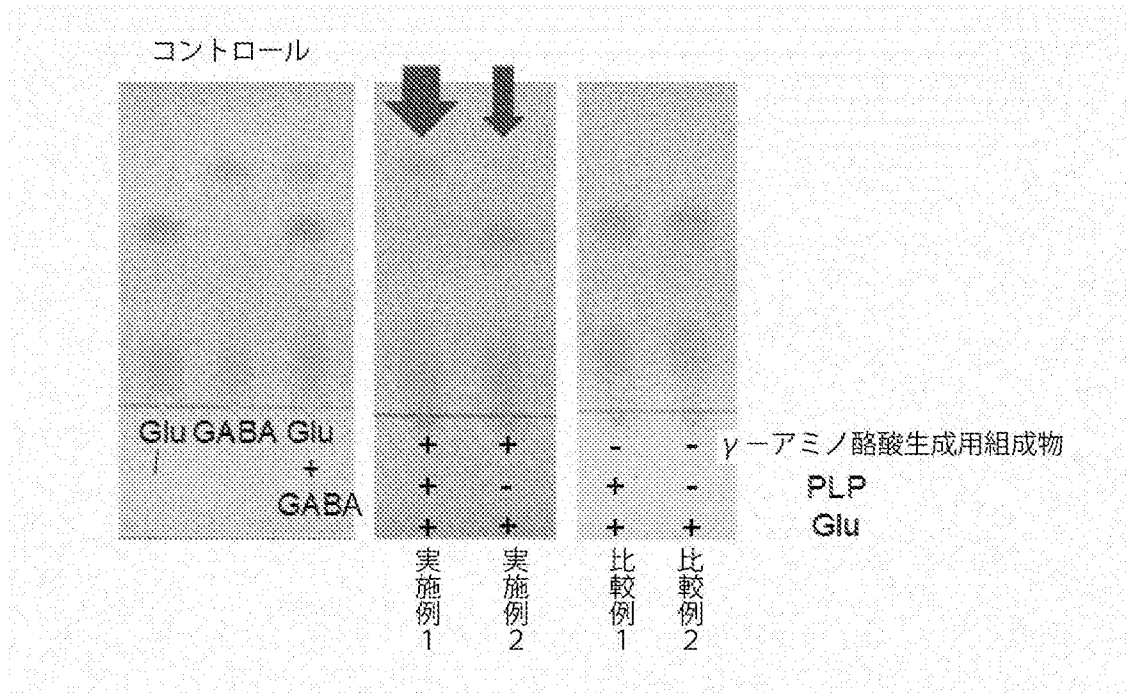
[0058] 表 1 は、生成した γ -アミノ酪酸の定量結果を示す。表 1 に示されているように、パイナップル抽出物を含有する γ -アミノ酪酸生成用組成物を基質溶液に混合することで γ -アミノ酪酸の生成量の増加が確認された。なお、 γ -アミノ酪酸の変換率は上記計算式で算出した。

[0059] なお、ピリドキサール-5-リン酸を添加した実施例 1 では、 γ -アミノ酪酸への変換率は 100%であるのに対し、ピリドキサール-5-リン酸を添加しなかった実施例 2 では、 γ -アミノ酪酸への変換率は 47%であった。この結果から、グルタミン酸脱炭酸酵素の補酵素であるピリドキサール-5-リン酸を添加しなくても、パイナップル抽出物を用いることで、約 50%の変換率で γ -アミノ酪酸が生成されることがわかった。

請求の範囲

- [請求項1] パイナップル抽出物を含有する γ -アミノ酪酸生成用組成物。
- [請求項2] γ -アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性がグルタミン酸1 gあたり1 U以上である、請求項1に記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物。
- [請求項3] プロテアーゼをさらに含有する、請求項1に記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物。
- [請求項4] 前記パイナップル抽出物が、パイナップルの非可食部抽出物である、請求項1に記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物。
- [請求項5] グルタミン酸又はその塩類を含む原料に請求項1～4のいずれか1項に記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含む、 γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項6] γ -アミノ酪酸生成用組成物のGABA生成酵素活性がグルタミン酸1 gあたり1 U以上である、請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] タンパク質含有原料に請求項1～4のいずれか1項に記載の γ -アミノ酪酸生成用組成物を作用させる工程を含む、 γ -アミノ酪酸含有組成物の製造方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/047149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P 13/00 (2006.01)i FI: C12P13/00 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) C12P13/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-143487 A (IKEDATOHKA INDUSTRIES CO., LTD.) 14 June 2007 (2007-06-14) example 2, table 2	1, 3-5
Y	example 2, table 2	2, 6, 7
X	JP 2002-300862 A (KIKKOMAN CORPORATION) 15 October 2002 (2002-10-15) claims 1-4, paragraph [0016], example 3, etc.	1-3, 5-7
Y	claims 1-4, paragraph [0016], example 3, etc.	2, 6, 7
☐ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 07 March 2024		Date of mailing of the international search report 19 March 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/047149

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2007-143487	A	14 June 2007	(Family: none)	
JP	2002-300862	A	15 October 2002	US 2002/0106424 A1 claims 1-4, paragraph [0021], example 3	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12P 13/00(2006.01)i

FI: C12P13/00

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（IPC））

C12P13/00

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 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024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 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (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	JP 2007-143487 A (池田糖化工業株式会社) 14.06.2007 (2007 - 06 - 14)	1, 3-5
Y	実施例 2、表 2	2, 6, 7
X	JP 2002-300862 A (キッコーマン株式会社) 15.10.2002 (2002 - 10 - 15)	1-3, 5-7
Y	請求項 1 - 4、段落0016, 実施例 3 等	2, 6, 7

☐ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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抵触するものではなく、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

07.03.2024

国際調査報告の発送日

19.03.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

北村 悠美子 4N 4501

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/047149

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2007-143487	A	14.06.2007	(ファミリーなし)	
JP	2002-300862	A	15.10.2002	US 2002/0106424 A1	
				claim 1-4, 0021, Example	
				3	