

(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2010-11847

(P2010-11847A)

(43) 公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 2 3 L 1/08 (2006.01)		A 2 3 L 1/08		4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30 (2006.01)		A 2 3 L 1/30	A	4 B 0 4 1
A 6 1 K 35/64 (2006.01)		A 6 1 K 35/64		4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/12 (2006.01)		A 6 1 P 9/12		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)				

(21) 出願番号	特願2009-134693 (P2009-134693)	(71) 出願人	592207809
(22) 出願日	平成21年6月4日 (2009.6.4)		森川健康堂株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2008-147168 (P2008-147168)		熊本県上益城郡甲佐町大字田口2 1 7 0番地
(32) 優先日	平成20年6月4日 (2008.6.4)	(74) 代理人	100088904
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453
			弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀
		(72) 発明者	三浦 雅博
			熊本県上益城郡甲佐町田口2 1 7 0番地
			森川健康堂株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法

(57) 【要約】

【課題】従来法で得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーより高い血圧降下作用を有し、さらに血圧降下作用以外の有用な特性を発揮するローヤルゼリーを得ることのできる技術を提供すること。

【解決手段】ローヤルゼリーをパエニバチルス ポリミキサ (Paenibacillus polymyxa) で発酵させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、並びに該製造方法によって得られる血圧降下作用、具体的にはアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物および血圧降下剤を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

パエニバチルス ポリミキサ (Paenibacillus polymyxa) を培養する工程および、前記培養する工程で得られたパエニバチルス ポリミキサでローヤルゼリーを発酵させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法。

【請求項 2】

少なくともマンガン塩を含有させて、パエニバチルス ポリミキサを培養することを特徴とする請求項1に記載のローヤルゼリーの製造方法。

【請求項 3】

発酵工程の後に、微生物を殺菌する工程を含むことを特徴とする、請求項1または2に記載のローヤルゼリーの製造方法。

10

【請求項 4】

血圧降下作用を有するローヤルゼリーがアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有することを特徴とする、請求項1~3のいずれか1に記載のローヤルゼリーの製造方法。

【請求項 5】

請求項1~4のいずれかの方法によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーを含有することを特徴とする、ローヤルゼリー組成物。

【請求項 6】

請求項1~4のいずれかの方法によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーを有効成分として含有することを特徴とする、血圧降下剤。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、並びに、該方法によって得られるローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物および血圧降下剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

ローヤルゼリーとは、若い働き蜂の咽頭腺により分泌される乳白色したペースト状物質であり、その成分は必須アミノ酸をはじめとするアミノ酸が豊富に含まれ良質なタンパク質などから構成されている。さらに、ビタミン類、ミネラル類、炭水化物などの微量成分を含んでいる。例えばビタミン類ではビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ナイアシン、成長促進や老化防止に効果のあるパントテン酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEなどが挙げられる。ミネラル類ではカリウム、マグネシウム、カルシウム、銅、鉄、リンなどが挙げられる。炭水化物ではブドウ糖、果糖などが挙げられる。さらに、アセチルコリン様物質、有機酸 (10 - ヒドロキシデセン酸など)、脂肪、タンパク質性の抗菌物質であるロイアリシンなどが含まれている。

30

【0003】

このようにローヤルゼリーは様々な栄養成分を含んでおり、例えば、抗菌作用、免疫増強作用、抗炎症作用、老化防止作用、更年期障害の予防・治療作用、抗がん作用など数多くの効果が知られている。

40

【0004】

一方、生活習慣病の中でも高血圧患者数は我が国では30歳以上で2000万人と推定され、高血圧は現在の国民病ともいわれる側面をもっている。高血圧は各種慢性疾患に対するリスクファクターとなり、脳血管障害、心筋梗塞などの血管障害を誘発することが知られている。今後ますます高齢化が進むにつれ、高血圧症者も増大することが予想され、高血圧の改善あるいは発症の予防が課題となっている (非特許文献1)。

【0005】

アンジオテンシン変換酵素 (以下ACEと略することがある) はアンジオテンシンIを血圧上昇物質であるアンジオテンシンIIに変換し、血圧降下作用をもつブラジキニンを分解するため血圧を上昇させる働きがある。したがってACEを阻害する物質 (ACE阻害物質) があ

50

れば血圧を下げることができ、高血圧症予防又は治療に効果があることが期待される。

ACE活性を抑制させることにより血圧を降下させるACE阻害物質として、例えば、カプトプリルが開発され医薬品として利用されている。

【0006】

一方、食品分野においては、乳カゼイン（非特許文献2）、わかめタンパク質（特許文献1、非特許文献3）、かつお節（非特許文献4、非特許文献5）、イワシ（非特許文献6）などの酵素分解物、発酵乳（非特許文献7）、ブナハリタケエキス（非特許文献8）などACE阻害物質を含む食品が数多く市販されている。

【0007】

近年では動物の消化酵素であるトリプシンや枯草菌（*Bacillus subtilis*）などの微生物由来のタンパク質分解酵素を用いてローヤルゼリーを加水分解することによりACE阻害物質を得る試みがなされている（特許文献2、特許文献3、非特許文献9）。さらに、枯草菌由来のタンパク質分解酵素を用いてローヤルゼリーを加水分解した際の血圧降下の関与成分としてはイソロイシン - チロシン、バリン - チロシンおよびイソロイシン - バリン - チロシンなどのペプチドが知られている（非特許文献10）。しかし、ローヤルゼリーの消化に用いるトリプシンは動物由来の消化酵素であり、トリプシンで加水分解したローヤルゼリーは動物由来の感染性物質の混入を完全に否定することは困難であるという問題があり、より安全なローヤルゼリー由来のACE阻害物質が望まれている。また、タンパク質分解酵素により生産されるものはローヤルゼリーが加水分解されたペプチドであり、それ以外の有用産物の生産は見込めず、食品の高付加価値化は期待できない。

10

20

【0008】

さらに、ローヤルゼリーに麹菌を添加して発酵させることにより、ACE阻害作用を有するローヤルゼリーを製造する方法が報告されている（特許文献4）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2002-138100号公報

【特許文献2】特開平4-279597号公報

【特許文献3】特開2006-28065号公報

【特許文献4】特開2008-48729号公報

30

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】藤田裕之 他、薬理と治療 第25巻（8号）、147（2155） - 151（2159）（1997）

【非特許文献2】Maruyama S., Agr. Biol. Chem., 51, 1581 (1987)

【非特許文献3】Health Sciences, 20, 82-90 (2004)

【非特許文献4】Yokoyama K., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1541 (1992)

【非特許文献5】Fujita H. et al., J. Food Sci., 65, 564 (2000)

【非特許文献6】関英治 他、日本農芸化学会誌 第69巻（8号）、1013 - 1020（1995）

【非特許文献7】Yamamoto N. et al., J Dairy Sci, 77, 917-922 (1994)

40

【非特許文献8】坂元雄二 他、応用薬理 第61巻（4/5）、221 - 229（2001）

【非特許文献9】丸山広恵 他、日本食品科学工学会誌 第50巻（7号）、310 - 315（2003）

【非特許文献10】Tokunaga K. et al., Bio. Pharm. Bull., 27 (2), 189-192 (2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、従来法で得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーより高い血圧降下作用を有し、さらに血圧降下作用以外の有用な特性を発揮するローヤルゼリーを得ることのできる技術を提供することを目的とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは鋭意検討を行った結果、ローヤルゼリーには抗菌物質である10-ヒドロキシデセン酸やロイアリシンが含まれているにもかかわらず、ローヤルゼリーをパエニバチルス ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) で発酵することにより、前記課題が解決できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0013】

すなわち本発明は、

1. パエニバチルス ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) を培養する工程および、前記培養する工程で得られたパエニバチルス ポリミキサでローヤルゼリーを発酵させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、 10
2. 少なくともマンガン塩を含有させて、パエニバチルス ポリミキサを培養することを特徴とする前記ローヤルゼリーの製造方法、
3. 発酵工程の後に、微生物を殺菌する工程を含むことを特徴とする、前記いずれかのローヤルゼリーの製造方法、
4. 血圧降下作用を有するローヤルゼリーがアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有することを特徴とする、前記いずれかのローヤルゼリーの製造方法、
5. 前記いずれかの方法によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーを含有することを特徴とする、ローヤルゼリー組成物、
6. 前記いずれかの方法によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーを有効成分 20
として含有することを特徴とする、血圧降下剤、
からなる。

【発明の効果】

【0014】

本発明によると従来法と比較してより安全で簡便な方法により高い血圧降下作用を有するローヤルゼリーを製造することができ、この血圧降下作用を有するローヤルゼリーを利用して、ローヤルゼリー組成物や血圧降下剤を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明に係る血圧降下作用を有するローヤルゼリーは、パエニバチルス ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) を培養する工程および前記培養する工程で得られたパエニバチルス ポリミキサでローヤルゼリーを発酵させる工程により製造される。パエニバチルス ポリミキサはタンパク質分解酵素を産生するため、パエニバチルス ポリミキサでローヤルゼリーを発酵させると、ローヤルゼリーが該タンパク質分解酵素により加水分解され、その結果、血圧降下の関与成分であるACE阻害物質が産生される。 30

【0016】

パエニバチルス ポリミキサは、バチルス ポリミキサ (*Bacillus polymyxa*) と呼ばれ、固体培地または液体培地で培養したものをを用いることができるが、液体培地で培養したものが好ましい。液体培養したパエニバチルス ポリミキサをローヤルゼリーと混合する場合、滅菌水、滅菌した生理的食塩水または滅菌した緩衝液などで菌体を洗浄し培養液を除去してもよい。さらに、菌体を洗浄した場合、ガラスフィルター等で菌体より余分な水分を除去した後、ローヤルゼリーと混合してもよいし、洗浄した菌体を再度、滅菌水、滅菌した生理的食塩水または滅菌した緩衝液に懸濁してローヤルゼリーと混合してもよい。あるいは、液体培養終了後、上記のような洗浄を行わず、菌体と培養液の混合液をローヤルゼリーと混合してもよく、菌体と培養液の混合液をローヤルゼリーと混合し、発酵を行うのが好ましい。 40

【0017】

パエニバチルス ポリミキサの培養の条件はパエニバチルス ポリミキサがタンパク質分解酵素を産生する条件であれば特に制限はなく、適宜条件を選択できる。

例えば、培地のpHはパエニバチルス ポリミキサがタンパク質分解酵素を産生するpHで 50

あれば特に限定されないが、pH6～10、好ましくはpH7～9、さらに好ましくはpH7～8を挙げることができる。

また、培養温度はパエニバチルス ポリミキサがタンパク質分解酵素を産生する温度であれば特に限定されないが、5～40、好ましくは20～35の培養温度を挙げることができる。

【0018】

さらに、パエニバチルス ポリミキサの培養方法は静置培養、振とう培養、攪拌培養、通気攪拌培養などの培養方法で培養することができ、好ましくは攪拌培養または通気攪拌培養のように好氣的な条件で培養するのが好ましい。

培地成分として例えば、炭素源としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、スクロース、フラクトース、マンニトール、ソルビトール、グリセリン、エチレングリコール、澱粉、糖蜜、コーン・ステープ・リカー、麦芽エキス、澱粉水解物などを単独または二種以上混合したものを例示できる。窒素源としては、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機性窒素源や、ペプトン、大豆粉、大豆ペプトン、肉エキス、カゼイン、カザミノ酸、尿素などの有機性窒素源を単独または二種以上混合したものを例示できる。また、培地には必要に応じて、アミノ酸、各種ビタミン、酵母エキス、粉末酵母、脂肪酸などの有機微量栄養素を含有させてもよい。

【0019】

パエニバチルス ポリミキサの培養にはカルシウム塩、リン酸塩、カリウム塩、鉄塩、マンガン塩、マグネシウム塩、その他の金属塩などの無機塩類を単独または二種以上併用して用いることができる。マンガン塩を含有させて培養することにより培養工程でタンパク質分解酵素が効率よく産生される。したがって、パエニバチルス ポリミキサはマンガン塩を含有させて培養することが好ましい。マンガン塩としては、パエニバチルス ポリミキサのタンパク質分解酵素を効率よく産生させ得るものであればよく、硫酸マンガン、塩化マンガン、酢酸マンガン、硝酸マンガン、リン酸マンガン、蔞酸マンガン等の水溶性の無機マンガン塩やマンガンを含む酵母エキス、粉末酵母、ビール酵母、マンガン酵母などが例示され、中でも硫酸マンガン、酵母エキス、粉末酵母、ビール酵母、マンガン酵母が好ましい。マンガン塩の濃度は、パエニバチルス ポリミキサのタンパク質分解酵素を効率よく産生させ得る濃度であればよく、例えば無機マンガン塩であれば、0.001～0.5W/V%程度であることが好ましい。また、無機塩の代わりに金属塩を含む酵母粉末などを用いてもよい。

【0020】

ローヤルゼリーの原産国は例えば日本、中国、台湾、タイ、ブラジル、ヨーロッパ諸国、オセアニア諸国、アメリカなどを挙げることができ、いずれの原産国のローヤルゼリーを用いてもよい。また、複数の原産国のローヤルゼリーを適宜混合して用いてもよい。ローヤルゼリーは液体であることが好ましく、凍結乾燥状態のローヤルゼリーを用いる場合は精製水、水道水または適当な緩衝液などで溶解して用いることができる。また、凍結状態のローヤルゼリーは融解して用いることができる。

【0021】

さらに、ローヤルゼリーは加熱、遠心分離、アルコール抽出、ろ過、フリーズドライまたは熱風乾燥などの加工並びに各種栄養素などが添加されたものであってもよい。

【0022】

パエニバチルス ポリミキサは単独で使用してもよく、パエニバチルス ポリミキサ以外の他の微生物を組み合わせてもよい。

【0023】

パエニバチルス ポリミキサとローヤルゼリーを混合する場合、必要な菌体量を一度にローヤルゼリーと混合してもよいし、必要な菌体量を2回以上に分けて混合してもよい。また、パエニバチルス ポリミキサと他の微生物を使用する場合、それぞれの微生物を同時にローヤルゼリーと混合してもよく、別々に分けてローヤルゼリーと混合してもよい。

【0024】

10

20

30

40

50

パエニバチルス ポリミキサと混合した後のローヤルゼリーの固形分濃度は、0.1～30W/W%を挙げることができ、好ましくは5～20W/W%を挙げることができる。ここで、例えば10W/W%は、100gのローヤルゼリー混合物を凍結乾燥などにより乾燥させたとき10gの乾燥品が得られることを意味している。

【0025】

パエニバチルス ポリミキサとローヤルゼリーを混合し発酵する時間は目的とする血圧降下物質が産生する時間であれば特に限定されないが、半日～10日間、好ましくは半日～4日間が好ましい。

【0026】

また、微生物とローヤルゼリーを混合する際のローヤルゼリーのpHは目的とする血圧降下物質が産生するpHであれば特に限定されないが、pH3～8、好ましくはpH4～6が好ましい。

10

【0027】

パエニバチルス ポリミキサとローヤルゼリーを混合し発酵させている間の温度は血圧降下物質が産生する温度であれば特に限定されないが、5～50℃、好ましくは20～45℃が好ましい。

【0028】

パエニバチルス ポリミキサとローヤルゼリーを混合し発酵させている間は、静置、振とう、攪拌、通気攪拌などを行ってもよい。

【0029】

ローヤルゼリーに炭素源、窒素源、有機微量栄養素、無機塩類、脂質類などを単独または二種以上を添加してもよい。例えば炭素源としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、スクロース、フラクトース、マンニトール、ソルビトール、グリセリン、エチレングリコール、澱粉、糖蜜、コーン・ステープ・リカー、麦芽エキス、澱粉水解物などを単独または二種以上混合したものを例示できる。窒素源としては、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機性窒素源や、ペプトン、大豆粉、大豆ペプトン、肉エキス、カゼイン、カザミノ酸、尿素などの有機性窒素源を単独または二種以上混合したものを例示できる。また、培地には必要に応じて、アミノ酸、各種ビタミン、酵母エキス、粉末酵母、脂肪酸などの有機微量栄養素を含有させてもよい。

20

【0030】

また、ローヤルゼリーにカルシウム塩、リン酸塩、カリウム塩、鉄塩、マンガン塩、マグネシウム塩、その他の金属塩などの無機塩類をそれぞれ単独または二種以上併用して添加することができる。また、金属塩を含有する酵母粉末などを用いてもよい。

30

【0031】

本明細書で用いる発酵の意味は、微生物とローヤルゼリーとを混合することにより血圧降下作用を有するローヤルゼリーが産生されればよく、微生物とローヤルゼリーの混合物中で該微生物が増殖してもしなくてもよい。本発明によって得られる血圧降下性ローヤルゼリーは、重要な特徴の一つとしてACE阻害作用を発揮する。血圧降下性ローヤルゼリーとは、血圧降下作用を有するローヤルゼリーのことをいう。

【0032】

ローヤルゼリーを発酵させることにより、ACE阻害作用の他に種々の有用性の向上が期待される。上記のようにACE阻害物質の生産の他に、抗酸化物質、モナコリンK、 γ -アミノ酪酸(GABA)、コリン(アセチルコリンの前駆体)などの生産や免疫賦活化が見込まれる。これらの効果としては、抗酸化物質は血流改善、モナコリンKは血中コレステロールの低下、GABAは血圧降下、コリンは血圧降下および動脈硬化予防などが期待される。

40

【0033】

ローヤルゼリーをパエニバチルス ポリミキサで発酵させることにより、ローヤルゼリーを麹菌、例えばアスペルギルス属、モナスカス属またはリゾプス属の麹菌で発酵させたときと比較して高いACE阻害活性を有するローヤルゼリーが産生される。

【0034】

50

本発明に従う血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造においては、一般に、如上の発酵工程の後に微生物を殺菌する工程を含む。微生物とローヤルゼリーの発酵液の殺菌方法は、微生物が食品として問題がない程度に殺菌されればよい。殺菌方法としては、加熱により殺菌する方法、薬剤を用いて殺菌する方法、ろ過により微生物を除菌する方法、遠心分離を用いて微生物を除菌する方法が例示でき、これら方法を単独で用いてもよいし、二種類以上を組み合わせてもよい。好ましくは、加熱により微生物を殺菌する。加熱温度は60 以上、好ましくは80 以上、より好ましくは90 以上で加熱することが好ましい。

【0035】

本発明に係るローヤルゼリーを各種クロマトグラフィーを用いて処理することにより、ACE阻害物質を精製してもよい。精製方法としてはゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、限外ろ過、電気泳動などを挙げるができる。これらは単独で若しくは組み合わせて精製に使用できる。

10

【0036】

ゲルろ過クロマトグラフィーは、種々な分子量のタンパク質を分離できるゲルろ過クロマトグラフィー用の担体があり、分子量が約1万以下のタンパク質を分離できるゲルろ過クロマトグラフィー用の担体が好ましい。イオン交換クロマトグラフィーに用いられているイオン交換基としては、陰イオン交換体、陽イオン交換体などがあり、陰イオン交換体としては、ジエチルアミノエチル基（DEAE基）、四級アミノエチル基（QAE）などを例示することができる。また、陽イオン交換体としては、カルボキシメチル（CM）基、スルホプロピル（SP）基を例示することができる。疎水クロマトグラフィーに用いられる担体としてはブチル基（Butyl基）、エチル基（Ethyl基）、フェニル基（Phenyl基）が結合した担体を例示することができる。逆相クロマトグラフィーに用いられる担体としてはオクタデシル基（C18）、オクタデシル基とはアルキル基の長さが異なるC30、C8、C4などが結合した担体が例示される。順相クロマトグラフィーに用いられる担体としてはシリカゲルのほか、シアノプロピル基、ジオール構造を有する官能基、アミノプロピル基、ポリアミンなどが結合した担体が例示される。

20

【0037】

本発明に係る血圧降下作用を有するローヤルゼリーは、上記のクロマトグラフィーなどを用いて精製を行なうことにより血圧降下剤として利用することができる。また、本発明に係る血圧降下性ローヤルゼリーまたはその精製品に各種成分を添加することによりローヤルゼリー組成物として供することができる。各種成分としては、例えば食品、糖、脂質、乳化剤、増粘剤、調味料、香料、酸味調整剤、保存料、果汁、香料、各種栄養成分などが挙げられ、本発明に係るローヤルゼリーの効果を損なわない範囲で使用することができる。また、各種成分は単独で用いてもよいし二種以上を混合して用いてもよい。例えば糖としては、蔗糖、異性化糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロースなどを例示することができる。乳化剤としては、蔗糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、レシチンなどを例示することができる。増粘剤としてはカラギーナン、アラビアガム、キサンタンガム、グァーガム、ペクチン、ローカストビーンガム増粘剤澱粉、ジェランガムなどを例示することができる。酸味調整剤としては、クエン酸、乳酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、酒石酸などを例示することができる。保存料としては、安息香酸及びその塩、ソルビン酸及びその塩、パラベン、亜硫酸ナトリウム、ペクチン分解物、グリシンなどを例示することができる。果汁としては、トマト果汁、梅果汁、リンゴ果汁、レモン果汁、オレンジ果汁、ベリー系果汁などを例示することができる。香料としては、ハーブ、スパイスなどの香辛料、フルーツ系香料、バニラなどの香料などを例示することができる。この他、好ましい他の栄養成分として、ビタミンDなどのビタミン類やカルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、亜鉛などのミネラル類などが挙げられる。

30

40

【0038】

本発明によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリー、ローヤルゼリー組成物

50

または血圧降下剤はそれらを添加・配合して調製した食品として供することもできる。そのような食品の具体的形態としては、例えば、飲料類、菓子、キャンディ、ガム、パン、畜肉製品、乳製品、レトルト食品、即席食品、冷凍食品、ゼリー状食品、養蜂産品、漬物、調味料などを挙げることができる。これらの食品は、いわゆる健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養機能食品、栄養補助食品、サプリメントなどとしても有用である。また、それらの食品としての形状としては、顆粒、粉末、タブレット、カプセル、チュアブル、ドリンク、ゼリー、ペースト、粒などを挙げることができる。

【 0 0 3 9 】

以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 4 0 】

パエニバチルス ポリミキサの培養を行い、培養液を得た。具体的には、栄研器材株式会社製パールコア（登録商標）標準寒天培地を使用方法に従い調製した平板培地に、パエニバチルス ポリミキサATCC842（以下ATCC842ということがある）を一白金耳植菌し、30で一晩培養を行い、平板培養したATCC842を得た。次いで、300mL容バッフル付き三角フラスコに2.2W/V% グルコース、0.3W/V% 大豆ペプチド、0.5W/V% ビール酵母（マンガ含有）、0.1W/V% リン酸二水素一カリウム、0.04W/V% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.04W/V% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH8.0からなる液体培地を100mL添加し、シリコ栓（登録商標）をして、121で15分オートクレーブ滅菌を行った液体培地に、上記平板培養したATCC842を一白金耳植菌し、30、140rpmで2日間培養を行い培養液を得た。

【 0 0 4 1 】

次に、30W/W% ロイヤルゼリーを精製水で2倍希釈し、10N NaOHでpH8.0に調整したロイヤルゼリー希釈液を調製した。

【 0 0 4 2 】

滅菌した300mL容バッフル付き三角フラスコにロイヤルゼリー希釈液80mLおよび前記培養液20mLを混合し、滅菌したシリコ栓（登録商標）をして45、140rpmで1日間発酵を行った。発酵終了後のロイヤルゼリーを沸騰水中で20分間加熱を行った。その後遠心分離（10,000rpm×10分）を行い、上清を42倍希釈してACE阻害活性を後述する方法により測定した。

【 0 0 4 3 】

また、前記培養液の一部を遠心分離処理（10,000rpm×10分）し、上清を40倍希釈して、後述する方法でタンパク質分解酵素活性測定を行った。

【 0 0 4 4 】

その結果、前記培養液のタンパク質分解酵素活性は、 ΔA_{660} で表わすと0.781であった。

【 0 0 4 5 】

また、発酵終了後のロイヤルゼリーのACE阻害活性は41.7%であった。このようにパエニバチルス ポリミキサでロイヤルゼリーを発酵させるとACE阻害物質が産生されることが判明した。

【 0 0 4 6 】

以下に、本実施例で使用したACE阻害活性測定方法およびタンパク質分解酵素活性測定方法を説明する。

[ACE阻害活性測定方法]

< ホウ酸緩衝液の調製 >

50mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 450mLと220mM H_3BO_4 550mLを混合し、pH8.3のホウ酸緩衝液を調製した。

< 基質溶液の調製 >

約30mLのホウ酸緩衝液にBz-Gly-His-Leu・ H_2O （分子量447.49 ペプチド研究所社製）170mg、NaCl 1.78gを溶解後、1N NaOHでpH8.3に調整し、ホウ酸緩衝液で50mLにメスアッ

10

20

30

40

50

ブして、基質溶液とした。

< ACE溶液の調製 >

アンギオテンシン変換酵素（ウサギ肺由来 シグマ社製）をホウ酸緩衝液で溶解して60 mU/mLの溶液をACE溶液とした。

< ACE阻害活性の測定方法 >

（１）阻害活性の測定

サンプル30 μ Lと基質溶液250 μ Lを混合し、37 $^{\circ}$ Cで5分間放置した。5分間放置した後、ACE溶液を100 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応後、1N HClを250 μ L添加し、反応を停止させた。反応停止後1.5mLの酢酸エチルを添加し、激しく1分間攪拌した。次に3,000rpmで10分間遠心分離を行い上層の酢酸エチル層を0.5mL分取し、遠心エバポレーター（40 $^{\circ}$ C、1.5時間）で蒸発乾固させた。蒸発乾固させたものに2mLの精製水を加え、溶解後、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をAとする。

（２）ブランクの測定

サンプル30 μ Lおよび基質溶液250 μ Lを混合し、37 $^{\circ}$ Cで35分間放置した。35分間放置した後、1N HCl 250 μ Lを添加しその後、ACE溶液を100 μ L添加した。さらに、1.5mLの酢酸エチルを添加し、激しく1分間攪拌した。次に3,000rpmで10分間遠心分離を行い上層の酢酸エチル層を0.5mL分取し、遠心エバポレーター（40 $^{\circ}$ C、1.5時間）で蒸発乾固させた。蒸発乾固させたものに2mLの精製水を加え、溶解後、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をBとする。

（３）コントロールの測定

前記（１）阻害活性の測定でサンプルの代わりにホウ酸緩衝液を用いて同様に操作を行い、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をCとする。さらに、前記（２）ブランクの測定でサンプルの代わりにホウ酸緩衝液を用いて同様に操作を行い、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をDとする。

（４）計算

下式によりACE阻害活性を求めた。

$$\text{ACE残存活性}(\%) = (A - B) \times 100 / (C - D)$$

$$\text{ACE阻害活性}(\%) = 100 - \text{ACE残存活性}(\%)$$

【 0 0 4 7 】

[タンパク質分解酵素活性測定法]

（１）基質溶液の調製

75mLの100mM ビス - トリスプロパン緩衝液（pH7.0）に0.6gのカゼイン（ハマルステイン処方）を懸濁させ、沸騰水中で加熱溶解した。放冷後、pHを7.0に調整し、100mLにメスアップして、基質溶液とした。

（２）タンパク質分解酵素活性の測定

2mLの基質溶液を37 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、サンプルを0.4mL添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応後、0.44M トリクロロ酢酸溶液を2mL添加し、反応を停止させた。反応停止後10分間室温に放置して、No2のろ紙（アドバンテック東洋）でろ過を行った。ろ液0.5mLに0.55M Na_2CO_3 溶液1.25mLおよび精製水で3倍希釈したフェノール試薬0.25mLを添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間放置後660nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をAとする。

（３）ブランクの測定

0.44M トリクロロ酢酸溶液を2mL添加後にサンプル0.4mLを加えた以外は上記（２）タンパク質分解酵素活性の測定と同様に行った。このときの660nmにおける吸光度をBとする。

（４）希釈

タンパク質分解酵素活性が高く希釈が必要な場合は100mM ビス - トリスプロパン緩衝液（pH7.0）を使用し希釈した。

（５）計算

下式により ΔA_{660} を求めた。下式中、Dは希釈率を意味する。

$$\Delta A_{660} = (A - B) \times D$$

【 実施例 2 】

【 0 0 4 8 】

マンガン塩がタンパク質分解酵素の産生に及ぼす影響について検討を行った。

【 0 0 4 9 】

まず、栄研器材株式会社製パールコア（登録商標）標準寒天培地を使用 방법에従い調製した平板培地にパエニバチルス ポリミキサATCC842（以下ATCC842ということがある）を一白金耳植菌し、30℃で一晩培養を行い、平板培養したATCC842を得た。次いで、300mL容バッフル付き三角フラスコに2.2W/V% グルコース、0.3W/V% 大豆ペプチド、0.5W/V% 酵母エキス（オリエンタル工業社製 BSP）、0.1W/V% リン酸二水素一カリウム、0.04W/V% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.04W/V% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH8.0からなる液体培地を100mL添加し、シリコ栓（登録商標）をして、121℃で15分オートクレーブ滅菌を行った液体培地に、上記平板培養したATCC842を一白金耳植菌し、30℃、140rpmで2日間培養を行い培養液を得た（マンガンなし）。上記液体培地に0.01% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含む以外は同様に操作を行い培養液を得た（マンガンあり）。

10

【 0 0 5 0 】

それぞれの培養液を遠心分離（10,000rpm×10分）し、上清について40倍希釈して実施例1に示すタンパク質分解酵素活性を測定した。その結果を以下に示す。

【 0 0 5 1 】

—————	
	Δ A660
—————	
マンガンなし	0.009
マンガンあり	0.762
—————	

20

【 0 0 5 2 】

このようにマンガン塩を添加してパエニバチルス ポリミキサを培養するとタンパク質分解酵素を効率よく産生することが明らかとなった。

【実施例 3】

【 0 0 5 3 】

実施例1で得られた発酵終了後のローヤルゼリーを沸騰水中で20分間加熱を行ったものを凍結乾燥しローヤルゼリーの凍結乾燥品を得た。この凍結乾燥品を単回投与血圧降下薬効試験に供した。自然発症高血圧ラット（SHR）を6週間予備飼育後、17週齢のSHR（一群6匹、雄）に、前記凍結乾燥品を2.5mg/mLになるように精製水で懸濁したものを、体重1kg当り10mL経口投与した（25mg/kg）。その結果、投与後6時間後の凍結乾燥品投与群の血圧の平均は181mmHgであった。一方、対照群の血圧の平均は205mmHgであり、凍結乾燥品を投与することにより有意（ $p<0.05$ ）に血圧降下作用を示した。なお、対照群は精製水を10mL経口投与した。

30

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 4 】

本発明によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーは、ローヤルゼリー組成物または血圧降下剤として飲食物などに好適に使用することができ、特に健康食品などに好適に使用することができる。

40

フロントページの続き

(72)発明者 永松 剛
熊本県上益城郡甲佐町田口 2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内

(72)発明者 許 昌国
熊本県上益城郡甲佐町田口 2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内

(72)発明者 坂平 光
熊本県上益城郡甲佐町田口 2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内

F ターム(参考) 4B018 MD03 MD76 ME04 MF13
4B041 LD06 LP15
4C087 AA01 AA02 BB22 BC64 NA14 ZA42 ZC17 ZC20