

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3695648号
(P3695648)

(45) 発行日 平成17年9月14日(2005.9.14)

(24) 登録日 平成17年7月8日(2005.7.8)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 N 1/20
A 2 3 C 9/123
A 2 3 C 21/02
A 2 3 L 1/30
A 2 3 L 1/305C 1 2 N 1/20 A
A 2 3 C 9/123
A 2 3 C 21/02
A 2 3 L 1/30 Z
A 2 3 L 1/305

請求項の数 14 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-535518 (P2001-535518)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月30日(2000.10.30)
 (65) 公表番号 特表2003-513621 (P2003-513621A)
 (43) 公表日 平成15年4月15日(2003.4.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2000/000941
 (87) 国際公開番号 W02001/032836
 (87) 国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)
 審査請求日 平成16年1月8日(2004.1.8)
 (31) 優先権主張番号 19992360
 (32) 優先日 平成11年11月1日(1999.11.1)
 (33) 優先権主張国 フィンランド(FI)

微生物の受託番号 DSM 13137

(73) 特許権者 500185416
 ヴァリオ・オサケ・ユキテュア
 フィンランド、エフイーエンー〇〇37〇
 ヘルシンキ、メイイエリティエ6番
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100086405
 弁理士 河宮 治
 (74) 代理人 100072730
 弁理士 小島 一晃
 (72) 発明者 アンニカ・メユレーメキネン
 フィンランド、エフイーエンー〇〇17〇
 ヘルシンキ、マウリカトゥ4番、ペー1
 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗高血圧性ジペプチドおよびトリペプチドを産生する *Lactobacillus helveticus*

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7。

【請求項2】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株を含有する細菌調製物。

【請求項3】

他の微生物をさらに含有することを特徴とする、請求項2記載の細菌調製物。

【請求項4】

凍結乾燥粉末またはカプセルの形態で存在することを特徴とする、請求項2または3記載の細菌調製物。

【請求項5】

食品産業における *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株の使用。

【請求項6】

乳業または飲料産業の製品を調製することを特徴とする、請求項5記載の使用。

【請求項7】

請求項1記載の微生物または請求項2～4いずれか記載の微生物調製物を含有すること、また同物質を用いて調製することを特徴とする、食用製品。

【請求項8】

乳製品であることを特徴とする、請求項7記載の食用製品。

【請求項 9】

飲料品、好ましくはホエー飲料、果物飲料またはビールであることを特徴とする、請求項 7 記載の食用製品。

【請求項 10】

治療用物質として使用するための *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株。

【請求項 11】

高血圧の処置で使用するための *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株。

【請求項 12】

抗高血圧性製品の調製で使用するための *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株。

10

【請求項 13】

抗高血圧性製品が抗高血圧性ジペプチドおよびトリペプチドを含有することを特徴とする、請求項 12 記載の抗高血圧製品の調製に使用するための *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株。

【請求項 14】

抗高血圧製品が高濃度のトリペプチド、特に Ile - Pro - Pro および / または Val - Pro - Pro を持つことを特徴とする、請求項 12 記載の抗高血圧製品の調製物に使用するための *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 株。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、新規微生物およびその使用に関する。より正確には、*Lactobacillus helveticus* の新規株、その生理学上の特徴およびその使用、例えば食品産業および医薬品産業における使用を記載する。

【0002】

(背景技術)

Sneathらによって編集された *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney, 1984, Part 14, p.1208 onwards には、表題「Regular, Nonsporing Gram Positive Rods」として、*Lactobacillus* 属に属する微生物の特徴と分類、さらに *Lactobacillus helveticus* 種の特徴が記載されている。一般的に、*Lactobacillus helveticus* 株は、発酵乳製品およびチーズなどの乳製品から単離され、従来、それらはチーズ、特にエメンタルおよびグリュイエールタイプのチーズを製造する際に出発微生物として使用されてきた。

30

【0003】

Lactobacillus helveticus 株の生物学的効果は先行技術で述べられている。例えば、国際特許出願 WO 99 / 1 6 8 6 2、Yamamotoらによって、*Lactobacillus helveticus* C M 4、F E R M B P - 6 0 6 0 が大量のトリペプチド Val-Pro-Pro および / または Ile-Pro-Pro を産生することが可能であって、高い細胞外タンパク質分解活性を持つことが記載されている。また、この公開は、上記トリペプチドおよび細菌を含有する発酵乳製品および上記細菌によるトリペプチド配列物を含有する産物を発酵することによるその調製方法が記載されている。

40

【0004】

米国特許 5,449,661 の Nakamuraらによって、トリペプチド配列 Val-Pro-Pro を含有するペプチドの調製と高血圧を抑えるためにそのペプチドを使用することが記載されている。このペプチドは、無脂肪乳と *Lactobacillus helveticus* J C M 1 0 0 4 株を発酵させ、その後ペプチドをクロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥を行って調製される。

【0005】

また、Yamamotoらは、微生物 *Lactobacillus helveticus* C P 7 9 0 (J. Biochem., 1993,

50

114:740)由来のプロテイナーの精製および特徴分析を記載している。さらに、Yamamoto 1らは、_{S1} および カゼインを上記タンパク質加水分解酵素で加水分解し、その得られたペプチドをACEに対する阻害効果を試験した研究を報告している(J. Dairy Sci, 1994, 77:917)。試験したペプチドは、全部で25個であり、その分子サイズと効果は大きく異なっていた。最も有効なペプチドは、カゼインから得られた3つのペプチドであり、8、18および27のアミノ酸を各々含有する。また、その研究は、*Lactobacillus helveticus* CP790株とタンパク質加水分解酵素活性を欠くその変異株CP791を用いて発酵したミルクのACE活性を比較した。それによると、前者は自発性高血圧症SHRラットにおいて有効性が見出されたが通常のラットでは効果はなく、一方、後者は全く活性を示さなかった。

10

【0006】

乳酸菌およびその*Lactobacillus helveticus*種は広く研究され、伝統的な発物として、および健康増進物質としても使用が推奨されている。および乳業などの食品産業における発物およびプロバイオティックスとしてさらに自然産物だけでなく、医薬産業においても、有用である新規の有効な微生物を見出そうとする分野での絶えない追求がいまだ存在する。

【0007】

(発明の詳細)

本発明の目的は、卓越したタンパク質分解性および生理学上の特性を持ち、これによって発物としてかつ健康増進物質としても使用するのに非常にふさわしい*Lactobacillus he* 20
*lveticus*の新規株を提供することである。

【0008】

本発明によって、この株は、消費者がそのまま、もしくは食用に適した食品、機能食品または医薬品に使用するために消費者に提供される。

【0009】

即ち、本発明は、*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137に関する。

【0010】

また、本発明は、*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137株を含有する細菌調製物に関する。

30

【0011】

本発明は、さらに食品産業または医薬品産業における*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137の使用に関する。

【0012】

本発明は、さらに、上記の株を含むか、上記株を用いて調製される栄養素などの食用製品および医薬品に関する。

【0013】

本発明は、治療物質として使用するための*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137株にも関する。

【0014】

本発明は、高血圧症の処置で使用するための*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137株にも関する。

40

【0015】

また、本発明は、抗高血圧性製品を調製するために*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137株を使用することに関する。

【0016】

さらに、本発明は、抗高血圧性製品を調製するための方法に関する。該方法は*Lactobacillus helveticus* LBK - 16H、DSM 13137株を用いる。

【0017】

本発明は、*Lactobacillus helveticus* LBK - 16Hの新規株を基にしたもので、19 50

99年11月3日に寄託番号DSMZ 13137で受託機関 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)に寄託されており、その株は下記特徴を有する：

・Lactobacillus helveticus株は、グラム陽性であり、桿状形の長い細胞である。細胞増殖温度範囲は約35～45℃であって、至適温度は約37～42℃である。

・Lactobacillus helveticus L B K - 16 Hは、37℃～42℃の温度のミルク中で良好に増殖し、乳酸(DL)を2.5～2.9%産生する。増殖の至適pHは約4.5～7である。pH無調整培養では、ミルク中pH3.3～3.6の範囲内に低下する。

・また、この株は、Lactobacillusで通常使用される培地で良好に増殖し、炭素源素としてクエン酸塩を用い得る。

10

【0018】

Lactobacillus helveticus L B K - 16 Hは、下記のような炭水化物を発酵する：

【表1】

炭水化物	L. helveticus L B K - 16 H
グリセロール	—
エリスリトール	—
D-アラビノース	—
L-アラビノース	—
リボース	—
D-キシロース	—
L-キシロース	—
アドニトール	—
β-メチルキシロシド	—
ガラクトース	+
D-グルコース	+
D-フルクトース	+
D-マンノース	+

20

30

【表2】

炭水化物	L. helveticus L B K - 1 6 H
L-ソルボース	—
ラムノース	—
ズルシトール	—
イノシトール	—
マンニトール	—
ソルビトール	—
α -メチル-D-マンノシド	—
α -メチル-D-グルコシド	—
N-アセチル-グルコサミン	+
エスクリン	—
セルオビオース	—
マルトース	—
ラクトース	+
サッカロース	—
トレハロース	—
イヌリン	—
メレジトース	—
D-ラフィノース	—
グリコーゲン	—
キシリトール	—

10

20

30

【 0 0 1 9 】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H は、タンパク分解性について活性である。実施例において下記するように、o-フタルジアルデヒドのタンパク質分解を基にしている O P A 法によって測定すると、この株のタンパク質分解活性は 0 . 3 ~ 0 . 6 の値であった。タンパク質分解活性は、出発物としての使用と生物学的活性物質の調製の両方に利用し得る。

40

【 0 0 2 0 】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H は、低い p H 値に非常に良好な耐性がある。このことは、保存能および生理学的活性の両観点から重要な特性である。実施例で記載したが、該株は、p H レベル 4 で良好で、p H レベルが 3 であっても約 4 時間は耐性があり、特に乳製品においてその保存性が卓越しており、p H 2 のような低い p H で 4 時間まで耐性がある。その結果に基づくと、この株は、胃を通過する消化管で生き延びて、大腸で生存していると予測され得る。

【 0 0 2 1 】

50

また、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 Hは、胆汁への卓越した耐性を示し、胆汁濃度0.5%まで耐性がある。この結果も、胃から消化管および小腸で生きぬき、大腸で生存を維持することを示している。

【0022】

また、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 Hは、酸化窒素を産生する能力をもつことが明らかになった。酸化窒素の産生は、酸化窒素合成酵素の活性化にによって提供された酸化窒素の形成として研究した。この株は、J 7 7 4 マクロファージ細胞系では0.4 μ MのNOが、T 8 4 ヒトエンテロサイト細胞系では約2 ~ 6 μ MのNOが産生する。この特性は非常に重要である：適切な量のNO産生の活性化は、例えば炎症応答および血圧調節において有効である。

10

【0023】

また、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 Hは、生物活性ペプチド産生能を示すことが見出した。フィンランド特許出願992360の実施例で、抗高血圧性ペプチドを含有する十分保存し得る産物が2工程法によってどのように調製されるかが記載されている。その第1工程で、上記生物活性ペプチドは発酵によって、例えば、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H単独もしくは上記株と別の乳酸菌株との組み合わせで多様な乳製品を発酵することによって産生される。この公開の実施例によれば、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 Hにより、既知の抗高血圧性トリペプチドV P P (Val-Pro-Pro) およびI P P (Ile-Pro-Pro) 各々13 ~ 15 mg / lおよび6 ~ 8 mg / lが産生される。この公開によれば、異なるペプチド混合物は発酵反応中に形成される。発酵持続時間が十分である場合、比較的小さなジおよびトリペプチドが得られる。

20

【0024】

上記記載の特徴を基にすると、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 Hは、プロバイオテック生物体であると考え得る。

【0025】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 Hは、例えば乳業、例えば発酵乳製品およびチーズの製造業における従来の出発細菌として有用である。チーズ、特にエメンタルチーズにおける使用は、好ましい態様であると考えられる。

【0026】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 Hは、特定製品、例えば発酵乳製品、特に生化学的ペプチドを含有する酸乳およびヨーグルトなどの製造において十分利用し得る。

30

【0027】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 Hは、食用物質の製造においてそのまま機能物質として、または食用物質中の成分または添加物としてさらに使用し得る。

【0028】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 Hは、例えばM R S プロス、生乳、再構成した粉末乳または超音波処理したミルクなどのミルク中、あるいは一般的に*Lactobacilli*に使用されるRogosaまたはM R Sなどの培地で常法により細菌を培養して生成される。適当な培養条件および他のパラメーター、例えば温度、pHおよび通気などの選択は、当業者には既知である。温度は例えば30 ~ 45 であってよい。pH調整は必要かもしれない。

40

【0029】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 Hを、単独で培養し、純粋な培養物を形成することも可能である。また、その株は混合培養物として、例えばその分野で既知の別の出発微生物と共に培養してもよい。所望であれば、異なる種類の微生物を別々に培養し、その後、に所望の割合で異なる微生物を組み合わせることによって、混合培養物を提供することも可能である。微生物組み合わせ物は、最良の可能な特性が最終産物に提供され、雑菌混入の危険性が排除されるように適切に選択する。

【0030】

培養後、細胞懸濁液を回収し、そのまま使用するか、例えば濃縮、乾燥または凍結乾燥などの所望の方法で処理する。

50

【0031】

当然、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H は、純粹培養物としてまたは混合培養物として、別々に、もしくは例えば従来の使用され、市販入手し得る出発物またはプロバイオティクスと一緒に使用し得る。

【0032】

本発明に関して、凍結乾燥され適当なアジュバンド中で *Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 を含有する細菌調製物が好ましい調製物と考える。

【0033】

本発明の細菌調製物は、上記細菌をそのまま、または他の構成成分、例えば他の微生物と組み合わせて含んでもよい。

10

【0034】

本発明に関して、この株は食用製品、特に(機能)食品、自然製品または医薬品の製造で使用し得る。

【0035】

本発明の食用製品は、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7、またはそれと同じものと(最終)製品の従来成分を含む細菌産物を用いて調製する。この細菌は、その製造過程中的食品または別の製品に添加するか、または最終製品に添加し得る。細菌細胞が全くなく、ただ細菌増殖中に生成した産物、例えば最終製品に残る風味付けや香り付けの物質または生物活性を持つ物質が最終製品に残るような製品の製造に関してこの細菌を使用することは可能である。

20

【0036】

本明細書において、食品なる用語は、固体、ゲル化または液体形態で存在し得る全ての食用製品を網羅する意味で、そしてすぐ食べられる製品と本発明の産物が消費と関連して補助食品または製品の構成成分となるものとして添加された産物との両方を網羅する意味で広く使用する。例えば、その食品は、乳業、食肉加工業、食品加工業、飲料産業、製パン業および製菓業の製品であってもよい。通常の製品は、ミルク製品、例えば無脂肪乳、そのままで、または粉末ミルク形態の様々な脂肪含量を有するミルク、酸乳、バターミルク、カードチーズ、ヨーグルト、カードミルク、無熟成チーズおよび熟成チーズ、スナックフィンガーなどの発酵乳製品を包含する。ホエー飲料、果物飲料およびビールなどの飲料は、別の重要なグループを構成する。

30

【0037】

本発明との関連において、医薬品産業の製品は、多様な医薬調製物は別として、健康増進自然製品なども包含する。調製物の通常の形態は、例えばカプセル、錠剤および溶液である。

【0038】

本発明は、*Lactobacillus helveticus* L B K - 1 6 H、D S M 1 3 1 3 7 を十分量で用いて、所望の効果を提供する。使用される量は、用途および効果によって広範囲にわたって変えてもよい。

【0039】

下記において、本発明は、実施例によって詳細に説明する。これらの実施例は、本発明を説明することを意図するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

40

【0040】

実施例 1

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株の培養

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株を、貯蔵株を M R S プロスまたはミルクプロスに 1 % の接種物で 2 回接種して、37 で 20 ~ 24 時間、培養した。また、実際(生産)培養では M R S を基にしたプロスまたはミルクを基にしたプロス中で、35 ~ 42 の培養温度で、20 ~ 48 時間(pH調整または未調整)株を増殖させた。

【0041】

この細胞を培養物からそのまま回収するか、この細胞を既知の技術を用いて濃縮し、細胞

50

濃縮物として使用するか、もしくは濃縮後にそれらを凍結乾燥させ、粉末様産物とすること可能である。

【 0 0 4 2 】

実施例 2

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株のタンパク質分解活性

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H のタンパク質分解活性を、O P A 法 (Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catigna, G.L., 1983, Spectrophotometric assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolate d milk proteins, J Dairy Sci 66:1219-1227) を用いてミルクにより決定した。

【 0 0 4 3 】

上記方法を実施するために、細菌細胞を 1 0 ml チューブの M R S ブロス中で培養し、その後その懸濁液を 0 . 9 % NaCl で洗浄し、1 0 ml に懸濁した。細菌細胞を 2 2 のミルク (1 0 ml) に 1 % の接種物として接種した。細菌接種物を含まない同じミルク試料を対照として使用した。

【 0 0 4 4 】

試料 (2 . 5 ml)、水 (0 . 5 ml) および 0 . 7 5 N トリクロロ酢酸 (T C A) (0 . 5 ml) を、Vortex 装置で十分攪拌し、1 0 分間継続し、Whatman#2 濾過紙によって濾過した。試料 (1 5 0 μ l) を T C A 濾過物から取り、使い捨てキュベット中で O P A 試薬 (3 ml) と混合した。この混合物を 2 分間室温でインキュベートし、その後 3 4 0 nm の波長で分光分析器で測定した。対照値を実測値から控除し、Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株のタンパク質分解活性が 0 . 3 ~ 0 . 6 となった。

【 0 0 4 5 】

O P A 試薬 :

1 0 0 m m o l メタハウ酸ナトリウム塩 (2 5 ml)

2 0 % (w / w) S D S (2 . 5 ml)

メタノール (1 ml) 中に溶解した O P A (o - フタルジアルデヒド) (4 0 mg)

- メルカプトエタノール (1 0 0 μ l)

上記物質を組み合わせ、終体積は 5 0 ml となるように水に溶解した。該試薬を 1 日暗所に保存した。

【 0 0 4 6 】

実施例 3

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株の pH 耐性

L B K - 1 6 H を、M R S ブロス中で 1 7 ~ 1 8 時間、試験前に 2 回培養した。その後、該株を、M R S ブロスもしくはミルクブロスのいずれかで試験用に培養した。p H 試験の際に、試験ブロス (M R S) の p H を、p H 6 . 5、p H 4 および p H 2 に調製した (乳酸を用いる)。これらのブロスを M R S またはミルクブロス培養物で接種し、初期濃度が 10^7 cfu/ml となるように、3 および 4 時間 3 7 で培養した。その後 L B K - 1 6 H 株の濃度を、培養物 (M R S 寒天培地上の Lactobacilli の測定方法によって) から測定した。その結果を表 1 に示した。

【 表 3 】

表 1 . LBK-16 H 株 の pH 耐性

		3 時間			4 時間			
	初期濃度	pH 6.5	pH 4	pH 3	pH 6.5	pH 4	pH 3	pH 2
MRS	4×10^7	6×10^7	3×10^7	5×10^7	6×10^7	3×10^7	3×10^7	< 100
ミルク	5×10^7	5×10^7	3×10^7	6×10^7	5×10^7	4×10^7	7×10^7	1×10^4

【 0 0 4 7 】

このように、上記株はpHレベル4でも非常に良好な耐性を示し、pH3であっても4時間の耐性を示した。pH2と同等の低いレベルでの4時間の保存性は、乳製品で接種される場合に水性製品で接種した場合よりも良好であった。

【0048】

実施例4

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 株の胆汁耐性

L B K - 1 6 H を実施例3と同じように培養した。この試験をMRSブロスで行い、胆汁酸に、ウシ胆汁；Sigma B - 3 8 8 3 を、0.3%および0.5%の量で添加した。MRSを基にした培養物またはミルクを基にした培養物からの1%の新しい培養物を、胆汁含有ブロスに添加した。初期濃度は $2 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mlである。この株を3時間ブロス中で培養し、その後MRS寒天上の細胞濃度を測定した。結果を表2に示した。

10

【0049】

【表4】

表2. L B K - 1 6 H の胆汁耐性

培養培地	胆汁濃度		
	0	0.3 %	0.5 %
MRS	2×10^6	2×10^6	4×10^5
ミルク	5×10^6	6×10^6	5×10^6

20

【0050】

表から明らかなように、L B K - 1 6 H は0.5%までの胆汁濃度の耐性があった。

【0051】

実施例5

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H による酸化窒素の産生

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H による酸化窒素の産生を、Korhonenら記載の方法 (Induction of nitric oxide synthesis by probiotic Lactobacillus GG in J774 macrophages and T84 colon epithelial cells, Korhonen, R., Korpela, R., Saxelin, M., Maeki, M., Kankaanranta, H. and Moilanen, E., Submitted) を用いて試験した。その方法は誘導し得る酸化窒素合成酵素(iNOS)およびそれから得られる酸化窒素(NO)の産生の誘導に基づく。2つの異なる細胞系を試験に使用した：J774ネズミのマクロファージ細胞系およびT84ヒトエンテロサイト細胞系。この誘導は、-インターフェロンの存在下に、Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H 細胞を用いてJ774中で行った。これは細菌細胞単独ではNOを産生しないためである。この細胞系の細胞と細菌株との比は1：10であった。

30

【0052】

酵素iNOSの発現を、参照としてリポサッカライド(LPS)とリポテイコン酸(LA)を用いてウエスタンブロッティング技術を用いて測定した。

【0053】

酸化窒素(NO)の産生を、接種24時間後の培養培地中の酸化窒素代謝産物亜硝酸塩の量として測定した。亜硝酸塩はGriess 反応 (Grieb et al., 1988, Analytical Biochemistry, vol.126, pp.131 to 138) によって測定した。

40

【0054】

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H は、ネズミマクロファージ細胞系で $0.4 \mu\text{l}$ の酸化窒素およびヒト上皮細胞系中で $5 \sim 6 \mu\text{l}$ の酸化窒素を産生することができる。比較すると、Lactobacillus rhamnosus L C 7 0 5, D S M 7 0 6 1 がT84細胞中で酸化窒素 $0.7 \mu\text{M}$ のみを産生することと云える。

【0055】

実施例6

50

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H による生物活性ペプチドの産生

Lactobacillus helveticus L B K - 1 6 H M R S 株を、M R S ブロス中で 3 7 、 2 4 時間で培養し、接種物を形成するために再構成したミルク (1 0 %) に接種した。2 回の培養ラウンド後、この接種物 (1 5 %) を、9 ~ 1 0 % 無脂肪ミルク粉末を含有し、1 1 0 、 1 0 分間で滅菌した発酵用培地に接種した。発酵を、3 7 、 2 2 ~ 2 4 時間で十分攪拌しながら実施した。

【 0 0 5 6 】

比較試験を行うために、この発酵を (a) 数株、即ち L. helveticus L B 1 6 1、L. helveticus L B K - 1 6 H および L. helveticus L B 2 3 0 の混合物、(b) L. helveticus L B K - 1 6 H および L. rhamnosus L C 7 0 5、D S M 7 0 6 1 株の混合物および (c) L. helveticus L B K - 1 6 H および Streptococcus thermophilus T 1 0 1、D S M 4 0 2 2 混合物を用いて繰り返した。

【 0 0 5 7 】

用いた培養培地は、1 0 0 、 1 5 分間で滅菌した 9 % のミルクであった。接種物を形成するために、L. helveticus および L. rhamnosus L C 7 0 5 を 2 4 時間、3 7 で M R S ブロス中で培養し、その後 1 % の接種物をミルクに移した。Str. thermophilus T 1 0 1 を、1 8 時間 3 7 で L M 1 7 ブロス中で培養し、そこから接種物をミルクに移した。

【 0 0 5 8 】

最初の培養をミルク中で全ての株を別々に培養し、3 7 、 2 4 時間でインキュベーションした。2 回目の培養については、各混合物の 1 % の株をピペットでミルクに移し、その後 2 4 時間 3 7 で共培養を継続した。3 回目の培養については、5 ~ 1 0 % の上記の得られた共培養物をミルクにピペットで移し、3 7 2 4 時間でインキュベーションした。

【 0 0 5 9 】

L. helveticus L B K - 1 6 H および異なる微生物混合物によって産生された V P P および I P P 量を表 3 に示した。本発明の L. helveticus L B K - 1 6 H は、大量の生物活性ペプチドを産生し得る。異なる混合物の別の微生物は生物活性ペプチドを産生しないが、L B K - 1 6 H の活性といずれも干渉しなかった。その混合物および L B K - 1 6 H 単独との間で観察される差異はなかった。

【表 5】

表 3 . L. helveticus L B K - 1 6 H および異なる微生物混合物によって産生された V P P および I P P 量

微生物 (混合物)	VPP, mg/l	IPP, mg/l
L161+LBK-16H+LB230, 5%	13-14	6-7
L161+LBK-16H+LB230, 10%	13-14	6-7
LBK16H+LC705, 5 %	13-14	6-7
LBK16H+LC705, 10%	13-14	6-7
LBK16H+Str.T101 10%	13-15	6-8
LBK16H (単独)	13-15	6-8

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 K 9/14	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/48	A 6 1 K 9/48	
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 K 37/02	
//(C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 R 1:225)	C 1 2 R 1:225	

(72)発明者 タルヤ・スオマライネン
フィンランド、エフイーエン - 0 0 9 2 0 ヘルシンキ、ラルカンティエ1セー番

審査官 田村 明照

(56)参考文献 特開平11 - 098978 (JP, A)
特開平06 - 197786 (JP, A)
特開平06 - 040944 (JP, A)
特開平11 - 100328 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 1/20