

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4205227号
(P4205227)

(45) 発行日 平成21年1月7日 (2009.1.7)

(24) 登録日 平成20年10月24日 (2008.10.24)

(51) Int.Cl. F 1
C 0 7 K 7/14 (2006.01) C 0 7 K 7/14
C 0 7 K 1/24 (2006.01) C 0 7 K 1/24
C 0 7 K 1/34 (2006.01) C 0 7 K 1/34
C 0 7 K 1/36 (2006.01) C 0 7 K 1/36
A 6 1 K 31/00 (2006.01) A 6 1 K 31/00

請求項の数 3 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-4131	(73) 特許権者	000104353
(22) 出願日	平成11年1月11日 (1999.1.11)		カルピス株式会社
(65) 公開番号	特開2000-204099 (P2000-204099A)		東京都渋谷区恵比寿南二丁目4番1号
(43) 公開日	平成12年7月25日 (2000.7.25)	(74) 代理人	100091199
審査請求日	平成17年12月12日 (2005.12.12)		弁理士 田淵 権
		(72) 発明者	北村 修二
			東京都町田市中町2-18-8ベルメゾン
			町田201
		(72) 発明者	上山 崇
			神奈川県川崎市高津区梶ヶ谷4-1-2-405
		審査官	斎藤 真由美
		(56) 参考文献	特開平06-197786 (JP, A)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド含有液の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する培養液を固液分離して得た上澄液を、電気透析法により精製するに当たって、拡散係数が $3.0 \sim 9.0 \times 10^{-6}$ であるアニオン交換膜を使用し、該アニオン交換膜の拡散係数の測定に当たっては、(イ) 0.5 N 食塩溶液、膜、3 N 食塩溶液にて攪拌し、攪拌後の食塩の濃度変化を測定し、(ロ) 拡散係数 = 食塩移動量 (mol) / 時間 (秒) × 膜面積 (CM²) × ΔC (mol / cc) の算定式を用いて拡散係数を求めることを特徴とするペプチド含有液の精製方法。

【請求項2】

アニオン交換膜の拡散係数が $5.0 \sim 7.0 \times 10^{-6}$ である請求項1記載のペプチド含有液の精製方法。

【請求項3】

乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する培養液を固液分離して得た上澄液を、濃縮した後、電気透析を行うことを特徴とする請求項1または2記載のペプチド含有液の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する乳酸菌、又は乳酸菌及び

酵母菌を培養して得られる培養液を精製する方法に関する。本発明の方法によって得られるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドは、高血圧降下用の医薬品乃至機能性食品として用いられる。

【0002】

【従来の技術】

アンジオテンシン変換酵素（以下ACEと呼ぶ）は、主に肺や血管内皮細胞に存在し、レニンにより分解されたアンジオテンシンI（Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu）に作用してC末端よりジペプチド（His Leu）を遊離させ、強力な血圧上昇作用を有するアンジオテンシンIIを生成させる。又、この酵素は、降圧作用を有するブラジキニンを分解し、不活性化作用を合せ持つ。このようにACEは、昇圧ペプチド（アンジオテンシンII）を産生すると共に、一方では降圧ペプチド（ブラジキニン）を分解、不活性化するので、結果として血圧を上昇させる作用を示す。したがって、この酵素を阻害することにより、血圧の上昇を抑えることが出来るので、このための医薬品としてのACE阻害物質が各種開発、使用されている。

【0003】

近年、低毒性で安全性の高い降圧物質として、ACE阻害ペプチド（以下ACEIペプチドと呼ぶ）が注目され、天然物、合成物が多数報告されている（特開平3-120225）。又、乳酸菌又は、乳酸菌と酵母をある種の培地に培養することによって、Ile Pro Pro（以下IPPと略す）及び又はVal Pro Pro（以下VPPと略す）を基本骨格とするACE阻害ペプチドの大量生産の方法が知られており、これらのペプチドを含む発酵生産物を各種の精製処理を施して、安全性が高く、微量の経口摂取で有効なACE阻害活性を有する医薬品、機能性食品が提案されている（日本特許第2782142号、2782153号）。

【0004】

上記日本特許等の方法に従い、乳酸菌又は、乳酸菌と酵母を培養することによって得られる発酵液をそのままACE阻害剤の有効成分として用いることも出来る。しかしながら、乳酸菌等の培養物は、乳糖、乳酸等を含有しており、降圧作用を有する医薬品、機能性食品としてそのまま直接飲用する場合には、嗜好性の面で工夫が必要である。それ故、通常、各種の精製処理を施して有効成分以外の苦味、酸等を除去し、IPP及び又はVPPを基本骨格とするACEIペプチドの含有率が高い、固形状態で使用に供するのが一層好ましい。

【0005】

尚、この乳酸菌、又は乳酸菌と酵母を培養することによって得られる発酵液中に生産されたIPP及びVPPを基本骨格とするACEIペプチド及び蛋白は、一部分が分解され、その主たるACEI活性はIPP及び/又はVPPに由来する。

そこで、この発酵液から酸等を除去する方法として、発酵液の固液分離を行い、ACEIペプチドが多く溶解している液体ホエー画分を、例えば、電気透析処理、イオン交換樹脂処理、中空糸膜透析処理、逆浸透圧処理、クロマトグラフィー処理、及びこれらの組み合わせ等の方法で処理して精製した後、精製液を各種の乾燥法によって固形状態とする方法が考えられる。

【0006】

これらの精製手段の内、工業的に有利な方法の一つとして電気透析法が挙げられる。しかしながら、本発明の発酵液を固液分離して得た液体ホエー画分中には各種の無機塩類、糖質、酸、ACEIペプチド並びに各種の蛋白質等が多量溶解しており、電気透析に当たってイオンの移動速度が遅く、処理時間が長くなる。また、イオン交換膜が分極現象などにより目詰まりを起こし、効率良く脱イオン処理を行うことが困難である。

一方、IPP及びVPPの如き比較的小さい分子であるACEIペプチドは、イオン交換膜を通過してしまい易い。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

この発明の目的は、ACE阻害剤としての活性成分であるACEIペプチドの透過を最少限に抑えながら乳酸等の有機酸類を含むその他のイオン類を短時間に効率良く透過、除去して、ACEIペプチドを含有する乳酸発酵液を効率良く精製する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たACEIペプチドを含有する培養液を固液分離して得た上澄液を、電気透析法により精製するに当たって、拡散係数が $3.0 \sim 9.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{sec}$ 、より好ましくは、 $5.0 \sim 7.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{sec}$ であるアニオン交換膜を使用するときは、これらのイオン交換膜が孔が大きく、所謂ルーズなタイプの膜であるにも拘わらず、ACEIペプチドの透過を抑え、その他のイオンが短時間に効率良く除去されて、濃縮率、固形分除去率とも大きく改善されることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

【0009】

又、本発明を実施するに当たって、乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たACEIペプチドを含有する培養液を固液分離して得た上澄液を、予め適当な方法で濃縮した後、上記の方法で電気透析することによって、一層効率良く精製を行うことが出来る。

本発明において用いられる乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌の培養液は、通常の乳酸発酵の方法によって、例えば、日本特許第2782142号、2782153号の方法によって調製することが出来る。

【0010】

ここで行う乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たACEIペプチドを含有する培養液を、遠心分離等の方法により固液分離して得た上澄液の電気透析処理は、例えば、電気透析槽内に陰イオン交換膜及び陽イオン交換膜または、膜種類の異なる陰イオン交換膜を組み合わせて行う。その際、使用する陰イオン交換膜として、一般にルーズなタイプとして知られる、拡散係数が $3.0 \sim 9.0 \times 10^{-6}$ 、より好ましくは、 $5.0 \sim 7.0 \times 10^{-6}$ の選択透過性のアニオン交換膜を1種又は2種組み合わせて使用する。

電気透析処理の前に、乳酸菌培養液の上澄液を4～10分の1程度に濃縮したものを使用しても良い。

【0011】

尚、本発明で使用するイオン交換膜の拡散係数は、以下の方法で求めたものである。

測定方法：0.5N食塩溶液、膜、3N食塩溶液にて攪拌し、攪拌後の濃度変化を測定して、拡散係数を求める。

拡散係数 (cm²/秒) = 食塩移動量 (mol) / 時間 (秒) × 膜面積 (CM²) × ΔC (mol/cc)

【0012】

本発明で使用するカチオン交換膜には特に制限はなく、拡散係数が $3.0 \sim 5.0 \times 10^{-6}$ の透過性を有するタイプ、 $4.0 \sim 6.0 \times 10^{-6}$ の透過性を有するタイプのいずれであってもよい。

又、使用する電気透析装置、加電圧、濃縮液または電極液の組成、電流密度と培養液の上澄液の比電導率の比等には特に制限はない。電気透析温度は室温乃至50℃程度、処理時間は、3乃至10時間程度が好ましい。

【0013】

【実施例】

実施例1

日本特許第2782153号に記載された方法に準じて、乳酸発酵乳112kgを調製し、10,000rpmにて、5分間遠心分離を行った。この上澄液中には、IPPが2.1mg/100g、VPPが3.9mg/100g含まれていた。

なお、IPPの重量当たりのACE阻害活性は、VPPの1.7倍であるので、以下の式により求めたACEIペプチド活性値を、以後全ACEIペプチド量として表す。

ACEI ペプチド換算量 (VPP 換算 $\text{mg}/100\text{g}$) = IPP 量 ($\text{mg}/100\text{g}$)
 $\times 1.7 + \text{VPP 量 (mg}/100\text{g})$

【0014】

上に得た乳酸発酵乳の上澄液を、真空蒸発濃縮式濃縮機（日阪製作所製 日阪ロングプレート式蒸発機）を用いて、液量を7分の1に濃縮して得た濃縮ホエー（ pH 3.0、糖度 37.67、水分含量 62.2%、酸度 13.8%、ACEI ペプチド含有量 52.4 $\text{mg}/100\text{g}$ ）3kgを、電気透析装置（株式会社トクヤマ製、「TS-2-10型」）を用いて、以下の通り電気透析処理を行った。アニオン交換膜（株式会社トクヤマ製、商品名「ネオセプタAMX」、拡散係数： $6.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{sec}$ 、1枚の膜有効面積 2dm^2 ）およびカチオン交換膜（株式会社トクヤマ製、商品名「ネオセプタCMX」、拡散係数： $5.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{sec}$ 、1枚の膜有効面積 2dm^2 ）10対を使用、槽電圧 14.2 V、初期電流値 2.94 A、最終電流値 1.41 A、液温 15～30℃、通電量 15.5 AHにて620分通電した。

結果を表1に示した。

【0015】

【表1】

	初発液	終了液
液量 (kg)	3.0	1.63
酸度 (重量%)	13.8	0.94
濃縮倍率 (%) ※1	—	184
固形分除去率 (%) ※2	—	60
ACEI ペプチド 含有量 ($\text{mg}/100\text{g}$)	52.4	80.9
ACE阻害 活性 (U/g)	0.63	0.97

尚、ACE阻害活性 (U/g) 1単位は、ACEを
50%阻害する力価

※1 濃縮倍率 = 電気透析前液量 / 電気透析後液量

【0016】

【数1】

(電気透析前総固形分 - 電気透析後総固形分)

※2 固形分除去率 = $\frac{\text{電気透析前総固形分} - \text{電気透析後総固形分}}{\text{電気透析前総固形分}} \times 100 (\%)$

【0017】

実施例 2

拡散係数が各々異なるアニオン交換膜を使用したこと及び所要時間が異なる外は上記と全く同じ条件で電気透析を行った。結果を表2に示した。

【0018】

【表2】

10

20

30

40

拡散係数 ($\times 10^{-6}$ cm/sec)		1	3	5	7	9	11
液量 (kg)	初発液	3	3	3	3	3	3
	終了液	2.3	2.07	1.7	1.7	1.5	1.4
処理時間 (分)		760	700	620	620	580	530
酸度 (重量%)	初発液	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8
	終了液	0.93	0.94	0.94	0.95	0.93	0.94
濃縮率 (%)		130	145	176	176	200	214
固形分除去率 (%)		38	50	59	59	64	69
ACEIペプチド含有量 (mg/100g ホエー)	初発液	52.4	52.4	52.4	52.4	52.4	52.4
	終了液	65.2	65.3	80.8	80.7	66.4	56.8
ACE阻害活性 (U /固形物g)	初発液	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
	終了液	2.5	2.8	3.5	3.5	2.9	2.7

10

【0019】

【発明の効果】

本発明の方法によって、乳酸菌、又は乳酸菌及び酵母菌を培養して得たアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する培養液を固液分離して得た上澄液を、電気透析法により精製するに当たって、拡散係数が $3.0 \sim 9.0 \times 10^{-6}$ 、好ましくは $5.0 \sim 7.0 \times 10^{-6}$ であるアニオン交換膜を使用することによって、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドの透過を最少限に抑えながら乳酸等の有機酸類を含むその他のイオン類を短時間で効率良く透過、除去して、ACEIペプチドを含有する乳酸発酵液を効率良く精製することが出来る。

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 6 1 K 38/00 (2006.01)
C 1 2 N 9/99 (2006.01)
A 2 3 L 1/305 (2006.01)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)
C 1 2 R 1/645 (2006.01)

F I

A 6 1 K 37/02
C 1 2 N 9/99
A 2 3 L 1/305
C 1 2 P 21/00 B
C 1 2 P 21/00 B
C 1 2 R 1:645

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00
C12P 1/00-41/99
C12Q 1/00-70
G01N 33/00-98
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)