

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4456160号  
(P4456160)

(45) 発行日 平成22年4月28日(2010.4.28)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	1/20	(2006.01)	C 12 N	1/20	A
A 23 L	1/30	(2006.01)	C 12 N	1/20	E
A 61 K	35/74	(2006.01)	A 23 L	1/30	Z
A 61 P	1/14	(2006.01)	A 61 K	35/74	A
A 61 P	31/04	(2006.01)	A 61 P	1/14	

請求項の数 5 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2008-80121 (P2008-80121)

(22) 出願日

平成20年3月26日 (2008.3.26)

(65) 公開番号

特開2009-232702 (P2009-232702A)

(43) 公開日

平成21年10月15日 (2009.10.15)

審査請求日

平成21年12月10日 (2009.12.10)

微生物の受託番号 FERM BP-10896

早期審査対象出願

(73) 特許権者 504312667

株式会社フィス

神奈川県横浜市金沢区富岡西2-8-7-202

(74) 代理人 100086689

弁理士 松井 茂

(72) 発明者 藤本 義江

神奈川県横浜市金沢区富岡西7丁目43番3号

(72) 発明者 藤本 鐵美

神奈川県横浜市金沢区富岡西7丁目43番3号

(72) 発明者 鈴木 和人

東京都大田区北糀谷1-3-14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規乳酸菌株及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトバチルス ケフィリP-IF (Lactobacillus Kefiri P-IF) (受託番号FERM BP-10896)を培養して得られることを特徴とする培養物。

【請求項 2】

請求項1記載の培養物を有効成分として含有する抗菌剤。

【請求項 3】

請求項1記載の培養物を有効成分として含有する腸内環境改善剤。

【請求項 4】

請求項1記載の培養物を含有する飲食品。

【請求項 5】

ラクトバチルス ケフィリP-IF (Lactobacillus Kefiri P-IF) (受託番号FERM BP-10896)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌ラクトバチルス ケフィリの新菌株及びその利用に関するものである。

。

【背景技術】

【0002】

10

20

乳酸菌発酵産物であるヨーグルトなどには、バクテリオリオシンなどの抗菌物質が含まれていることが知られている。そして、その抗菌性により、腸内環境に悪い影響を与える腸内細菌の成長を抑制し、腸内環境に良い影響を与える腸内細菌の成長を促すものと考えられている。

【0003】

乳酸菌による腸内細菌に対する抗菌性については、下記特許文献1に、大腸菌(E. coli)O157:H7および他の病原菌の発生率および増殖を抑制するために、ラクトバチルスケフィリ等の乳酸生成バクテリアを、動物に投与することが記載されている。

【特許文献1】特表2006-501311号公報

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、上記特許文献1に記載の技術は、反芻動物の腸内病原菌の発生を抑えるための技術であり、必ずしもヒトの腸内環境改善等の健康増進に資するための技術ではなかった。

【0005】

したがって、本発明の目的は、ヒトの腸内環境改善等に有用であることが経験的に知られているケフィアグレインから、抗菌活性の高い新菌株を単離し、これを利用することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【0006】

本発明は下記のとおりである。

(1) ラクトバチルス ケフィリP-IF (Lactobacillus Kefiri P-IF) (受託番号FERM BP-10896)を培養して得られることを特徴とする培養物。

(2) 請求項1記載の培養物を有効成分として含有する抗菌剤。

(3) 請求項1記載の培養物を有効成分として含有する腸内環境改善剤。

(4) 請求項1記載の培養物を含有する飲食品。

(5) ラクトバチルス ケフィリP-IF (Lactobacillus Kefiri P-IF) (受託番号FERM BP-10896)。

【発明の効果】

30

【0007】

本発明の培養物によれば、腸内環境に悪い影響を与える腸内細菌の成長を抑制することができる。したがって、これを経口的に摂取することで、腸内環境改善等の健康増進を図ることができる。また、本発明の発酵食品によれば、腸内環境改善等の健康増進に資する飲食品を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、新規な乳酸菌株を見出したことに基づく。すなわち、その菌株は、ラクトバチルス ケフィリP-IF (Lactobacillus Kefiri P-IF) (受託番号: FERM BP-10896、寄託機関: 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 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)であり、以下、これを「P-IF菌」という。

40

【0009】

この「P-IF菌」は、ケフィアグレインから、MRS寒天培地で24時間培養後、シングルコロニーを釣菌することで、単離した。

【0010】

表1には、「P-IF菌」の菌学的性質を示す。

【0011】

【表1】

試験項目	「P-IF 菌」	
培養温度(°C)	30	
細胞形態	桿菌 (0.8-1.0×1.5-2.0 μm)	
グラム染色性	+	10
胞子の有無	-	
運動性	-	
コロニー形態	培地: MRS 寒天	
	培養時間: 48 hr	
	直径: 2.0-3.0 mm	
	色調: 乳白色	
	形: 円形	20
	隆起状態: レンズ状	
	周縁: 波状	
	表面の形状など: スムーズ	
	透明度: 不透明	
生育温度試験 (°C)	粘稠度: バター様	
	37	+
	45	-
		30
カタラーゼ反応	-	
オキシダーゼ反応	-	
グルコースからの酸/ガス產生 (酸產生/ガス產生)	+/-	
O/F テスト(酸化/発酵)	+/-	

【0012】

40

また、表2には、「P-IF菌」の資化特性を示す。

【0013】

【表2】

基質成分	資化性	基質成分	資化性	基質成分	資化性
コントロール	—	イノシトール	—	メレチトース	—
グリセロール	—	マンニトール	—	ラフィノース	—
エリスリトール	—	ソルビトール	—	でんぶん	—
D-アラビノース	—	$\alpha$ -メチル-D-マンノシド	—	グリコーゲン	—
L-アラビノース	+	$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	—	キシリトール	—
リボース	+	N-アセチルグルコサミン	—	ゲンチオビオース	—
D-キシロース	—	アミグダリン	—	D-ツラノース	—
L-キシロース	—	アルブチン	—	D-リキソース	—
アドニトール	—	エスクリン	—	D-タガトース	—
$\beta$ -メチル-D-キシロシド	—	サリシン	—	D-フコース	—
ガラクトース	+	セロビオース	—	L-フコース	—
グルコース	+	マルトース	+	D-アラビトール	—
フラクトース	+	ラクトース	+	L-アラビトール	—
マンノース	—	メリビオース	+	グルコネート	+
ソルボース	—	サッカロース	—	2-ケトグルコネート	—
ラムノース	—	トレハロース	—	5-ケトグルコネート	—
ズルシトール	—	イヌリン	—		

## 【0014】

「P-IF菌」の16S rDNAの塩基配列を決定し、微生物の16S rDNA塩基配列のデータベースを利用して相同解析したところ、*Lactobacillus Kefiri*の配列に99.6%の相同性を示したことから、「P-IF菌」は*Lactobacillus Kefiri*に属すると推定された。また、上記菌学的性質や資化特性も*Lactobacillus Kefiri*の特性と一致していた。

## 【0015】

ただし、ガラクトース資化性を有する点においては、従来の*Lactobacillus Kefiri*とは異なっていた。また、試験管で液体培養すると、その試験管に少しの振動を与えるだけで、シャンパンのように炭酸ガスが発生した。これも、従来の*Lactobacillus Kefiri*には見られない特徴であった。更に、図1に示すように、電子顕微鏡下に観察すると、通常では縦に平面的に分裂して伸びていくのに対して、「P-IF菌」では、他の菌と自由に接着して3次元的に分裂による増殖が進むという特徴を有していた。このことは、菌体表面の糖鎖などの構造が異なることを示唆していた。

## 【0016】

また、「P-IF菌」はMRS液体培地における発酵過程においてpH4.3の低いpHに達し、生育を続けることが明らかとなつてあり、このことから胃酸に耐性をもち、腸管まで生きたまま達する可能性が示唆された。

## 【0017】

以上から、「P-IF菌」は、*Lactobacillus Kefiri*に属する微生物であるが、形態的に独特の特徴を有する新菌株であることが明らかであった。

## 【0018】

「P-IF菌」の培養は、公知の方法に準じて行うことができる。市販のMRS培地「*Lactobacilli MRS Broth*」(商品名、Difco社製品)用いて、嫌気静置培養する。この培養により培地成分の発酵が進む。

## 【0019】

「P-IF菌」の培養においては、上記の培地等で前培養したものを種菌として、例えば、

10

20

30

40

50

脱脂粉乳、乳清、牛乳などを1質量%～50質量%となるようにイオン交換水に加えた培地を用いて、培地に播種して嫌気静置培養することもできる。

【0020】

本発明においては、上記のようにして発酵が進んだ培養物をそのまま殺菌処理しないで用いることもでき、殺菌処理して用いることもできる。もしくは、上記培養物から遠心分離やろ過等によって菌体部分を分離除去した溶液部分を、本発明の培養物とすることもできる。あるいは、その他の培養物としての態様が制限されるものではない。

【0021】

本発明の培養物を経口的に摂取する場合、その1日当りの摂取量に特に制限はないが、  
10 固形分換算で0.01(mg/kg体重)～10(g/kg体重)であることが好ましく、0.05(mg/kg体重)～1(g/kg体重)であることがより好ましい。

【0022】

本発明の培養物は、医薬品、健康食品、加工食品等の各種分野で用いることができる。そして、製剤的形態に特に制限はなく、適宜公知の方法で、液剤、シロップ剤、ゼリー剤、カプセル剤、散剤、錠剤、顆粒剤、トローチ剤等に製剤して使用することができる。また、本発明の培養物は、各種飲食品に配合して用いることができる。

【実施例】

【0023】

以下に例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの例は本発明の範囲を限定する  
20 ものではない。

【0024】

<例1> (「P-IF菌」の培養物の調製)

「P-IF菌」をM R S液体培地に植菌して、25で48～72時間、 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/mlに至るまで増菌させた。その後、その一部を脱脂乳培地(イオン交換水90質量部に脱脂粉乳を10質量部を添加、混合し、121/15分で滅菌して調製した培地)の3mlに植菌して、25、5日間嫌気静置培養し発酵させた。得られた培養物は、黄褐色をしたヨーグルト状の液体であった。

【0025】

<例2> (抗菌活性試験)

上記例1で得られた培養物の抗菌活性を調べた。具体的には、菌体をフィルター除去した培養物(250ml)に、同容のn-ブタノールを加え十分に混合し一晩静置した。次に遠心にてブタノール層と水層に分けそれを回収した。その後ブタノール層を減圧下で濃縮・乾固させた。これを少量の脱イオン水に溶解させ遠心上清を得、分画分子量1kDaの透析チューブにて脱イオン水に対して透析を行なった。透析外液を回収し減圧下で濃縮し、凍結乾燥した、このものを1k以下画分とした。透析内液は遠心にて清澄化した後、凍結乾燥し1k以上画分とした。水層画分は減圧下で濃縮し、凍結乾燥した。

【0026】

対照として、従来のケフィリ菌: *Lactobacillus Kefiri*菌(NBRC 15888; 公共分譲機関である独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門から入手可能)を用いて、上記例1と同様にして培養物を得、その菌体をフィルター除去したものの水溶性画分、1k以上のn-ブタノール画分、1k以下のn-ブタノール画分のそれぞれについて、その凍結乾燥物を調製した。

【0027】

各被検試料を10mg/mlになるように脱イオン水に溶解させ、1/10Nの乳酸にてpHを4.5に調整し、ADVANTEC社製ペーパーディスク(8mm)に25及び50μl吸収させた。

【0028】

一方、ヒト糞便の一部を滅菌生理的食塩水で希釈しGAMブイヨン(日本製薬社製)を用いて、簡易嫌気培養ジャー「アネロパックケンキ」(商品名、三菱ガス化学社製)にて嫌気培養した。24時間後、GAMブイヨンより少量をシャーレにとり、プレートカウントアガーパー地(Merck社製)を加えて混ぜる混ぜ法によりプレートを作成した。

10

20

30

40

50

## 【0029】

ヒト糞便からの菌を含む寒天平板培地に、各被検試料を吸収させたペーパーディスクをのせ、35℃、24時間培養を行い阻止円を観察した。その結果を表3に示す。

## 【0030】

## 【表3】

試料	阻止円の程度		
	水溶性画分	n-ブタノール画分	
		1kDa 以上	1kDa 以下
P-IF 菌株	+++ (25 μl)	++ (25 μl)	++ (25 μl)
	+++ (50 μl)	+++ (50 μl)	+++ (50 μl)
ケフィリ菌株	+ (25 μl)	+ (25 μl)	- (25 μl)
	++ (50 μl)	++ (50 μl)	++ (50 μl)

括弧内はディスクに吸収させた量

-:陰性

+:弱陽性(輪郭が明瞭な阻止円で Disc のφ8mm を含む阻止円のφが 10mm 以下)

++:陽性(輪郭が明瞭な阻止円で Disc のφ8mm を含む阻止円のφが 10mm 以上 15mm 以下)

+++:強陽性(輪郭が明瞭な阻止円で Disc のφ8mm を含む阻止円のφが 15mm 以上)

## 【0031】

表3に示すように、「P-IF菌」の各画分には強い抗菌活性が認められた。一方、従来のケフィリ菌の各画分にも抗菌活性が認められたがその強さは全ての画分に於いて「P-IF菌」のものより弱かった。

## 【0032】

今回試験に用いたヒト糞便由来の菌は腸内細菌の嫌気性菌叢であり、悪玉菌と言われているクロストリジウム属微生物が含まれている。「P-IF菌」の培養物はこれらの菌叢に対して強い抗菌効果を示したことから、より優れた腸内環境改善作用を有するものと考えられた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0033】

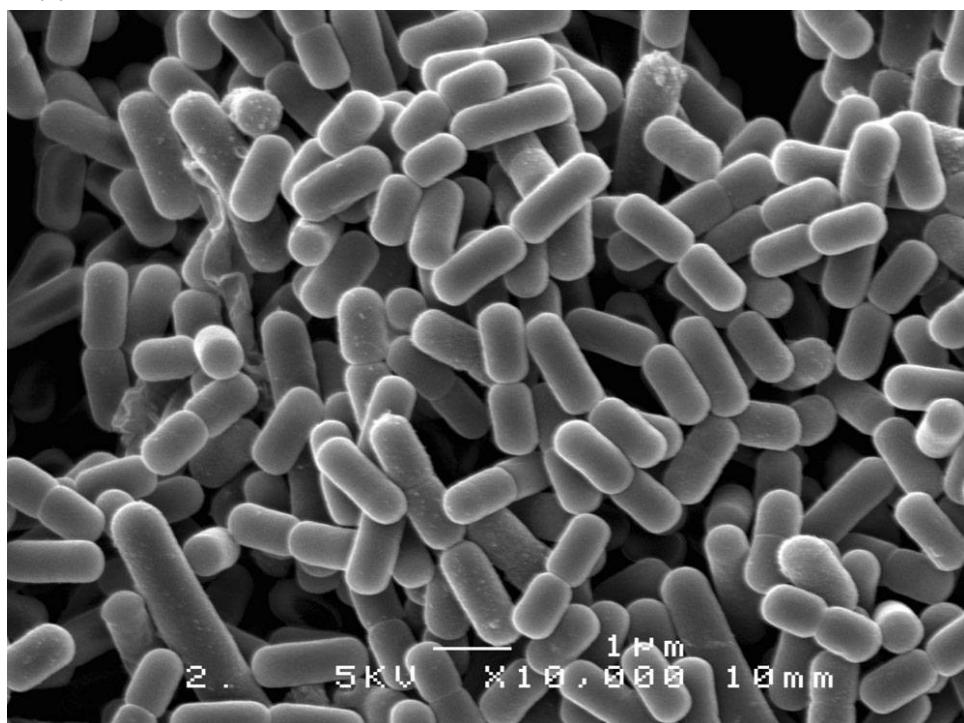
【図1】「P-IF菌」の電子顕微鏡写真を示す図である。

10

20

30

【図1】



---

フロントページの続き

## (51)Int.Cl.

C 1 2 R 1/225 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 31/04

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 R 1:225

C 1 2 N 1/20

E

C 1 2 R 1:225

## (72)発明者 吉田 百合子

神奈川県横須賀市浦郷町4丁目12番13-506

審査官 水落 登希子

## (56)参考文献 特開2005-312424 (JP, A)

特表2006-501311 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1/00-7/08

A 2 3 L 1/30

A 6 1 P 1/00-33/14

A 6 1 K 35/00-35/84

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamII)

BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)