

(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2009-296910

(P2009-296910A)

(43) 公開日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 2 3 C 9/127 (2006.01)	A 2 3 C	9/127	2 B 1 5 0
A 2 3 L 2/38 (2006.01)	A 2 3 L	2/38 P	4 B 0 0 1
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L	1/30 Z	4 B 0 1 7
A 2 3 L 1/305 (2006.01)	A 2 3 L	1/305	4 B 0 1 8
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20 A	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L			(全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-152950 (P2008-152950)	(71) 出願人	000006127
(22) 出願日	平成20年6月11日 (2008.6.11)		森永乳業株式会社
			東京都港区芝5丁目33番1号
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100108578
			弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義
		(74) 代理人	100107836
			弁理士 西 和哉
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフィドバクテリウム属菌含有組成物及びビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法

(57) 【要約】

【課題】ビフィズス菌の増殖性が非常に良好であり、かつ、品質が安定した、風味的にも良好なビフィズス菌含有組成物、及び該ビフィズス菌含有組成物の製造方法の提供。

【解決手段】細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - envelope d proteinase、PrtP) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属菌とを有することを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物、及び該ビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - enveloped proteinase、Pr t P) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属菌とを有することを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 2】

前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis) であることを特徴とする、請求項 1 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 3】

前記ラクトコッカス・ラクチスが、キシロース資化性を有さず、かつ、ダイアセチル及びアセトインを生成しないことを特徴とする、請求項 2 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 4】

前記乳タンパク質がカゼインであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 5】

前記ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 6】

前記ビフィドバクテリウム・ロンガムが、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC BAA-999 株及び / 又はビフィドバクテリウム・ロンガム タイプストレイン ATCC 15700 株であることを特徴とする請求項 5 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 7】

食品、サプリメント、医薬品、及び飼料からなる群より選択される 1 であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 8】

発酵乳又は乳酸菌飲料である請求項 7 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物。

【請求項 9】

細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - enveloped proteinase、Pr t P) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分を添加した、乳タンパク質を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属菌を接種することを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 10】

細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - enveloped proteinase、Pr t P) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分を添加した、乳タンパク質を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属菌を接種した後、発酵させることを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 11】

前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis) であることを特徴とする、請求項 9 又は 10 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 12】

前記ラクトコッカス・ラクチスが、キシロース資化性を有さず、かつ、ダイアセチル及びアセトインを生成しないことを特徴とする、請求項 11 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記乳タンパク質がカゼインであることを特徴とする請求項 9 ~ 12 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 14】

前記ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) であることを特徴とする請求項 9 ~ 13 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 15】

前記ビフィドバクテリウム・ロンガムが、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC BAA-999 株及び / 又はビフィドバクテリウム・ロンガム タイプストレイン ATCC C15700 株であることを特徴とする請求項 14 記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

10

【請求項 16】

前記ビフィドバクテリウム属菌含有組成物が、食品、サプリメント、医薬品、及び飼料からなる群より選択される 1 であることを特徴とする請求項 9 ~ 15 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【請求項 17】

前記ビフィドバクテリウム属菌含有組成物が、発酵乳又は乳酸菌飲料であることを特徴とする請求項 10 ~ 15 のいずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - envelope d proteinase、Prtp) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌とを有するビフィドバクテリウム属菌含有組成物、及び該ビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌、すなわちビフィズス菌は、ヒトの腸管内で形成される腸内菌叢の優勢菌種の一つであり、腸内細菌のバランスを回復する整腸作用や、免疫増強作用、発ガン抑制作用等を有することが知られている。このため、近年、生活者の健康志向の高まりと共に、ビフィズス菌発酵乳等の生きているビフィズス菌を含む食品への需要が高まっている。

30

【0003】

ビフィズス菌は、乳性培地における増殖性が悪い。このため、発酵乳中に一定量の、例えば 1×10^7 CFU/mL のビフィズス菌を含有させるために、通常、酵母エキス等の様々な増殖促進物質を添加することが行われている。しかし、該増殖促進物質は一般的に高価であり、かつ、風味が損なわれるおそれもある。

【0004】

40

ビフィズス菌以外の乳酸菌と混合発酵をさせることにより、該生育促進物質等を添加することなく、ビフィズス菌の生育性や保存生残性を改善する種々の方法が開示されている。発酵乳製造におけるビフィズス菌の生育性を改善させる方法については、例えば、(1) ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 及びビフィズス菌属を含有することを特徴とするヨーグルト及びその製造方法が開示されている (例えば、特許文献 1 参照。)。

【0005】

その他、発酵乳のビフィズス菌の保存生残性を改善させる方法については、例えば、(

50

2) 乳を主成分とする培地で、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、並びにダイアセチル及びアセトインを生成しないラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスを混合培養することを特徴とするビフィズス菌発酵乳の製造方法が開示されている(例えば、特許文献2参照。)

【特許文献1】特許第3364491号公報

【特許文献2】特許第3068484号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記(1)の方法では、必ずしも十分なビフィズス菌の生育促進及び発酵時間短縮の効果があるとは言えない。また、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスとラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスの2種類の菌が存在する条件下でビフィズス菌の生育が促進されるとされているが、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス又はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスをそれぞれ単独で用いた場合の効果については、一切記載がない。

一方、上記(2)の方法では、特定のビフィズス菌と特定の乳酸菌とからなる混合菌を用いることにより、増殖促進効果と生残性改善効果の両方が認められるものの、ビフィドバクテリウム・ブレーベ以外のビフィズス菌、例えば食品に汎用されているビフィドバクテリウム・ロンガムについては、一切記載がない。

【0007】

また、上記(1)及び(2)の方法のいずれも、ビフィズス菌とラクトコッカス乳酸菌の生菌を共培養しており、このため、ラクトコッカス属菌の生育管理が必要であり、ラクトコッカス乳酸菌の生育状況によりビフィズス菌増殖促進効果に変動をきたす可能性があり、常に品質が安定した製品を供給するためには問題があった。また、生菌を利用した場合、発酵中にラクトコッカス乳酸菌自身が増殖することにより、発酵産物にラクトコッカス乳酸菌発酵による独特な風味が伴うことがあり、好まれないことが多いという問題もあった。

【0008】

本発明は、ビフィズス菌の増殖性が非常に良好であり、かつ、品質が安定した、風味的にも良好なビフィズス菌含有組成物、及び該ビフィズス菌含有組成物の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、細胞壁局在性タンパク質分解酵素PrtPを有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分と、乳タンパク質とを併用することにより、ビフィズス菌の増殖が促進されることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】

すなわち、本発明は、細胞壁局在性タンパク質分解酵素(*cell wall-developed proteinase*, PrtP)を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属菌とを有することを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)であることを特徴とする、前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、前記ラクトコッカス・ラクチスが、キシロース資化性を有さず、かつ、ダイアセチル及びアセトインを生成しないことを特徴とする、前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、前記乳タンパク質がカゼインであることを特徴とする前記いずれか記

10

20

30

40

50

載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) であることを特徴とする前記いずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィドバクテリウム・ロンガムが、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC BAA-999 株及び/又はビフィドバクテリウム・ロンガム タイプストレイン ATCC 15700 株であることを特徴とする前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、食品、サプリメント、医薬品、及び飼料からなる群より選択される 1 であることを特徴とする前記いずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、発酵乳又は乳酸菌飲料である前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - enveloped proteinase、Prtp) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分を添加した、乳タンパク質を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属菌を接種することを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、細胞壁局在性タンパク質分解酵素 (cell wall - enveloped proteinase、Prtp) を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された前記酵素画分を添加した、乳タンパク質を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属菌を接種した後、発酵させることを特徴とするビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) であることを特徴とする、前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記ラクトコッカス・ラクチスが、キシロース資化性を有さず、かつ、ダイアセチル及びアセトインを生成しないことを特徴とする、前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記乳タンパク質がカゼインであることを特徴とする前記いずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) であることを特徴とする前記いずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィドバクテリウム・ロンガムが、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC BAA-999 株及び/又はビフィドバクテリウム・ロンガム タイプストレイン ATCC 15700 株であることを特徴とする前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィドバクテリウム属菌含有組成物が、食品、サプリメント、医薬品、及び飼料からなる群より選択される 1 であることを特徴とする前記いずれか記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記ビフィドバクテリウム属菌含有組成物が、発酵乳又は乳酸菌飲料であることを特徴とする前記記載のビフィドバクテリウム属菌含有組成物の製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0011】

本発明のビフィズス菌含有組成物は、そのまま、あるいはビフィズス菌を培養することにより、従来に無くビフィズス菌、特にビフィドバクテリウム・ロンガムを多く含有する組成物であり、より整腸効果が高く、健康管理上も有用である。また、本発明のビフィズス菌含有組成物においてビフィズス菌の増殖促進活性を担っているのは、乳酸菌の菌体破

10

20

30

40

50

碎物又は画分であるため、乳酸菌の生菌を使用する組成物とは異なり、品質が安定した組成物を効率よく製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明のビフィズス菌含有組成物は、PrtP酵素を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画されたPrtP酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィズス菌とを有することを特徴とする。PrtP酵素を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画されたPrtP酵素画分と、乳タンパク質とを併用することにより、ビフィズス菌を従来になく良好に増殖させることができるため、本発明のビフィズス菌含有組成物は、ビフィズス菌含量の高い組成物又はその原料組成物である。PrtP酵素を有する乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画されたPrtP酵素画分と、乳タンパク質との併用により、ビフィズス菌増殖促進活性が得られる理由は明らかではないが、乳タンパク質を、PrtPを用いて加水分解することにより、ビフィズス菌増殖促進作用を有するオリゴペプチドが得られるためではないかと推察される。

10

【0013】

本発明において、PrtP酵素とは、細胞膜に存在し、細胞表面に活性部位が剥き出しになっている酵素である。PrtP酵素を有している乳酸菌としては、例えば、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*) やラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) 等のラクトコッカス属菌において、PrtPを有する菌株が幾つか報告されている。

20

【0014】

これまでに、ラクトコッカス・ラクチス由来のPrtP酵素には、P_I型（カゼインを余り分解せず、カゼインをC末端の近辺からよく分解する）、P_{III}型（カゼイン及びカゼインをC末端及びN末端の両方からよく分解する）及びその中間型（P_I/P_{III}型）が知られている（例えば、Reid, J.R. et al., *Applied and Environmental Microbiology*, 1994年、第60巻第3号、第801～806ページ参照。）。

具体的には、ラクトコッカス・ラクチス由来のPrtP酵素として、NCBI (National center for Biotechnology Information) にアクセッション番号AY542690、AY542691等として遺伝子配列が登録されているPrtP酵素等が挙げられる。

30

【0015】

ある乳酸菌が、PrtP酵素を有する乳酸菌であるか否かは、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 等の遺伝子解析技術を用いて、PrtP酵素をコードするPrtP遺伝子を有しているか否かを調べることにより確認することができる。

【0016】

PrtP酵素は、細胞外に酵素活性部位を有するため、培地中のタンパク質を分解することができる。例えば、乳酸菌が乳性培地で増殖するときに、PrtP酵素が、乳性培地中の乳タンパク質を分解し、乳酸菌の生育に必要となるオリゴペプチドやアミノ酸が提供される。このため、PrtP酵素を有するラクトコッカス・ラクチスは、10% (W/W) 還元脱脂粉乳培地で、25～30の温度範囲で16時間培養した時に、培地を凝固させることができるほど増殖が早く、強い発酵性を有する、という特徴がある。このような増殖性や発酵性が高いという特徴を利用して、PrtP酵素を有する乳酸菌を検出することもできる。その他、PrtP酵素活性を検出することによっても、PrtP酵素を有する乳酸菌を検出することができる。

40

【0017】

本発明に用いられる乳酸菌は、PrtP酵素を有するものであれば特に限定されるものではないが、ラクトコッカス属菌であることが好ましく、ラクトコッカス・ラクチスであ

50

ることがより好ましく、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスやラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス等であることがさらに好ましい。発酵乳等のビフィズス菌を原料とする乳製品において、従来から原料として使用されていることから、安全性が高いと考えられるためである。P r t P 酵素を有するラクトコッカス・ラクチスとしては、例えば、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス N B R C 1 0 0 6 7 6^T 株や、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス J C M 2 0 1 0 1 株等がある。

【0018】

本発明において用いられる P r t P 酵素含有乳酸菌 (P r t P 酵素を有する乳酸菌) の菌体破砕物は、該乳酸菌を P r t P 酵素の酵素活性を損なうことなく破砕することにより得られたものであれば、特に限定されるものではない。このような破砕方法として、例えば、超音波を利用した破砕処理、ガラスビーズ破砕処理、浸透圧ショックを利用した破砕処理等が挙げられる。なお、これらの破砕処理は、50 以下、好ましくは室温以下、より好ましくは10 以下の低温下において行うことが好ましい。加熱により、P r t P 酵素が失活してしまうためである。

10

【0019】

なお、菌体破砕物を調製するために用いられる P r t P 酵素含有乳酸菌は、生菌体であってもよく、死菌体であってもよいが、生菌体であることが好ましい。P r t P 酵素含有乳酸菌の生菌体は、常法により培養した乳酸菌をそのまま用いてもよく、凍結乾燥等の常法により調整した乾燥菌末であってもよい。培養した乳酸菌としては、培養に用いた培地ごと用いてもよく、遠心分離処理等により培地から菌体のみを回収した後、適当なバッファ等に懸濁させたものであってもよい。余分な培地等を除去し得ること、また濃縮や希釈により濃度を調整することも可能であることから、培地から回収した菌体をバッファ等に懸濁させたものを用いることが好ましい。

20

【0020】

培地から回収した菌体を懸濁させるバッファ等としては、乳酸菌を生菌の状態に懸濁させることができる溶媒であれば、特に限定されるものではなく、乳酸菌等の懸濁に通常用いられるバッファ等を用いることができるが、カルシウムイオンを含むバッファ等であることが好ましい。懸濁に用いられるバッファの pH としては、4.5 ~ 8.0 であることが好ましい。該バッファとして、例えば、MES バッファ、HEPES バッファ、リン酸バッファ等が挙げられる。その他、生理食塩水であってもよい。

30

【0021】

本発明において用いられる P r t P 酵素含有乳酸菌から分画された P r t P 酵素画分は、該乳酸菌から、P r t P 酵素の酵素活性を損なうことなく、P r t P 酵素を分画することにより得られたものであれば、特に限定されるものではない。例えば、培養後に培地から回収された乳酸菌を、バッファ中に懸濁して保持した後、遠心分離処理等によって菌体を除去することにより、乳酸菌の細胞表面から遊離した P r t P 酵素を含む上清を、P r t P 酵素画分として得ることができる。該バッファに、EDTA 等のキレート剤を添加することにより、乳酸菌の細胞表面から P r t P 酵素が遊離されやすくなるため、EDTA 等のキレート剤を添加したバッファを用いることが好ましい。このような上清を得るためのバッファとしては、例えば、上記生菌体の懸濁に用いることができるバッファとして挙げられたものに、EDTA 等のキレート剤を添加したものを用いることができる。また、バッファ中に乳酸菌を保持する温度は、50 未満であれば特に限定されるものではないが、4 ~ 37 程度であることが好ましく、30 程度であることがより好ましい。また、保持時間は、保持温度やバッファの種類等を考慮して適宜決定することができるが、1時間以内であることが好ましく、5 ~ 30 分間であることがより好ましく、5 ~ 15 分間であることがさらに好ましい。

40

【0022】

なお、このようにして得られた上清を、透析処理することにより、P r t P 酵素画分からキレート剤を除去することができる。さらに、分画された P r t P 酵素画分は、凍結濃

50

縮等の公知の手法により、P r t P 酵素活性を損なうことなく濃縮することもできる。その他、乳酸菌の菌体破砕物を、硫酸アンモニウム沈殿法やクロマトグラフィー法等の公知の分画手段を用いて分画することにより得られたP r t P 酵素画分であってもよい。

【0023】

また、これらのP r t P 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチスは、ダイアセチル及びアセトインを生成しないため、これらの乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分を用いることにより、風味の良い組成物を製造し得ることも期待できる。

【0024】

なお、このようにして調製されたP r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分は、適宜に凍結濃縮又は凍結乾燥した後に、ビフィズス菌含有組成物へ添加してもよい。

10

【0025】

本発明のビフィズス菌含有組成物中のP r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分の量は、ビフィズス菌の培養（発酵）時間、ビフィズス菌の接種量、ビフィズス菌の種類等を考慮して、適宜決定することができる。P r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分の量が多いほど、高いビフィズス菌増殖促進効果を得ることができる。たとえば、本発明のビフィズス菌含有組成物中のP r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分の濃度は、0.01重量%以上であることが好ましく、0.1重量%以上であることが好ましく、1重量%以上であることがさらに好ましい。

【0026】

本発明において用いられる乳タンパク質は、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の動物（但しヒトを除く）から採取された乳由来のタンパク質であれば、特に限定されるものではなく、食用に通常用いられる乳由来のタンパク質を適宜選択して用いることができる。本発明においては、産業上の利用価値の高い牛乳に含まれている乳タンパク質であることが好ましい。

20

また、牛乳タンパク質としては、カゼインであってもよく、ホエータンパク質（ホエー中に含まれるタンパク質）であってもよく、トータルミルクプロテインであってもよい。本発明において用いられる乳タンパク質としては、牛乳由来のカゼイン又はトータルミルクプロテインであることが好ましく、牛乳由来のカゼインであることがより好ましい。よりビフィズス菌増殖促進効果が高い乳タンパク質分解物を得ることができるためである。

30

なお、カゼイン、トータルミルクプロテイン、ホエータンパク質等の乳タンパク質は、常法により調製したものをを用いることができる。また、市販されているものをを用いてもよい。

【0027】

本発明のビフィズス菌含有組成物中の乳タンパク質濃度は、所望のビフィズス菌含有組成物の種類や、添加するP r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画されたP r t P 酵素画分の量、ビフィズス菌の種類、ビフィズス菌の接種量、ビフィズス菌の培養（発酵）時間等を考慮して適宜決定することができる。本発明においては、本発明のビフィズス菌含有組成物中の乳タンパク質濃度は、0.5重量%以上であることが好ましく、1重量%以上であることがより好ましい。菌体破砕物等との併用によるビフィズス菌増殖促進効果をより十分に得ることができるためである。

40

【0028】

本発明で用いられるビフィズス菌は、特に限定されるものではないが、ビフィドバクテリウム・ロンガムであることが好ましい。P r t P 酵素を有するラクトコッカス・ラクチスによる増殖促進効果が、より顕著に得られるためである。特に、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株や、ビフィドバクテリウム・ロンガムタイプストレインATCC 15700株であることが好ましい。

【0029】

本発明において、P r t P 酵素含有乳酸菌やビフィズス菌の前培養に用いられる培地は、通常用いられる培地であれば、特に限定されるものではなく、D i f c o（登録商標）

50

M17 Broth (Becton, Dickinson社製)等の市販の半合成培地であってもよく、還元脱脂粉乳培地等の乳性培地であってもよい。取り扱いが簡便であるため、還元脱脂粉乳培地が特に好ましい。該還元脱脂粉乳培地の濃度は、3% (W/W)以上が好ましく、8% (W/W)以上が特に好ましい。その他、前培養に用いられる培地には、酵母エキス等の生育促進物質や、L-システイン等の還元剤等を添加することができる。特にピフィズス菌は乳性培地での増殖性が低いため、生育促進物質を添加した培地を用いることが好ましい。例えば、0.1~1% (W/W)の酵母エキスを含有した培地を用いることができる。また、前培養に用いられる培地は、殺菌処理をしたものを用いる。該殺菌処理は、通常用いられる方法で行うことができ、例えば、80~122 で5~40分間、好ましくは85~95 で5~35分間の加熱処理により行うことができる。

10

【0030】

以下、本発明のピフィズス菌含有組成物及びピフィズス菌増殖促進作用について、さらに詳細に説明する。

1. ラクトコッカス・ラクチスの菌株のPrtP酵素保有性の検出

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676^T (ATCC19257^T)株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスATCC-9625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスNBRC12007 (NCDO 497)株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20101株、及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20128株が、PrtP酵素を保有しているか否かを確認した。

20

具体的には、ラクトース及びグルコースを0.5%添加したDifco (登録商標) M17 Broth (Becton, Dickinson社製)に、各菌株を3%接種し、30 で16時間培養した。遠心分離により菌体を得、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN社製)を用いてDNAを抽出し、PCR法によりPrtP遺伝子の保有性を確認した。PCRは参考文献 (Journal of Applied Microbiology, 2006年、第100巻、第1307~1317ページ。)に記載の手法に準じて行った。プライマーは、フォワードプライマーGBf (GCA AATACGGTGACGGCTGCGA)及びリバースプライマーGB2r (TGAGCATTATAATAGGTCCTTCTTCC)のプライマーセット、もしくはフォワードプライマーGHf (CA AATACGGTGACGGCTGCTAA)及びリバースプライマーGH2r (TAGCATTATAATAGGTCCTTCTGTC A)のプライマーセットを用いた。

30

【0031】

図1はPCR産物を電気泳動法により分離し、染色により検出したバンドパターンを示した図である。図1中、「1」は分子量マーカーを流したレーンであり、「2」はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676^T株のPCR産物、「3」はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20101株のPCR産物、「4」はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスNBRC12007株のPCR産物、「5」はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20128株のPCR産物、「6」はラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスATCC-9625株のPCR産物を、それぞれ流したレーンである。この結果、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676^T株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20101株にはPrtP遺伝子の保有が確認された。一方、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスATCC-9625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスNBRC12007株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM20128株では、のそれぞれの菌株には保有していないことが判明した。

40

【0032】

2. PrtP酵素含有菌体破砕物によるピフィズス菌増殖促進作用

50

まず、ラクトース及びグルコースを0.5%添加したDifco(登録商標) M17 Broth(Becton, Dickinson社製)にてPrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株をそれぞれ3%接種し、30℃で16時間培養した。その後、遠心分離により集菌し、洗浄後、滅菌水を用いて元培養液の10分の1容量に懸濁した。次に、超音波破碎機(BRANSON SONIFIER 450)を用いて10分間以上の超音波破碎処理を行い、菌体を破碎した後、遠心分離(5000×g、10分)により未破碎菌体を除き、菌体破碎物を得た。なお、菌体破碎物に生きている細胞が存在しないことは、顕微鏡観察及びコロニー培養で確認した。また、菌体破碎物の一部を90℃で10分煮沸処理し、加熱処理を行った。

次に、後記実施例1に記載の方法で、ピフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャーを調製した。

10%(W/W)還元脱脂粉乳を含む乳性培地を、90℃で10分間殺菌し、前記のように調製したラクトコッカス・ラクチスの各菌株の菌体破碎物又は加熱処理した菌体破碎物を1%と、ピフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャー1%を接種し、37℃で16時間培養して発酵乳を得た。該発酵乳を急冷しピフィズス菌数を測定した。測定結果を表1に示す。なお、ピフィズス菌数の測定は、TOSプロピオン酸寒天培地(ヤクルト薬品工業社製)平板で行った。

【0033】

測定結果を表1に示す。無添加の発酵乳(組成物)と比べて、PrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株の菌体破碎物を添加した発酵乳では、ピフィズス菌数が 5×10^8 CFU/g以上に達し、無添加の発酵乳の20倍近くまで増えた。一方、加熱処理してPrtP酵素を失活させた菌体破碎物を添加した発酵乳では、無添加と比べて、ピフィズス菌数はあまり変化しなかった。

すなわち、PrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチスの菌株は、生きている完全な菌体細胞を有しなくても、PrtP酵素活性を有する菌体破碎物を添加することにより、ピフィズス菌に対する増殖促進性が優れていることが明らかである。

【0034】

【表1】

菌株	PrtP	ATCC BAA-999株	
		加熱処理前	加熱処理後
		菌数 (CFU/g)	菌数 (CFU/g)
NBRC 100676 ^T	+	5.0×10^8	4.1×10^7
JCM20101	+	5.3×10^8	4.5×10^7
無添加		2.7×10^7	

【0035】

3. PrtP酵素画分によるピフィズス菌増殖促進作用

まず、70mMのグリセロリン酸2ナトリウムを含む10%(W/W)還元脱脂粉乳を含む乳性培地を、95℃で30分間殺菌し、前記各菌株のシードカルチャーを3%接種し、30℃で16時間培養した。その後、1%のクエン酸3ナトリウムと水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH6.8に調整した後、遠心分離により菌体を得た。続いて、この洗浄菌体を、10mM EDTA・2Naを含む30mM MES-NaOHバッファ(pH 6.5)に懸濁し、30℃で10分間保持した。その後急冷し、4℃の遠心分離

(8500 × g、10分)により遊離したPrtP酵素を含む上清液を得た。このPrtP酵素画分を、10mM塩化カルシウムを含む30mM MES-NaOHバッファー(pH6.5)で一晩透析した後、凍結濃縮により50分の1容量まで濃縮し、これをPrtP酵素画分とした。また、PrtP酵素画分の一部を90℃で10分煮沸処理し、加熱処理を行った。

次に、後記実施例1に記載の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャーを調製した。

10%(W/W)還元脱脂粉乳を含む乳性培地を90℃で10分間殺菌し、前記のように調製したラクトコッカス・ラクチスの各菌株のPrtP酵素画分又は加熱処理したPrtP酵素画分を1%と、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャー1%とを接種し、37℃で16時間培養して発酵乳を得た。該発酵乳を急冷し、上記2と同様にしてビフィズス菌数を測定した。

【0036】

測定結果を表2に示す。無添加の発酵乳(組成物)と比べて、PrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株のPrtP酵素画分を添加した発酵乳では、ビフィズス菌数が 3×10^8 CFU/g前後に達し、無添加の組成物の20倍以上まで増えた。一方、加熱処理してPrtP酵素を失活させたPrtP酵素画分を添加した発酵乳では、無添加の発酵乳と比べて、ビフィズス菌数はあまり変化しなかった。

すなわち、PrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチスの菌株の菌体破砕物が有するビフィズス菌増殖促進活性は、PrtP酵素活性に依存していることが明らかである。

【0037】

【表2】

		ATCC BAA-999株	
		加熱処理前	加熱処理後
菌株	PrtP	菌数 (CFU/g)	菌数 (CFU/g)
NBRC 100676 ^T	+	2.7×10^8	1.6×10^7
JCM20101	+	3.1×10^8	3.4×10^7
無添加		1.1×10^7	

【0038】

4. 特許文献1、2記載の乳酸菌と本発明のラクトコッカス・ラクチスとの比較

まず、上記2及び3記載の方法で、PrtP酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株の菌体破砕物及びPrtP酵素画分をそれぞれ調製した。

次に、後記実施例1に記載の方法で、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャーを調製した。

さらに、0.2%(W/W)酵母エキス(Difco社製)入り10%(W/W)還元脱脂粉乳培地1000mLを90℃で30分間殺菌し、文献2記載のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスのタイプストレインATCC19435株のカルチャーを30mL接種し、30℃で16時間培養して、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスのタイプストレインATCC19435株のカルチャーを調製した

。

10% (W/W) 還元脱脂粉乳を含む乳性培地を 90 で 10 分間殺菌し、前記のように調製したラクトコッカス・ラクチスの各菌株の菌体破砕物又は P r t P 酵素画分を 1% と、ビフィドバクテリウム・ロンガム タイプストレイン A T C C B A A - 9 9 9 株のカルチャー 1% を接種し、37 で pH が 4.6 になるまで培養して発酵乳を得た。該発酵乳を急冷し、ビフィズス菌数を測定した。

一方、対照として、10% (W/W) 還元脱脂粉乳培地を 90 で 10 分間殺菌し、上記のように調整したラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスのタイプストレイン A T C C 1 9 4 3 5 株のカルチャー 1% と、ビフィドバクテリウム・ロンガム A T C C B A A - 9 9 9 株のカルチャー 1% を接種し、37 で 16 時間培養して発酵乳を得た。該発酵乳を急冷し、pH 及び含有されるビフィズス菌数を測定した。

また、10% (W/W) 還元脱脂粉乳培地を 90 で 10 分間殺菌し、上記のように調整したビフィドバクテリウム・ロンガム A T C C B A A - 9 9 9 株のカルチャー 1% と、特許文献 1 記載のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスとラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスの混合物「E Z A L M A 1 4」(R h o d i a 社製) 2% を接種し、37 で pH が 4.6 になるまで培養して得た発酵乳のビフィズス菌数を同様に測定した。なお、「E Z A L M A 1 4」は、特許文献 1 に記載の「E Z A L M R 0 1 4」(R h o d i a 社製) に相当する混合物である。

なお、得られた発酵乳のビフィズス菌数は、上記 2 と同様にして測定した。

【0039】

測定結果を表 3 に示す。P r t P 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス N B R C 1 0 0 6 7 6 株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス J C M 2 0 1 0 株の菌体破砕物又は P r t P 酵素画分を添加した発酵乳では、ビフィズス菌数が 3×10^8 C F U / g 前後に達した。これに対し、「E Z A L M A 1 4」を用いた発酵乳を 10^6 倍に希釈した希釈溶液からは、ビフィズス菌が全く検出されず、該発酵乳に含有されるビフィズス菌数は 1×10^6 C F U / g 以下であることが判明した。

すなわち、特許文献 1 記載のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスとラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスを、ビフィドバクテリウム・ロンガムとを、混合培養した場合には、ビフィズス菌の生育促進及び発酵時間の短縮という効果を十分に得ることができないことが明らかである。

また、特許文献 2 記載のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスのタイプストレイン A T C C 1 9 4 3 5 株を用いた発酵乳では、16 時間発酵を行っても pH が 5.0 以上で凝固せず、発酵乳にならなかった。発酵終了後のビフィズス菌数は 1×10^8 C F U / g 以下であり、本発明の P r t P 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス菌株と比較して、ビフィズス菌の増殖促進作用は顕著に弱かった。

これらの結果から、P r t P 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチスであるラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス N B R C 1 0 0 6 7 6 株及びラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス J C M 2 0 1 0 株は、ビフィズス菌に対して増殖促進作用に優れることが明らかになった。

【0040】

10

20

30

40

【表 3】

菌株		ATCC BAA-999株 菌数 (CFU/g)
NBRC 100676 ^T	菌体破砕物	5.0×10^8
	PrtP 酵素画分	2.7×10^8
JCM20101	菌体破砕物	5.3×10^8
	PrtP 酵素画分	3.1×10^8
従来技術 (EZAL MA14)	生菌体	未検出
従来技術 (ATCC 19435)	生菌体	9.0×10^7

10

【0041】

本発明のビフィズス菌含有組成物は、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された PrtP 酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィズス菌とを有する組成物であればよく、ビフィズス菌を生菌として維持し得る適当なバッファーや、ビフィズス菌の培養培地に、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された PrtP 酵素画分と、乳タンパク質とを添加した組成物であってもよい。また、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された PrtP 酵素画分と、乳タンパク質と、ビフィズス菌とを混合した後、ビフィズス菌を培養したものであってもよい。高いビフィズス菌数を確保するために、ビフィズス菌スターターを、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物や PrtP 酵素画分を添加して発酵した組成物であることが好ましい。

20

【0042】

本発明においては、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された PrtP 酵素画分を添加した、乳タンパク質を含有する培地に、ビフィズス菌を接種した組成物や、該組成物を培養した組成物であることが好ましい。ここで、乳タンパク質を含有する培地としては、特に限定されるものではなく、所望のビフィズス菌含有組成物の種類等を考慮して適宜選択することができる。例えば、ビフィズス菌の培養に通常用いられる培地に乳タンパク質を添加した培地であってもよく、乳性培地であってもよい。本発明においては、乳性培地であることが好ましい。すなわち、本発明のビフィズス菌含有組成物としては、PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物又は前記乳酸菌から分画された PrtP 酵素画分を添加した乳性培地に、ビフィズス菌を接種した組成物や、該組成物を培養し発酵させた発酵乳や乳酸菌飲料であることがより好ましい。

30

【0043】

本発明において乳性培地としては、例えば、発酵乳を製造するために通常用いられる発酵用ベースを用いることができる。このような発酵用ベースは、例えば、牛乳、脱脂乳、生クリーム、バター、全粉乳、脱脂粉乳等に、必要に応じて蔗糖等の甘味料、ペクチン、果実、フルーツジュース、寒天、ゼラチン、油脂、香料、着色料、安定剤、還元剤等を配合し、常法に従って殺菌、均質化、冷却等することにより調製することができる。

40

【0044】

発酵用ベースへのビフィズス菌の添加量は、特に限定されるものではないが、ビフィズス菌の添加量が、発酵用ベースに対して 0.01 ~ 10 (V/V) % が好ましく、0.1 ~ 5 (V/V) % が特に好ましい。PrtP 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物や PrtP 酵素画分の添加量は、濃縮や凍結乾燥倍率に応じて適宜に調整すればよい。

50

【0045】

本発明のビフィズス菌含有組成物が、乳性培地中でビフィズス菌を培養した発酵乳である場合には、この培養温度は、30 ~ 40 が好ましく、36 ~ 38 が特に好ましい。ビフィズス菌が十分に生育可能な温度範囲であるためである。また、培養時間は、製造する発酵乳の種類によって適宜決定されるが、5 ~ 18時間が好ましい。

【0046】

培養後得られた発酵乳は、そのまま食品としてもよく、例えば、均質化して液状発酵乳や乳酸菌飲料に加工してもよい。その他、例えば、果汁、果実等を適宜添加してもよい。また、容器への充填等は、特に限定されるものではなく、通常用いられる方法で行うことができる。

10

【0047】

本発明のビフィズス菌含有組成物には、P r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分のビフィズス菌に対する増殖促進効果を阻害しない範囲において、ビフィズス菌の他に、他の乳酸菌を含有してもよい。該他の乳酸菌は、通常発酵乳の製造に用いられるものであれば、特に限定されないが、ストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・ブルガリクスが好ましい。ビフィズス菌の摂取量と、その他の乳酸菌を合わせた摂取量の、スターターとしての発酵用ベースへの接種比率は、P r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分のビフィズス菌に対する効果を阻害しない限り、特に限定されるものではないが、1000 : 1 ~ 10 : 1が好ましい。

20

【0048】

本発明のビフィズス菌含有組成物は、そのまま、又は培養（発酵）させることにより、従来に無くビフィズス菌、特にビフィドバクテリウム・ロンガム多く含有する組成物であり、より整腸効果が高く、健康管理上も有用である。また、本発明のビフィズス菌含有組成物においてビフィズス菌の増殖促進活性を担っているのは、乳酸菌の菌体破砕物又は画分であるため、乳酸菌の生菌を使用する組成物とは異なり、品質が安定した組成物を効率よく製造することができる。

【0049】

このため、本発明のビフィズス菌含有組成物は、発酵乳や乳酸菌飲料を含む食品、サプリメント、飼料、医薬品として広く利用することが可能である。例えば、ビフィズス菌と、P r t P 酵素含有乳酸菌の菌体破砕物やP r t P 酵素画分、乳タンパク質、乳糖などの原料を用いてビフィズス菌を培養し、遠心集菌した後、さらに凍結乾燥しビフィズス菌体を得る。この乾燥菌体をさらに澱粉や乳糖などの原料と均一に混合し、サプリメント、飼料、医薬品などの整腸剤を作ることが可能である。

30

【実施例】

【0050】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0051】

[実施例1] 菌体破砕物を有するビフィズス菌含有組成物の調製1

まず、ラクトース及びグルコースを0.5%添加したD i f c o (登録商標) M 1 7 B r o t h (B e c t o n , D i c k i n s o n 社製) 100Lを、121 で15分間殺菌し、P r t P 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC 100676株を3L接種し、30 で16時間培養した。遠心分離により集菌し、洗浄後、10Lの滅菌水に懸濁し、30分間の超音波処理(B R A N S O N S O N F I E R 450、10分間破砕処理)後、遠心分離により未破砕菌体を除き、菌体破砕物を得た。その後、菌体破砕物を凍結濃縮し、1Lの菌体破砕物を得た。

40

一方、0.2% (W/W) 酵母エキス入り11% (W/W) 脱脂粉乳培地1000mLを90 で30分間殺菌し、ビフィドバクテリウム・ロンガムA T C C B A A - 9 9 9 株のシードカルチャーを100mL接種し、37 で6時間培養した。また、10% (W/W) 還元脱脂粉乳培地1500mLを90 で30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サ

50

ーモフィルス（ハンゼン社製）とラクトバチルス・ブルガリクス（ハンゼン社製）の混合カルチャー50 mLを接種し、37 で5時間培養した。

これとは別に、脱脂粉乳、全粉乳及び蔗糖等の原料を混合溶解し、乳脂肪0.5%（W/W）、無脂乳固形分8.0%（W/W）、蔗糖8.0%（W/W）、ペクチン0.2%（W/W）からなるベース50 Lを、90 で10分間殺菌し、40 に冷却した。該殺菌したベースに、前記の通り調製したラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の菌体破砕物500 mLとビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャー500 mLを接種し、及びストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャー150 mLを接種し、120 mL容の紙容器に充填し、密封し、37 で7時間培養した後、直ちに冷却した。得られた発酵乳は乳酸酸度0.7%、pH4.6であり、 4.5×10^8 CFU/gのビフィズス菌を含有していた。この該発酵乳を10 で14日間保存した時のビフィズス菌数は 2.5×10^8 CFU/gであった。

【0052】

[実施例2] 菌体破砕物を有するビフィズス菌含有組成物の調製2

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の代わりにラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株を用いた以外は、実施例1と同様にして菌体破砕物を調製し、ビフィズス菌含有発酵乳を得た。得られた発酵乳は乳酸酸度0.7%、pH4.6であり、 4.8×10^8 CFU/gのビフィズス菌を含有していた。この該発酵乳を10 で14日間保存した時のビフィズス菌数は 2.8×10^8 CFU/gであった。

【0053】

[実施例3] PrtP酵素画分を有するビフィズス菌含有組成物の調製1

まず、70 mMのグリセロリン酸2ナトリウムを含む10%（W/W）還元脱脂粉乳を含む乳性培地100 Lを、95 で30分間殺菌し、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のシードカルチャーを3 L接種し、30 で16時間培養した。1%のクエン酸3ナトリウムと水酸化ナトリウム水溶液でpH6.8に調整した後、遠心分離により菌体を得た。得られた菌体を、5 Lの10 mM塩化カルシウムを含む30 mM MES-NaOH バッファー（pH6.5）で2回洗浄後、5 Lの10 mM EDTA・2Naを含む30 mM MES-NaOH バッファー（pH6.5）に懸濁し、30 で10分間保持した。その後急冷し、遠心分離（8500 × g、10分間、4 ）によりPrtP酵素を含む上清液を得た。この上清液を、10 mM塩化カルシウムを含む30 mM MES-NaOH buffer（pH6.5）で一晩透析し、凍結濃縮により2 L容量まで濃縮し、PrtP酵素画分を得た。

一方、0.2%（W/W）酵母エキス入り11%（W/W）脱脂粉乳培地1000 mLを90 で30分間殺菌し、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のシードカルチャーを100 mL接種し、37 で6時間培養した。また、10%（W/W）還元脱脂粉乳培地1500 mLを90 で30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サーモフィルス（ハンゼン社製）とラクトバチルス・ブルガリクス（ハンゼン社製）の混合カルチャー50 mLを接種し、37 で5時間培養した。

これとは別に、脱脂粉乳、全粉乳及び蔗糖等の原料を混合溶解し、乳脂肪0.5%（W/W）、無脂乳固形分8.0%（W/W）、蔗糖8.0%（W/W）、ペクチン0.2%（W/W）からなるベース50 Lを、90 で10分間殺菌し、40 に冷却した。該殺菌したベースに、前記の通り調製したラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のPrtP酵素画分500 mLとビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャー500 mLを接種し、及びストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャー150 mLを接種し、37 で7時間培養して発酵乳を得た。該発酵乳を直ちに攪拌冷却し、冷却発酵乳を15 MPaの圧力で均質化し、200 mL容のガラス容器に充填し、密封し、ドリンクヨーグルトを得た。得られたドリンクヨーグルトは乳酸酸度0.7%、pH4.6、

6.0 × 10⁸ CFU/g のビフィズス菌を含有していた。この該ドリンクヨーグルトを10 で14日間保存した時のビフィズス菌数は3.6 × 10⁸ CFU/g であり、生残率は60%であった。

【0054】

[実施例4] PrtP 酵素画分を有するビフィズス菌含有組成物の調製2

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の代わりにラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株を用いた以外は、実施例3と同様にしてPrtP 酵素画分を調製し、ビフィズス菌含有発酵乳を得た。得られた発酵乳は乳酸酸度0.7%、pH4.6であり、5.8 × 10⁸ CFU/g のビフィズス菌を含有していた。この該発酵乳を10 で14日間保存した時のビフィズス菌数は2.9 × 10⁸ CFU/g であった。

10

【0055】

[実施例5] 菌体破砕物を有するビフィズス菌含有整腸剤の調製1

まず、ラクトース及びグルコースを0.5%添加したDifco(登録商標) M17 Broth (Becton, Dickinson社製) 97Lを、121 で15分間殺菌し、PrtP 酵素遺伝子を有するラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株を3L接種し、30 で16時間培養した。遠心分離により集菌し、洗浄後、10Lの滅菌水に懸濁し、30分間の超音波処理(BRANSON SONIFIER 450、10分間破砕処理)後、遠心分離により未破砕菌体を除き、菌体破砕物を得た。その後、菌体破砕物を脱脂粉乳10%(W/W)からなる溶液(90 30分間殺菌済)20Lに懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の菌体破砕物1.5kgを得た。

20

一方、90 で30分間殺菌したカゼイン1000g、肉エキス500g、酵母エキス500g、ペプトン500g、乳糖2000g、K₂HPO₄ 500g、KH₂PO₄ 100g、シスチン40g及び水95Lの組成からなる培地に、実施例1の通り記載のビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株のカルチャー5Lを接種し、37 で16時間培養した。次いで、シャープレス型遠心分離機を用いて、遠心分離(15,000rpm)により菌体を集め、培地と同量の生理食塩水(90 30分間殺菌済)に再懸濁し、前記と同様遠心分離して再度集菌した。集めた菌体を、脱脂粉乳10%(W/W)、蔗糖1%(W/W)、グルタミン酸ソーダ1%(W/W)からなる溶液(90 30分間殺菌済)20Lに懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、1.0 × 10¹¹ CFU/g のビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株の菌体破砕物を含む粉末約1.2kgを得た。

30

さらに、乾燥殺菌した澱粉100kg、脱脂粉乳40kg及び砂糖58kgに、上記で得られたラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の菌体破砕物粉末1kg及びビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株を含む粉末1kgを加えて均一に混合し、乳タンパク、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676の菌体破砕物及びビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株の菌末を含有する整腸剤の組成物約200kgを得た。

40

【0056】

[実施例6] 菌体破砕物を有するビフィズス菌含有整腸剤の調製2

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の代わりにラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株を用いた以外は、実施例5と同様にして菌体破砕物を調製し、整腸剤の組成物を得た。

【0057】

[実施例7] PrtP 酵素画分を有するビフィズス菌含有整腸剤の調製1

まず、70mMのグリセロリン酸2ナトリウムを含む10%(W/W)還元脱脂粉乳を含む乳性培地97Lを、95 で30分間殺菌し、ラクトコッカス・ラクチス・サブ

50

スピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のシードカルチャーを3L接種し、30で16時間培養した。1%のクエン酸3ナトリウムと水酸化ナトリウム水溶液でpH6.8に調整した後、遠心分離により菌体を得た。得られた菌体を、5Lの10mM塩化カルシウムを含む30mM MES-NaOHバッファー(pH6.5)で2回洗浄後、5Lの10mM EDTA・2Naを含む30mM MES-NaOHバッファー(pH6.5)に懸濁し、30で10分間保持した。その後急冷し、遠心分離(8500×g、10分間、4)によりPr t Pを含む上清液を得た。この上清液を、10mM塩化カルシウムを含む30mM MES-NaOH buffer(pH6.5)で一晩透析し、凍結濃縮により2L容量まで濃縮した。さらに、脱脂粉乳10%(W/W)からなる溶液(9030分間殺菌済)20Lに懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のPr t P酵素画分の粉末1.1kgを得た。

10

さらに、乾燥殺菌した澱粉100kg、脱脂粉乳40kg及び砂糖58kgに、上記で得られたラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のPr t P酵素画分粉末1kg及び実施例5記載の方法で調製したビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株を含む粉末1kgを加えて均一に混合し、乳タンパク、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株のPr t P酵素画分及びビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株の菌末を含有する整腸剤の組成物約200kgを得た。

20

【0058】

[実施例8] Pr t P酵素画分を有するビフィズス菌含有整腸剤の調製2

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676株の代わりにラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株を用いた以外は、実施例7と同様にしてPr t P酵素画分を調製し、乳タンパク、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチスJCM2010株のPr t P酵素画分及びビフィドバクテリウム・ロンガムATCC BAA-999株の菌末を含有する整腸剤の組成物約200kgを得た。

【産業上の利用可能性】

【0059】

本発明のビフィズス菌含有組成物及びその製造方法により、生きているビフィズス菌を従来に無く多く含有する発酵乳を製造することができるため、発酵乳等の製造分野で利用が可能である。

30

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】ラクトコッカス・ラクチスの各菌株由来のDNAを鋳型として、Pr t P酵素遺伝子を検出するプライマーを用いてPCRを行った結果得られたPCR産物を、電気泳動法により分離し、染色により検出したバンドパターンを示した図である。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K 35/74	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	E	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/46	(2006.01)	A 6 1 K	35/74	A	4 C 0 8 7
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K	37/54		
A 6 1 P 1/12	(2006.01)	A 6 1 K	37/16		
A 2 3 K 1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/12		
A 2 3 K 1/08	(2006.01)	A 2 3 K	1/16	3 0 4 B	
A 2 3 K 1/165	(2006.01)	A 2 3 K	1/08		
A 2 3 K 1/00	(2006.01)	A 2 3 K	1/165	C	
		A 2 3 K	1/00	1 0 1	

(72)発明者 清水 金忠

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品基盤研究所内

(72)発明者 米澤 寿美子

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品基盤研究所内

Fターム(参考) 2B150 AB03 AC05 AC08 AD03 AD04 CC14 DD14 DD20 DD22 DF11
 4B001 AC05 AC25 AC31 EC99
 4B017 LC02 LK18 LK21 LK23 LL09 LP05
 4B018 MD20 MD71 MD86 MD87 ME14 MF01
 4B065 AA21X BB19 BB21 BB24 CA42
 4C084 AA02 BA44 CA04 CA38 DC02 DC50 MA02 NA14 ZA731
 4C087 AA01 AA02 BC56 BC59 CA09 MA02 MA52 NA14 ZA73