



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 34 940 T2 2008.01.24**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 175 221 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 34 940.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR00/01238**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 925 413.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/067696**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **16.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **23.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 35/74 (2006.01)**

A61K 35/20 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9905760 06.05.1999 FR

(73) Patentinhaber:

Compagnie Gervais Danone, Paris, FR

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ANTOINE, Jean-Michel, F-94700 Maisons-Alfort,
FR; CAYUELA, Chantal, F-75015 Paris, FR;
DEGIVRY, Marie-Christine, F-92350 Le Plessis
Robinson, FR; LATGE, Christian, F-91430 Igny,
FR; POSTAIRE, Eric, F-92170 Vanves, FR**

(54) Bezeichnung: **MILCHSÄUREBAKTERIEN MIT ANXIOLYTISCHER WIRKUNG, UND IHRE VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft neue Stämme von Milchfermenten sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln mit anxiolytischen Eigenschaften.

[0002] Stress, eine Abwehrreaktion des Körpers gegen äußere Angriffe, verursacht insbesondere auf der Ebene des Nervensystems biologische Störungen, die sich auf verschiedene Art und Weise pathologisch auswirken können. Diese pathologischen Auswirkungen können sich direkt auf psychologischer Ebene manifestieren, insbesondere in Form von Angstgefühlen, und/oder sie können sich somatisch manifestieren, zum Beispiel durch arterielle Hypertonie, Magengeschwüren, usw. Häufig werden diese Erkrankungen chronisch.

[0003] Zur Behandlung der Folgen von Stress, egal ob Angstzuständen oder somatischen Symptomen, werden häufig Anxiolytika und insbesondere Benzodiazepine verwendet. Diese Medikamente, die schnell ein Gewöhnungsphänomen hervorrufen können, sind jedoch nicht für eine Langzeitbehandlung geeignet. Überdies wird ihre anxiolytische Wirkung insbesondere von sedierenden Eigenschaften begleitet, die unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen können.

[0004] Einige Untersuchungsergebnisse zeigten, dass es in Milch oder Milchprodukten Substanzen gibt, die pharmakologische Eigenschaften gegen pathologische Zustände besitzen, die mit Stress zusammenhängen. Insbesondere beschreibt die PCT-Anmeldung WO 98/05343 der CALPIS CO. und der GROUPE DANONE ein Mittel, das Anti-Stress-Eigenschaften besitzt, die sich in einer antihypertensiven Wirkung zeigen. Dieses Mittel wird durch Fermentation von Milch mit einem Milchsäurebakterium der Gattung *Lactobacillus* erhalten, insbesondere mit *Lactobacillus helveticus*. Es ist sterilisationsbeständig und kann zur Herstellung von Nahrungsmitteln verwendet werden, die zur Prävention und/oder Behandlung peripherer (somatischer) Stresserscheinungen beitragen, wobei es im Rahmen der normalen Ernährung regelmäßig und über lange Zeiträume konsumiert werden kann. Aus der PCT-Anmeldung WO 98/05343 ergibt sich keine zentrale, insbesondere keine anxiolytische Wirkung für die Verabreichung dieses Mittels.

[0005] Die Anmeldung EP 95402697 der SOCIÉTÉ COOPÉRATIVE LAITIÈRE AGRICOLE D'ARTOIS ET DES FLANDRES, LA PROSPÉRITÉ FERMIÈRE beschreibt ein Dekapeptid, das bei der tryptischen Hydrolyse des α_s1 -Kaseins entsteht. Die parenterale Verabreichung dieses Dekapeptids oder des tryptischen Hydrolysats, das es enthält, induziert eine anxiolytische und antikonvulsive Wirkung ähnlich der von Benzodiazepinen. Dagegen liefert das Dokument keinen Hinweis auf die Aktivität dieses Hydrolysats, wenn es oral verabreicht wird, und auf die Möglichkeit, das Hydrolysat in Nahrungsmitteln zu verarbeiten, damit diese Anti-Stress-Eigenschaften erhalten.

[0006] Die Erfinder haben nun in von bestimmten Milchsäurebakterien fermentierten Milchprodukten die Existenz ein oder mehrerer Wirkstoffe gezeigt, die in der Lage sind, bei oraler Verabreichung eine anxiolytische Anti-Stress-Wirkung zu induzieren, ohne dass sie die sedierenden Eigenschaften der Benzodiazepine besitzen.

[0007] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Milchsäurebakterienstamm, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- dem Stamm *Streptococcus thermophilus* S242, hinterlegt gemäß Budapest Vertrag bei der CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), Rue du Docteur Roux 28, 75724 Paris, am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2130;
- dem Stamm *Streptococcus thermophilus* S003, hinterlegt gemäß Budapest Vertrag bei der CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), Rue du Docteur Roux 28, 75724 Paris, am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2129;
- dem Stamm *Lactobacillus gasserii* L012, hinterlegt gemäß Budapest Vertrag bei der CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), Rue du Docteur Roux 28, 75724 Paris, am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2131;
- dem Stamm *Lactobacillus acidophilus* L030, hinterlegt gemäß Budapest Vertrag bei der CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), Rue du Docteur Roux 28, 75724 Paris, am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2132.

[0008] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von wenigstens einem der oben genannten neu isolierten und charakterisierten Milchsäurebakterienstämme zur Herstellung eines nicht-sedierenden Anxiolytikums.

[0009] Die Merkmale der erfindungsgemäßen Milchsäurebakterienstämme sind in den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

[0010]

Tabelle 1

Stamm	S003	S242	L012	L030
CNCM-Nr.	I-2129	I-2130	I-2131	I-2132
Morphologie	Ziemlich große Kokken, überwiegend in Form langer Ketten und einiger mittellanger und kurzer Ketten	Kleine Kokken in Paaren oder in Form kurzer Ketten	Kleine dünne Bazillen, schwach gefärbt, häufig kokkobazillär	Mittelgroße Bazillen, isoliert oder in Form kurzer Ketten
	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +
Metabolismus	Oxidase: - Catalase: - Fakultativ aero-anaerob	Oxidase: - Catalase: - Fakultativ aero-anaerob	Oxidase: - Catalase: - Nitratreduktase: - Nitritreduktase: - Aerob-anaerob	Oxidase: - Catalase: - Nitratreduktase: - Nitritreduktase: - Aerob-anaerob
Wachstumstemperatur	37-44°C	37-44°C	37-44°C	37-44°C

Tabelle 2

Stamm	S003	S242	L012	L030
CNCM-Nr.	I-2129	I-2130	I-2131	I-2132
Galaktose	-	-	+	+
D-Glukose	+	+	+	+
D-Fukose	-	-	+	+
N-Mannose	-	-	+	+
N-Acetylglukosamin	-	-	+	+
Amygdalin	-	-	+	+
Arbutin	-	-	+/-	+
Esculin	-	-	+	+
Salicin	-	-	+	+
Zellobiose	-	-	+	+
Maltose	-	-	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	-	-	+	+
β -Gentobiose	-	-	+	+
D-Tagatose	-	-	+	-
D-Turanose	-	-	-	+
Laktose	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	+
α -Methyl-D-glukosid	-	-	-	+

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung wenigstens eines Streptococcus thermophilus-Stammes, ausgewählt aus Stamm S242 und Stamm S003, in Kombination mit dem Stamm S. thermophilus S147, der am 30. Dezember 1994 unter der Nummer I-1520 bei der CNCM hinterlegt wurde, zur Herstellung eines nicht-sedierenden Anxiolytikums.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft zudem Milchsäurefermente, die wenigstens einen erfindungsgemäßen Stamm umfassen, vorteilhaft in Kombination mit einem anderen Milchsäurebakterienstamm.

[0013] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Milchsäureferments, umfasst es wenigstens den Stamm S. thermophilus S242 und/oder der Stamm S. thermophilus S003, vorteilhaft in Kombination mit dem Stamm S. thermophilus S147.

[0014] Zur Herstellung eines nicht-sedierenden Anxiolytikums wird wenigstens ein erfindungsgemäßer Milchsäurebakterienstamm, insbesondere ein Milchferment, das wenigstens den Stamm S. thermophilus S242 und/oder den Stamm S. thermophilus S003 umfasst, vorteilhaft in Kombination mit dem Stamm S. thermophilus S147 und gegebenenfalls mit dem Stamm L. gasseri L012 und/oder dem Stamm L. acidophilus L030 in einem geeigneten Medium kultiviert, d.h. in Milch oder einem Medium auf Milchbasis. Es kann insbesondere gewählt werden aus gegebenenfalls teilentrahmter oder ganz entrahmter Milch verschiedener Säugerarten, Produkten, die durch Verdünnung oder Konzentration dieser Milch entstehen, beispielsweise Ultrafiltrations- oder Diafiltrationsretentaten, Medien auf Milchbasis, beispielsweise Basen für Nahrungsmittel auf Milchbasis, Basen für Joghurt und dergleichen. Diese verschiedenen Arten von Milch können zudem beispielsweise mit Lactose, Mineralstoffen, Vitaminen, Fett- oder Nichtfettstoffen, hydrophilen Milchtrockenstoffen, Sojaproteinen, Pflanzenextrakten und dergleichen supplementiert sein.

[0015] Dieses Medium wird mit einer Kultur angeimpft, die wenigstens einen erfindungsgemäßen Milchsäu-

rebakterienstamm umfasst, bevorzugt mit 10^7 bis 10^9 Bakterien/ml. Die optimalen Kultivierungsbedingungen variieren je nach Stamm oder Mischung von Stämmen. Wenn die Impfkultur beispielsweise aus einem Streptococcus thermophilus-Stamm oder einer Mischung von Streptococcus thermophilus-Stämmen besteht, wird die Kultivierung etwa 24 Stunden lang durchgeführt und die optimale Kultivierungstemperatur liegt zwischen 30 und 44°C; wenn die Impfkultur aus einem L. acidophilus- oder L. gasseri-Stamm oder einer Mischung dieser Stämme besteht, wird die Kultivierung etwa 16 Stunden lang durchgeführt und die optimale Kultivierungstemperatur liegt zwischen 37 und 44°C. Wenn in der Impfkultur wenigstens ein Streptococcus thermophilus-Stamm und wenigstens ein L. acidophilus- oder L. gasseri-Stamm kombiniert sind, wird die Kultivierung 16 bis 24 Stunden lang durchgeführt und die optimale Kultivierungstemperatur liegt zwischen 37 und 44°C.

[0016] Die erfindungsgemäß erhaltenen, nicht-sedierenden Anxiolytika wirken bei oraler Verabreichung. Ihre regelmäßige Einnahme führt nach einigen Tagen zur Abnahme des Angstgefühls, ohne dass dadurch die Aktivität nachlässt; sie können über sehr lange Zeit angewendet werden, ohne dass es zu einer Gewöhnung kommt und ohne dass unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Diese Eigenschaften, ebenso wie die Tatsache, dass sie aus Mikroorganismen erhalten werden können, die zu Spezies gehören, wie sie in der Nahrungsmittelindustrie gängig sind, und mit Rohmaterialien, die ebenfalls für Nahrungsmittel üblich sind, ermöglichen ihre Verwendung bei der Herstellung von Nahrungsmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln, deren Verzehr eine positive Wirkung bei der Behandlung oder der Prävention pathologischer Zustände hat, die mit Stress zusammenhängen.

[0017] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Produkte oder Nahrungsergänzungsmittel, die ein erfindungsgemäß erhaltenes nicht-sedierendes Anxiolytikum umfassen.

[0018] Diese Nahrungsmittelprodukte können insbesondere Produkte sein, die wenigstens einen erfindungsgemäßen Milchsäurebakterienstamm oder ein erfindungsgemäßes Milchferment umfassen und aus Milch oder einem Medium auf Basis von Milch bestehen, das mit diesem Stamm oder diesem Ferment fermentiert wurde. Erfindungsgemäße Nahrungsmittelprodukte können auch hergestellt werden, indem jedem fermentierten oder sonstigen Nahrungsmittel ein Präparat mit dem erfindungsgemäß erhaltenen nicht-sedierenden Anxiolytikum zugesetzt wird.

[0019] Die positive Wirkung der erfindungsgemäßen Nahrungsmittel beginnt im Falle einer fermentierten Milch, die eine Gesamtpopulation (die aus ein oder mehr erfindungsgemäßen Bakterienstämmen bestehen kann) erfindungsgemäßer Milchsäurebakterien mit wenigstens 10^5 CFU/ml enthält, im Allgemeinen ab einer Dosis von 5 ml/Tag/kg Körpergewicht. Es können jedoch auch wesentlich höhere Dosen ohne schädliche Nebenwirkungen aufgenommen werden.

[0020] Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden ergänzenden Beschreibung näher erläutert, die nicht einschränkende Beispiele betrifft, die die anxiolytischen Eigenschaften der erfindungsgemäß erhaltenen fermentierten Milchprodukte veranschaulichen.

Beispiel 1: Herstellung verschiedener Test-Milchprodukte

[0021] Die in den verschiedenen nachfolgenden Experimenten verwendeten Stämme und Fermente sind wie folgt:

- Stamm S. thermophilus S242
- Stamm S. thermophilus S147
- Stamm S. thermophilus S003
- Ferment F042 (Ferment, in dem die 3 S. thermophilus-Stämme S242, S147 und S003 kombiniert sind)
- Stamm L. gasseri L012
- Stamm L. acidophilus L030

Herstellung der Produkte:

[0022] Ultrahocherhitzte Milch mit 0% Fett wurde 10 Minuten lang bei 95°C behandelt und dann je nach Fermentationstemperatur auf 37 oder 44°C abgekühlt, bevor sie zum Erhalt der erwünschten Präparate mit aktiven Kulturen der verwendeten Stämme angeimpft wurde.

[0023] Animpfen mit den Stämmen S. thermophilus S242, S147 und S003, die einzeln verwendet werden, erfolgt mit einer Kultur mit 10^8 bis 10^9 CFU/ml zu 1% (V/V) der sterilen, mit Hefeautolysat versetzten Milch (3 Std. bei 44°C).

[0024] Animpfen mit dem Ferment F042 erfolgt mit 30g/100 l einer eingefrorenen konzentrierten Mischung mit zwischen 10^8 und 10^9 CFU/ml der Stämme S242, S147 und S003. Die Inkubation erfolgt bei 44°C; wenn der pH etwa 4,5 erreicht, wird das Präparat auf 4°C gestellt und bei dieser Temperatur bis zur Verwendung aufbewahrt.

[0025] Die Bakterienpopulationen in den mit den einzelnen Stämmen fermentierten Produkten am Ende der Fermentation sind: Streptococcus thermophilus S242: $1,2 \times 10^9$ CFU/ml; Streptococcus thermophilus S147: $1,8 \times 10^9$ CFU/ml; Streptococcus thermophilus S003: $1,3 \times 10^7$ CFU/ml.

[0026] In dem Produkt, das mit der F042-Mischung fermentiert wurde, beträgt die Streptococcus thermophilus-Konzentration (S242 + S147 + S003) $1,9 \times 10^8$ CFU/ml.

[0027] Animpfen mit den Stämmen L. acidophilus L012 und L030 erfolgt zu 3% (V/V) mit einer Kultur mit 10^8 bis 10^9 CFU/ml in neutralem MRS-Medium (16 Std. bei 37°C). Die Inkubation erfolgt bei 37°C; wenn der pH einen Wert zwischen 4,5 und 5,9 erreicht, wird das Präparat auf 4°C gestellt und bei dieser Temperatur bis zur Verwendung aufbewahrt.

[0028] Die filtrierte Molke der mit dem Ferment F042 fermentierten Milch wird hergestellt, indem man 500 ml fermentierte Milch bei 10 000 U/min (SORVAL RC5B-Zentrifuge, GSA-Rotor) zweimal 15 Minuten zentrifugiert und den Überstand dann über ein NALGENE-Filter aus Cellulosenitrat (HIGH-BINDING PROTEIN) ($0,45 \mu\text{m}$ und dann $0,22 \mu\text{m}$) filtriert.

Beispiel 2: Bestimmung der anxiolytischen Wirkung einer Mischung von 3 thermophilen Streptokokken

[0029] Die folgenden Produkte wurden getestet:

3S: Mit Ferment F042 (umfassend 3 S. thermophilus S242, S147, S003) fermentierte Milch

3S + P: Mit Ferment F042 + Passionsblume fermentierte Milch

3ST: Mit Ferment F042 fermentierte und dann bei 73°C 30 Sekunden unter Homogenisierung bei 100 bar wärmebehandelte Milch

L: Kontrollmilch, 30 Sekunden bei 130°C sterilisiert

[0030] Die anxiolytische Wirkung wird mit dem Conditioned Defensive Burying-Modell, das aus dem Verfahren von J.P. PINEL und D. TREIT (PINEL und TREIT, J. Corp. & Physiol. Psychol., 92, 708-712, 1978; TREIT et al., Pharmacol. Biochem. Behav., 15, 619-626, 1981) entwickelt wurde, bestimmt. Dieses Modell nützt die natürliche Neigung der meisten Nagetiere, einen Stressauslöser zu vergraben (TREIT, Pharmacol. Biochem. Behav., 22, 1, 47-52, 1985; MEERT und COLPAERT, Psychopharmacology, 88, 445-450, 1986; CRAFT et al., Pharmacol. Biochem. Behav., 30, 3, 775-780, 1988; TREIT, Pharmacol. Biochem. Behav., 36, 203-205, 1990).

Tiere

[0031] Es wurden 72 männliche Wistar/AF EOPS-Ratten (IFFA-CREDO-Zuchtzentrum, 69 – St-Germain sur l'Arbresle, Frankreich) mit einem Gewicht von 320 bis 340 g verwendet. Bei Erhalt der Ratten wurden sie gewogen, markiert und in 4-er Gruppen auf Polykarbonatkäfige vom Typ F ($48 \times 27 \times 20$ cm, U.A.R., 91 Epinay-Sur-Orge, Frankreich) verteilt. Die Tiere wurden in einen klimatisierten Tierhaltungsraum eingestallt, in dem die Temperatur 22-24°C betrug. Die Ratten konnten ad libitum fressen (M25-Kekse, Ets PIETREMENT, 77-Provins, Frankreich) und trinken. Sie wurden einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Zyklus (Licht von 24 h bis 12 h) ausgesetzt.

[0032] Nach einer Woche Gewöhnungszeit an die Laborbedingungen wurden die 72 Ratten nach dem Zufallsprinzip in 6 Gruppen (n = 12) aufgeteilt. Die Ratten in den unterschiedlichen Gruppen wurden alle auf gleiche Weise behandelt und unter denselben Bedingungen gehalten.

Material

Versuchskäfig

[0033] Gewöhnung und Tests erfolgten in einem durchsichtigen Käfig mit den Maßen $44 \times 28 \times 18$ cm, dessen Boden 5 cm dick mit Sägemehl eingestreut war. In der Mitte einer Seitenfläche ermöglichte es eine Öffnung 2 cm über dem Sägemehl, eine elektrische Sonde anzubringen.

Elektrische Sonde

[0034] Es handelte sich um eine Sonde aus mit einer gedruckten Schaltung aus Kupfer bedecktem Plexiglas mit den Maßen $7 \times 2 \times 0,5$ cm, wobei der Abstand zwischen den Drähten 1 mm betrug, so dass eine Pfote der Ratte, die sich auf die Sonde stellt, leicht Kontakt zwischen ihnen herstellt, so dass Strom fließen kann.

Elektrische Einrichtung

[0035] Die Sonde ist mit einem manuell ausgelösten Generator für Elektroschocks von 0 bis 8 mA (OPEN-SYSTEMS, 54 – Maxéville, Frankreich) verbunden.

Aufzeichnung und Bestimmung der Verhaltenssequenzen

[0036] In dem schwach beleuchteten Untersuchungsraum wurde einen Meter vor dem Käfig der Vorrichtung eine Videokamera angebracht. Die Kamera ist mit einem Videorekorder und einem Kontrollmonitor verbunden, die sich zusammen mit dem Elektroschockgenerator in einem Nebenraum befinden.

Versuchsdurchführung

[0037] Das Experiment wurde als Doppelblindversuch durchgeführt.

Gewöhnung

[0038] Während der 2 Tage vor dem ersten Test wurden die Ratten vom Tierhaltungsraum zum Versuchsraum gebracht und mit dem Versuchsvorrichtung vertraut gemacht, um sie ohne die Elektrode sowohl an die Behandlung als auch an den Vorrichtungskäfig zu gewöhnen. Jede Gruppe aus 4 Ratten wurde 20 Minuten lang in die Vorrichtung gesetzt. Das Sägemehl wird vor der Eingewöhnungszeit jeder Gruppe gewechselt und auf eine gleichmäßige Höhe von 5 cm gebracht.

Erfahrung

[0039] Der Conditioned Defensive Burying-Test wird in den ersten 5 Stunden der Dunkelphase durchgeführt, der Phase, in der die Ratten am aktivsten sind.

[0040] Die elektrische Sonde wird vor Beginn des ersten Tests in den Käfig eingebracht. Jede Ratte wird in dem Versuchskäfig auf die der Sonde gegenüberliegende Seite gesetzt.

[0041] Beim ersten Test (Test 1) erhält das Tier in dem Moment, im dem es zum ersten Mal eine Vorderpfote auf die Sonde setzte, einen einmaligen elektrischen Schock geringer Intensität (2 mA).

[0042] Nach dem elektrischen Schock wird das Verhalten der Ratte 5 Minuten lang aufgezeichnet. Bei den nächsten beiden Tests (Test 2 und 3) wird die Ratte wieder in Gegenwart der inaktiven Sonde in den Versuchskäfig gesetzt. Die Sonde wird nach jeder Ratte gereinigt und vor der Testsitzung wird das Sägemehl in jedem Rattenkäfig gewechselt und auf eine gleichmäßige Höhe von 5 cm gebracht.

Verabreichung der Produkte

[0043] Die Produkte L, 3ST, 3S und 3S + P wurden täglich mit Spritzen, die mit Magensonden (HARVARD APPARATUS, 91 – Les Ulis, Frankreich) versehen waren, in Dosen von 5 ml/kg zur selben Uhrzeit oral verabreicht. Die Vergrabungstests (Test 1 an Tag 6 and Test 2 an Tag 8) wurden 6 Stunden nach Verabreichung der Produkte durchgeführt.

[0044] Die positive Kontrolle ist Diazepam (3 mg/kg), das über denselben Zeitraum in einer 1%-igen wässrigen Methylcelluloselösung täglich oral verabreicht wurde. An den Testtagen wurde es 1 Stunde vor dem Vergrabungstest verabreicht.

[0045] Die vier Ratten jedes Käfigs erhielten jeweils ein anderes Produkt.

Variable

- Dauer der Vergrabung der Sonde: Die Vergrabungssequenzen sind nach dem Schock auffallend stereotyp; die Ratte sieht die elektrische Sonde und scharrt durch eine schnelle abwechselnde Bewegung der Vorderpfoten Sägemehl in deren Richtung;
- Anzahl Streckbewegungen zur Sonde: Die Ratte bleibt ein paar Zentimeter vor der Sonde unbeweglich stehen und streckt ihren Hals, um ihre Schnauze näher zur Sonde zu bringen;
- Anzahl Annäherungen an die Sonde: jede Annäherung des Kopfs der Ratte in Richtung der Sonde auf einen Abstand von weniger als 3 cm;
- Anzahl, wie oft die Ratte vor der Sonde flieht: jede hastige Flucht der Ratte nach einer Annäherung oder einem Kontakt mit der Sonde;
- Prozentsatz Annäherungen an die Sonde gefolgt von Flucht = (Anzahl Fluchtvorgänge/Anzahl Annäherungen) × 100

Statistische Analyse

[0046] Die Daten wurden in ansteigender Größenordnung für die folgenden Variablen klassifiziert: Vergrabungsdauer, Anzahl Streckbewegungen und Prozentsatz Annäherungen gefolgt von Flucht. Innerhalb der verschiedenen Variablen wurde jedem Datenwert ein Rang zugeordnet, und die Summe der Ränge stellt für jede Ratte den Gesamt-Stressscore dar.

[0047] Der KRUSKAL-WALLIS-Test wurde verwendet, um zu zeigen, dass zwischen den Gruppen Heterogenität bestand. Der MANN-WHITNEY-Test diente zum Vergleich der Gruppen DZP, 3ST, 3S und 3S + P mit Kontrollprodukt L. Die Ergebnisse sind als Median und interquartile Abweichung ausgedrückt (unteres Quartil – oberes Quartil).

[0048] Die statistische und graphische Bearbeitung erfolgte mit den Softwarepaketen STATVIEW 4.1 und DELTAGRAPH PRO 3.5.

Ergebnisse

Gesamt-Stressscore bei Test 1

[0049] Die Ergebnisse dieses Tests sind in [Fig. 1](#) dargestellt.

Legende zu [Fig. 1](#):

L: Sterile Kontrollmilch

3ST: Mit Ferment F042 fermentierte und dann wärmebehandelte Milch.

3S: Mit Ferment F042 fermentierte Milch

3S + P: Mit Ferment F042 + Passionsblume fermentierte Milch

DZP: Diazepam

Mann-Whitney-Test: *p < 0,05 vs. L, ***p < 0,005 vs. L und (T) Trend vs. L (p < 0,07).

[0050] Bei Test 1 senken die Produkte 3S und 3S + P den Gesamt-Stressscore im Vergleich zum Kontrollprodukt L signifikant.

[0051] Das Produkt 3ST unterscheidet sich nicht signifikant vom Kontrollprodukt L. Diazepam neigt zu einer Senkung des Gesamt-Stressscores im Vergleich zur Kontrolle L.

[0052] Bei Test 1 zeigte kein Produkt außer Diazepam eine sedative Wirkung.

Gesamt-Stressscore bei Test 2

[0053] Die Ergebnisse dieses Tests sind in [Fig. 2](#) dargestellt.

Legende zu [Fig. 2](#):

L: Sterile Kontrollmilch

3ST: Mit Ferment F042 fermentierte und dann wärmebehandelte Milch.

3S: Mit Ferment F042 fermentierte Milch
3S + P: Mit Ferment F042 + Passionsblume fermentierte Milch
DZP: Diazepam
Mann-Whitney-Test: *p > 0,05 vs. L.

[0054] Bei diesem Test senkten die Produkte 3S und 3S + P den Gesamt-Stressscore im Vergleich zum Kontrollprodukt L signifikant.

[0055] Die Wirkung von Produkt 3ST und von Diazepam unterscheidet sich nicht signifikant von Produkt L.

Schlussfolgerungen

[0056] Bei Test 1 und 2 senken die Produkte 3S und 3S + P den Gesamt-Stressscore im Vergleich zum Kontrollprodukt L signifikant. Das Produkt 3 ST zeigt bei den beiden Tests im Vergleich mit dem Kontrollprodukt keine Anti-Stress-Aktivität.

[0057] Diazepam, das vor dem Test 6 Tage lang in einer Dosis von 3 mg/kg peroral verabreicht wurde, zeigte gegenüber der Kontrolle lediglich eine Tendenz zur Senkung des Gesamt-Stresscores. Bei Test 2 zeigte es keine Wirkung, die sich statistisch von derjenigen der Kontrolle unterscheidet. Dies ist ein Gewöhnungsphänomen, das für Produkte der Benzodiazepinfamilie typisch ist.

[0058] Daraus kann geschlossen werden, dass die Produkte 3S und 3S + P eine signifikante Anti-Stress-Aktivität aufweisen, während sich die Wirkung von Produkt 3ST nicht von der der Kontrolle unterscheidet. Das Toleranzphänomen, das sich bei Diazepam beobachten lässt, ist bei den Produkten 3S und 3S + P nicht zu beobachten. Bei diesen beiden Produkten trat kein Sedierungsproblem auf.

Beispiel 3: Anxiolytische Wirkung von Milch, die mit verschiedenen Milchsäurebakterien fermentiert wurde.

[0059] Die folgenden Produkte wurden getestet:
SC008 1.1: Mit *S. thermophilus* S242 fermentierte Milch;
SC008 1.2: Mit *S. thermophilus* S147 fermentierte Milch;
3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch;
SC008 1.5: Filtrierte Molke der mit Ferment F042 fermentierten Milch;
L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min);
SC008 1.8: Mit *L. gasseri* L012 fermentierte Milch;
SC008 1.10: Mit *L. acidophilus* L030 fermentierte Milch;
SC008 1.12: Mit *S. thermophilus* S003 fermentierte Milch.

[0060] Die Tests erfolgten entsprechend dem oben in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll an 158 männlichen Wistar/AF EOPS-Ratten (IFFA-CREDO-Zuchtzentrum, 69 – St. German sur Arbresles, Frankreich) mit einem Gewicht von 260 bis 280 g. Nach einer Eingewöhnungszeit an die Laborbedingungen von einer Woche wurden die Ratten nach dem Zufallsprinzip in 13 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Ratten in den verschiedenen Gruppen wurden in gleicher Weise und unter denselben Bedingungen behandelt.

Verabreichung der Produkte

[0061] Alle Produkte wurden 6 Tage lang täglich mit Spritzen, die mit Magensonden (HARVARD APPARATUS, 91 – Les Ulis, Frankreich) versehen waren, in Dosen von 5 ml/kg zur selben Uhrzeit oral verabreicht. Am Tag des Tests wurden sie 6 Stunden vor dem Vergrabungstest verabreicht.

[0062] Diazepam (1 mg/kg peroral an Tag 1 und 2; 2mg/kg peroral an Tag 3 und 4, und 3 mg/kg peroral an Tag 5 und 6) wurde in 5 ml 1%-iger wässriger Methylcelluloselösung suspendiert. Am Tag des Tests wurde es 1 Stunde vor dem Vergrabungstest verabreicht.

[0063] Um eine gegenseitige Beeinflussung zu vermeiden, erhielten alle Ratten eines Käfigs dasselbe Produkt.

Variable

[0064] Neben den bereits in Beispiel 2 beschriebenen Variablen wurden die folgenden Variablen für die se-

dierende Wirkung untersucht:

- Häufigkeit der Aufrichtens: Die Ratte nimmt eine senkrechte Stellung ein und sitzt dabei auf ihren Hinterbeinen;
- Anzahl der Passagen der Ratte von einer Käfigseite zur anderen.

Ergebnisse

Gesamt-Stressscore

[0065] Im Vergleich mit dem Produkt L induzieren die Produkte SC008 1.1, 3S, SC008 1.8, SC008 1.10, SC008 1.12 und Diazepam signifikant niedrigere Gesamt-Stressscores.

[0066] Die Stressscores, die von den Produkten SC008 1.2 und SC008 1.5 induziert werden, unterscheiden sich nicht signifikant vom Kontrollprodukt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) gezeigt.

Legende zu [Fig. 3](#):

L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min);

SC008 1.1: Mit *S. thermophilus* S242 fermentierte Milch.

SC008 1.2: Mit *S. thermophilus* S147 fermentierte Milch;

3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch;

SC008 1.5: Filtrierte Molke der mit Ferment F042 fermentierten Milch;

SC008 1.8: Mit *L. gasseri* L012 fermentierte Milch;

SC008 1.10: Mit *L. acidophilus* L030 fermentierte Milch;

SC008 1.12: Mit *S. thermophilus* S003 fermentierte Milch;

DZP: Diazepam.

Mann-Whitney-Test: ***p < 0,005 vs. L.

Sedierende Wirkung der Produkte 3S und SC008 1.10

[0067] Die sedierende Wirkung der Produkte 3S und SC008 1.10 im Vergleich mit dem Kontrollprodukt L wird auf Basis der lokomotorischen und exploratorischen Aktivität bestimmt.

Häufigkeit des Aufrichtens beim Test

[0068] Bei der Häufigkeit des Aufrichtens, die mit den Produkten 3S, SC008 1.10 und L beobachtet wurde, wurde eine Heterogenität festgestellt (Kruskal-Wallis-Test: $H_{(0,2)} = 6,170$; $p < 0,05$). Das Produkt 3S führt zu einer signifikant höheren Häufigkeit des Aufrichtens im Vergleich zum Kontrollprodukt L (Mann-Whitney-Test: $U = 65$; $p < 0,05$). Das Produkt SC008 1.10 tendiert dazu, die Häufigkeit des Aufrichtens im Vergleich zum Kontrollprodukt L zu erhöhen (Mann-Whitney-Test: $U = 73$; $p < 0,07$).

Anzahl der Passagen von einer Käfigseite zur anderen.

[0069] Bei den Produkten 3S, SC008 1.10 und dem Kontrollprodukt L ist kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Passagen von einer Käfigseite zur anderen zu beobachten (Kruskal-Wallis-Test: $H_{(0,2)} = 0,983$; N.S.).

Schlussfolgerung

[0070] Unter den Versuchsbedingungen zeigen SC008 1.1, 3S, SC008 1.8, SC008 1.10, SC008 1.12 und Diazepam auf Basis des Gesamt-Stressscores eine signifikante Anti-Stress-Aktivität im Vergleich zum Kontrollprodukt L.

[0071] Auf Basis der lokomotorischen und exploratorischen Aktivität und im Vergleich zur Kontrolle L wurde mit den fermentierten Milchprodukten, die eine Anti-Stress-Aktivität zeigen, keine sedierende Wirkung beobachtet.

Beispiel 4: Bestimmung der optimalen oralen Verabreichungsdauer der Produkte.

[0072] Die folgenden Produkte wurden getestet:

3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch;
L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min).

[0073] Die Tests erfolgten entsprechend dem oben in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll an 72 männlichen Wistar/AF EOPS-Ratten (IFFA-CREDO Zuchtzentrum, 69 – St. German sur Arbresles, Frankreich) mit einem Gewicht von 260 bis 280 g. Nach einer Eingewöhnungszeit an die Laborbedingungen von einer Woche wurden die Ratten nach dem Zufallsprinzip in 6 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Ratten in den verschiedenen Gruppen wurden in gleicher Weise und unter denselben Bedingungen behandelt.

Verabreichung der Produkte

[0074] Die Produkte wurden 1, 3 und 6 Tage lang täglich mit Spritzen, die mit Magensonden (HARVARD APPARATUS, 91 – Les Ulis, Frankreich) versehen waren, in Dosen von 5 ml/kg verabreicht. Am Tag des Tests wurden sie 6 Stunden vor dem Vergrabungstest verabreicht.

[0075] Die vier Ratten jedes Käfigs erhielten alle dasselbe Produkt.

Ergebnisse

Gesamt-Stressscore

[0076] Wenn das Produkt 3S als Einmalgabe oder 3 Tage lang täglich vor dem Test verabreicht wird, induziert es einen Gesamt-Stressscore, der demjenigen des Kontrollprodukts L statistisch äquivalent ist.

[0077] Wird es vor dem Test 6 Tage lang täglich verabreicht, induziert das Produkt 3S einen Gesamt-Stressscore, der signifikant unter dem liegt, der mit Produkt L erhalten wird.

[0078] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) dargestellt.

Legende zu [Fig. 4](#):

L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min)

3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch

Mann-Whitney-Test: ***p < 0,005 vs. L.

Schlussfolgerung

[0079] Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen ist eine tägliche Verabreichung des Produkts 3S über 6 Tage notwendig, um im Vergleich mit dem Kontrollprodukt L eine signifikante Anti-Stress-Aktivität zu zeigen.

Beispiel 5: Bestimmung der optimalen oralen Verabreichungszeit der Produkte.

[0080] Die folgenden Produkte wurden getestet:

3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch

L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min).

[0081] Die Tests erfolgten entsprechend dem oben in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll an 108 männlichen Wistar/AF EOPS-Ratten (IFFA-CREDO Zuchtzentrum, 69 – St. German sur Arbresles, Frankreich) mit einem Gewicht von 260 bis 280 g. Nach einer Eingewöhnungszeit an die Laborbedingungen von einer Woche wurden die Ratten nach dem Zufallsprinzip in 9 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Ratten in den verschiedenen Gruppen wurden in gleicher Weise und unter denselben Bedingungen behandelt.

Verabreichung der Produkte

[0082] Vor dem Test wurden die Produkte 6 Tage lang täglich mit Spritzen, die mit Magensonden (HARVARD APPARATUS, 91 – Les Ulis, Frankreich) versehen waren, in Dosen von 5 ml/kg oral verabreicht. Nach diesem Zeitraum erfolgt der Vergrabungstest 1, 3 oder 6 oder 24 Stunden nach der letzten Gabe.

[0083] Diazepam (1 mg/kg peroral an Tag 1 und 2; 2mg/kg peroral an Tag 3 und 4 und 3 mg/kg peroral an Tag

5 und 6) wird in 5 ml 1%-iger wässriger Methylcelluloselösung verabreicht. Die letzte Verabreichung erfolgt 1 Stunde vor dem Verabreichungstest. Die vier Ratten jedes Käfigs erhielten alle dasselbe Produkt.

Ergebnisse

Gesamt-Stressscore

[0084] Wird die Verabreichung 1 Stunde vor dem Test durchgeführt, induziert das Produkt 3S einen Gesamt-Stressscore, der dem, der mit dem Kontrollprodukt L erhalten wird, statistisch äquivalent ist. Der Gesamt-Stressscore von Diazepam ist signifikant niedriger als derjenige des Kontrollprodukts L.

[0085] Wird die Verabreichung 3 Stunden vor dem Test durchgeführt, zeigt das Produkt 3S einen Gesamt-Stressscore, der sich statistisch nicht von demjenigen des Kontrollprodukts L unterscheidet.

[0086] Wird die Verabreichung 6 oder 24 Stunden vor dem Test durchgeführt, induziert das Produkt 3S einen Gesamt-Stressscore, der signifikant niedriger ist als derjenige des Kontrollprodukts L.

[0087] Die Ergebnisse bei 1 Stunde und 6 Stunden sind in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) dargestellt.

Legende zu [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#):

L: Sterile Kontrollmilch (95°C, 10 min)

3S: Mit Ferment F042 (S242 + S147 + S003) fermentierte Milch

DZP: Diazepam

Mann-Whitney-Test: **p < 0,01 vs. L.

Schlussfolgerung

[0088] Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen und auf Basis des Gesamt-Stresscores manifestiert sich die Anti-Stress-Aktivität zwischen 6 und 24 Stunden nach Verabreichung von Produkt 3S.

Beispiel 6: Suche nach dem Decapeptid, das bei der tryptischen Hydrolyse von α_s 1-Kasein entsteht, in einem mit der 3S-Mischung fermentierten Produkt

[0089] Die Anwesenheit des in der Anmeldung EP 95402697 beschriebenen Dekapeptids wurde in dem Produkt 3S untersucht. Die Analyse erfolgte durch Reversed-Phase-HPLC an C18 (die Trennung der Peptide basiert auf ihrer Hydrophobie).

[0090] Die Analyse erfolgte an einer C18-10 μ -NUCLEOSIL-„Vorsäule“ – 100 mm \times 4,6 mm, gefolgt von einer analytischen C18-3 μ -NUCLEOSIL-Säule – 150 mm \times 4,6 mm, mit folgendem Gradienten:

A: 0,1% TFA in H₂O

B: 90% CH₃CN + 10% 0,1% TFA in H₂O

[0091] Die Elution erfolgt wie nachfolgend in Tabelle III beschrieben:

Tabelle III

Zeit	A	B
0 min	90	10
10 min	60	40
40 min	60	40
45 min	90	10
60 min	90	10

[0092] Die Detektion erfolgt bei 215 nm.

[0093] Unter diesen Bedingungen beträgt die Retentionszeit für das an der Säule abgeschiedene Decapeptid 29 min.

Präparation der Testprobe:

[0094] Produkt 3S + 20% CH₃CN; Agitation und danach 20-minütige Zentrifugation bei 10 000 U/min.

[0095] Erhalt der löslichen Phase und anschließende Filtration durch ein 0,45µ-GELMAN-GHP-GF-Filter (LOW PROTEIN BINDING) vor Einspritzen von 100 µl Filtrat in die HPLC-Säule.

[0096] In dem Filtrat des 3S-Produkts wurde kein Peak gefunden, der der Retentionszeit des gesuchten Dekapeptids entspricht.

Patentansprüche

1. Verwendung wenigstens eines Milchsäurebakterienstamms ausgewählt aus:

- dem Stamm *S. thermophilus* S242, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2130;
- dem Stamm *S. thermophilus* S003, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2129;
- dem Stamm *L. gasseri* L012, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2131;
- dem Stamm *L. acidophilus* L030, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2132, zur Herstellung eines nicht-sedierenden Anxiolytikums.

2. Milchsäurebakterienstamm, der zur Herstellung eines nicht-sedierenden Anxiolytikums verwendbar ist, ausgewählt aus:

- dem Stamm *S. thermophilus* S242, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2130;
- dem Stamm *S. thermophilus* S003, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2129;
- dem Stamm *L. gasseri* L012, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2131;
- dem Stamm *L. acidophilus* L030, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2132.

3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein *Streptococcus thermophilus*-Stamm, ausgewählt aus Stamm S242 und Stamm S003, mit dem Stamm *S. thermophilus* S147 kombiniert wird, der am 30. Dezember 1994 unter der Nummer I-1520 bei der CNCM hinterlegt wurde.

4. Milchferment, umfassend wenigstens einen *S. thermophilus*-Stamm, ausgewählt aus dem Stamm S242, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2130, und dem Stamm S003, hinterlegt bei der CNCM am 24. Februar 1999 unter der Nummer I-2129.

5. Milchferment nach Anspruch 4, ferner umfassend den Stamm *S. thermophilus* S147, hinterlegt bei der CNCM am 30. Dezember 1994 unter der Nummer I-1520.

6. Milchferment nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner wenigstens einen Milchsäurebakterienstamm umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- dem Stamm *L. gasseri* L012, hinterlegt bei der CNCM am 24. 2. 1999 unter der Nummer I-2131;
- dem Stamm *L. acidophilus* L030, hinterlegt bei der CNCM am 24. 2. 1999 unter der Nummer I-2132.

7. Nahrungsmittelprodukt oder Nahrungsergänzungsmittel, umfassend ein nicht sedierendes Anxiolytikum, wobei das nicht sedierende Anxiolytikum dadurch gekennzeichnet ist, dass es wenigstens einen Milchsäurebakterienstamm nach Anspruch 2 oder ein Milchferment nach einem der Ansprüche 4 bis 6 umfasst, und dadurch, dass es aus Milch oder einem Medium auf Milchbasis besteht, fermentiert durch den oben genannten Stamm oder das oben genannte Ferment.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

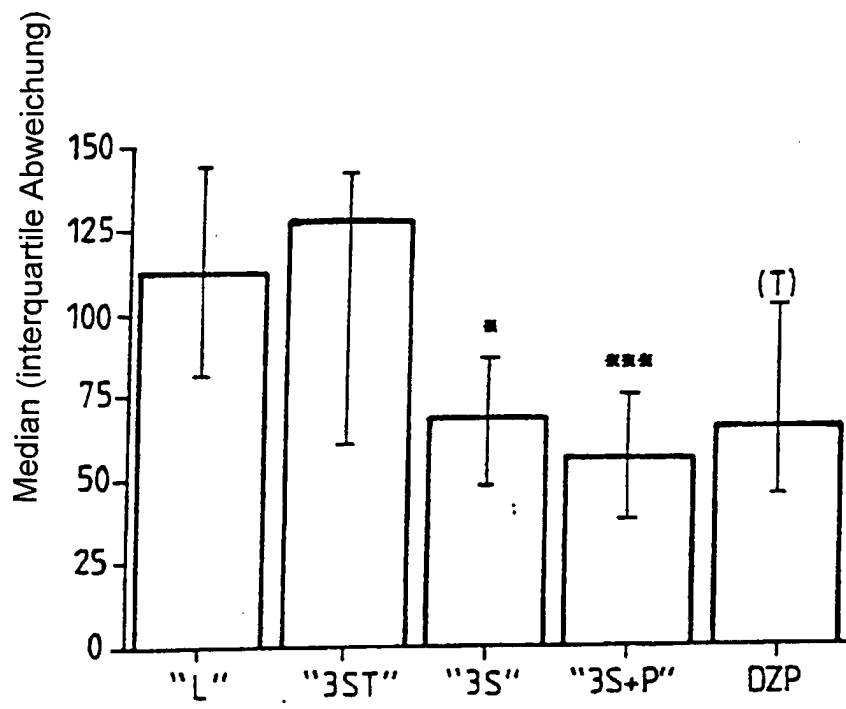


FIG.1

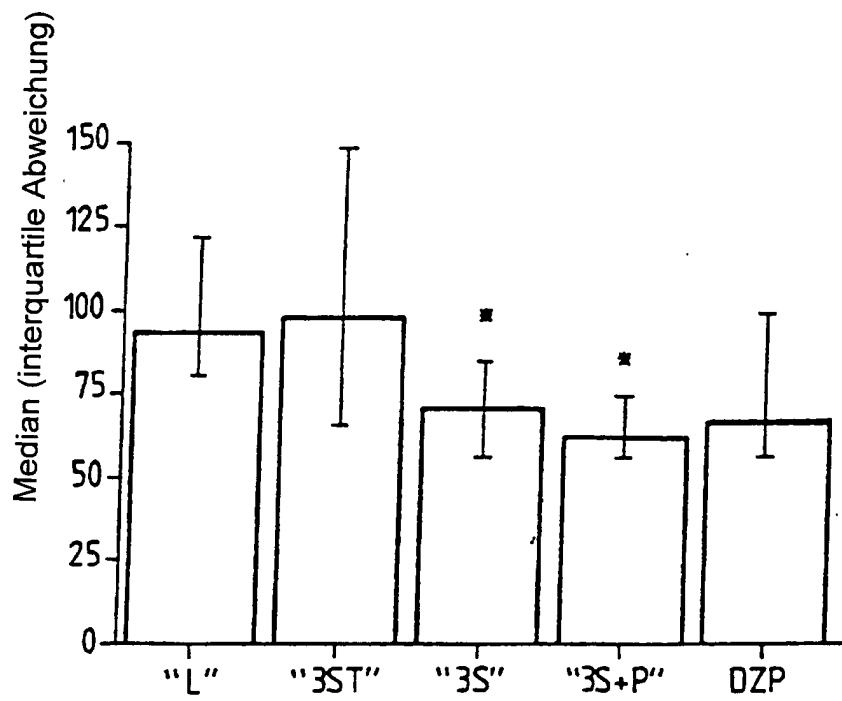


FIG.2

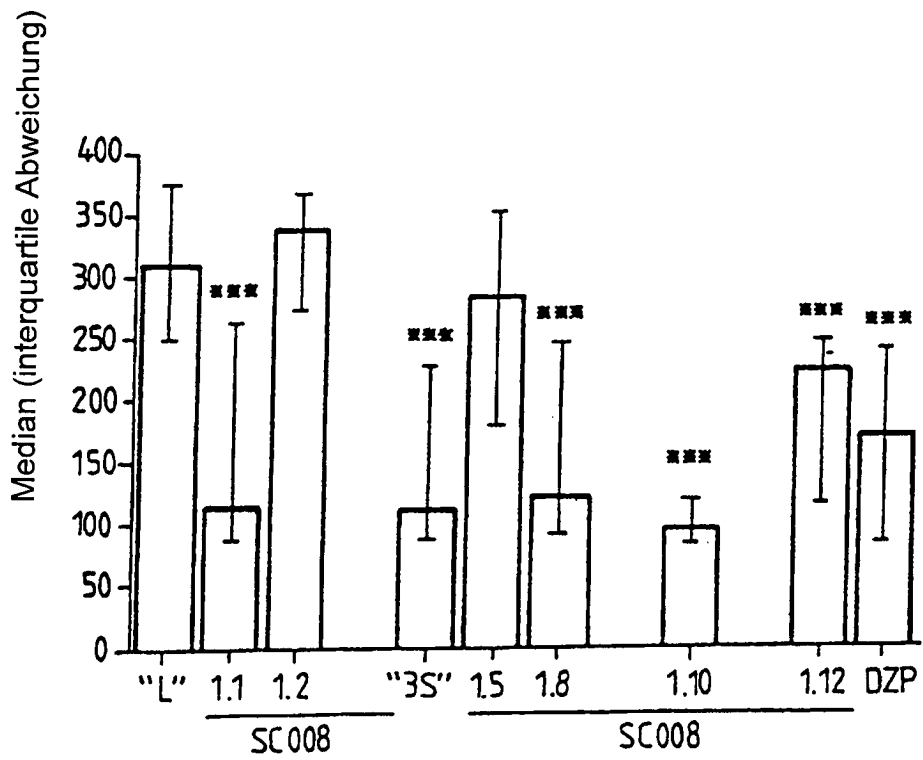


FIG.3

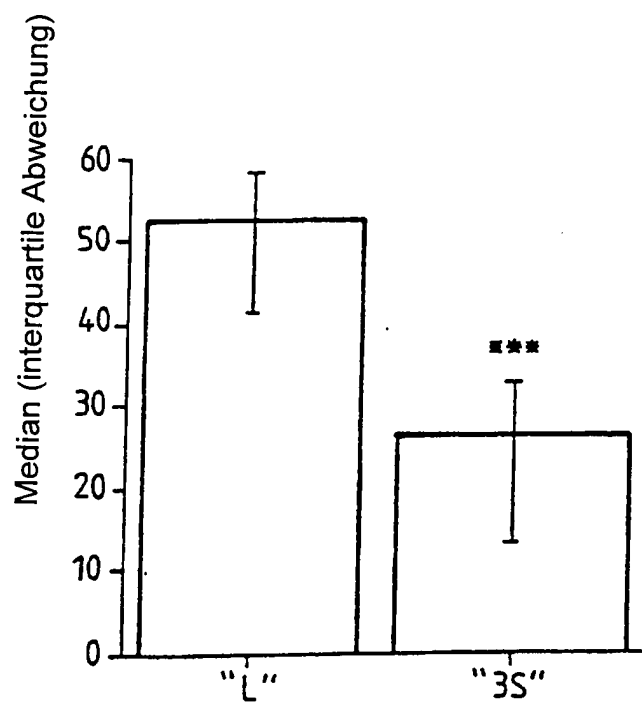


FIG.4

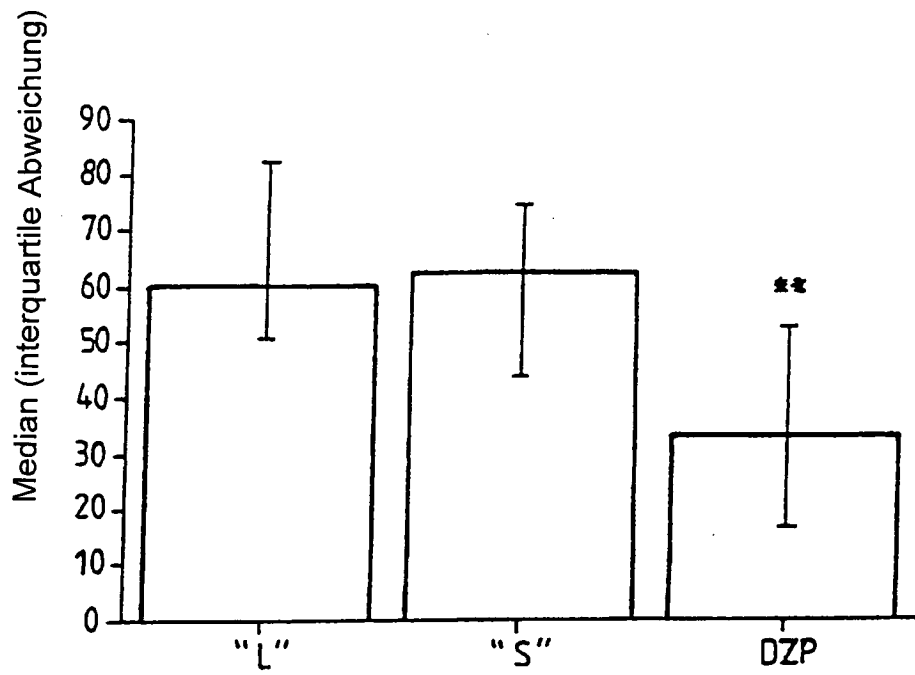


FIG.5

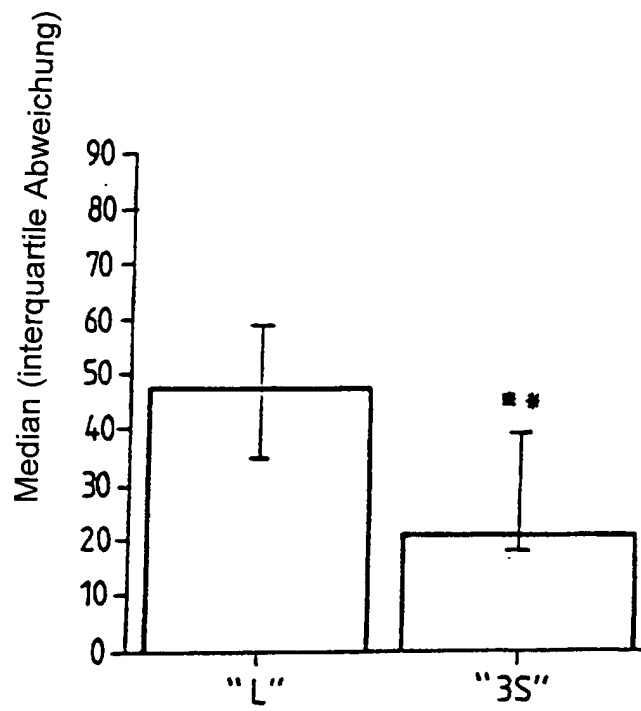


FIG.6