

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4832425号
(P4832425)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int. Cl. F I
A 2 3 F 3/16 (2006.01) A 2 3 F 3/16
A 2 3 L 1/30 (2006.01) A 2 3 L 1/30 Z

請求項の数 23 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2007-504743 (P2007-504743)	(73) 特許権者	000206956
(86) (22) 出願日	平成18年2月22日 (2006.2.22)		大塚製薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/303145		東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(87) 国際公開番号	W02006/090729	(74) 代理人	100065215
(87) 国際公開日	平成18年8月31日 (2006.8.31)		弁理士 三枝 英二
審査請求日	平成20年10月14日 (2008.10.14)	(74) 代理人	100108084
(31) 優先権主張番号	特願2005-47882 (P2005-47882)		弁理士 中野 睦子
(32) 優先日	平成17年2月23日 (2005.2.23)	(74) 代理人	100115484
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 林 雅仁
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10064	(74) 代理人	100124431
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10065		弁理士 田中 順也
		(72) 発明者	遠藤 理恵子
			徳島県徳島市川内町加賀須野463-10
			大塚製薬製品技術部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 茶-発酵飲料および茶飲料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の茶発酵液を含有することを特徴とする茶-発酵飲料。

【請求項2】

更に茶抽出液を含む請求項1に記載の茶-発酵飲料。

【請求項3】

乳酸菌を、粘膜免疫賦活作用を発揮する有効量含有する請求項1 または2 に記載の茶-発酵飲料。 10

【請求項4】

乳酸菌を、I g A 産生亢進作用を発揮する有効量含有する請求項1 または2 に記載の茶-発酵飲料。

【請求項5】

乳酸菌を、茶-発酵飲料中に 10^4 c f u / m L ~ 10^8 c f u / m L 含有する請求項1 ~ 4 の いずれか に記載の茶-発酵飲料。

【請求項6】

乳酸菌を、茶-発酵飲料中に 10^5 c f u / m L ~ 10^7 c f u / m L 含有する請求項1 ~ 5 の いずれか に記載の茶-発酵飲料。 20

【請求項 7】

ラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌および茶抽出液を含有することを特徴とする茶飲料。

【請求項 8】

乳酸菌を、粘膜免疫賦活作用を発揮する有効量含有する請求項 7 に記載の茶飲料。

【請求項 9】

乳酸菌を、IgA 産生亢進作用を発揮する有効量含有する請求項 7 に記載の茶飲料。

【請求項 10】

乳酸菌を、茶飲料中に 10^4 cfu/mL ~ 10^8 cfu/mL 含有する請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の茶飲料。

10

【請求項 11】

乳酸菌を、茶飲料中に 10^5 cfu/mL ~ 10^7 cfu/mL 含有する請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の茶飲料。

【請求項 12】

茶含有培地でラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌を培養する工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の茶 - 発酵飲料の製造方法。

20

【請求項 13】

茶 - 発酵飲料の乳酸菌含有量を、 10^4 cfu/mL ~ 10^8 cfu/mL に調整する工程を更に含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

茶含有培地が、茶由来のブリックス度 0.10 ~ 0.50 の茶抽出液であり且つ培養が、25 ~ 50 の温度で 12 時間 ~ 32 時間を要して行われる請求項 12 または 13 に記載の製造方法。

【請求項 15】

茶含有培地が、茶由来のブリックス度 0.18 ~ 0.30 の茶抽出液であり且つ培養が、30 ~ 40 の温度で 15 時間 ~ 20 時間を要して行われる請求項 12 ~ 14 のいずれかに記載の製造方法。

30

【請求項 16】

請求項 2 に記載の茶 - 発酵飲料の製造方法であって、下記の工程：

(1) 茶含有培地でラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌を培養して茶発酵液を得る工程、

および、

(2) 上記 (1) の工程によって得られた茶発酵液に茶抽出液を添加する工程、を含む方法。

40

【請求項 17】

(2) の工程において、茶抽出液を、最終的な茶 - 発酵飲料の茶由来のブリックス度が 0.10 ~ 0.50 となり、且つ乳酸菌含有量が 10^4 cfu/mL ~ 10^8 cfu/mL となるように茶発酵液に添加する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の茶飲料の製法であって、ラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌と茶抽出液とを混合する工程を含む茶飲料の製造方法。

【請求項 19】

50

茶抽出液を、最終的な茶飲料の茶由来のブリックス度が0.10～0.50となり、且つ乳酸菌含有量が 10^4 cfu/mL～ 10^8 cfu/mLとなるように乳酸菌と混合する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

粘膜免疫賦活作用を有する茶 - 発酵飲料の製造のための、ラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

【請求項21】

IgA産生亢進作用を有する茶 - 発酵飲料の製造のための、ラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

10

【請求項22】

粘膜免疫賦活作用を有する茶飲料の製造のための、ラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

【請求項23】

IgA産生亢進作用を有する茶飲料の製造のための、ラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス プラントラム (Lactobacillus plantarum) ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、茶 - 発酵飲料および茶飲料に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、以下の事項が知られている。

30

【0003】

(1) 伝統的に茶葉を発酵させることは知られており、碁石茶、プーアル茶、ミアン茶などの発酵茶が知られている。

【0004】

(2) 茶葉から茶葉中で増殖し得るラクトバチルス属プラントラム種菌(乳酸菌)を分離して液体培地で培養し、茶葉を熱湯に浸漬した後放冷し、この放冷物に前記培養菌を接種して所定期間発酵させてなる緑茶発酵物が知られている(特許文献1)。

【0005】

(3) 酵母及び細菌を用いて、茶またはコーヒーから、簡単な製造条件および比較的短い製造時間で大量の醗酵飲料を製造する方法が知られている(特許文献2)。

40

【0006】

(4) 粘膜免疫は、粘膜上に病原体が付着した際の最初に行われる感染防御機構である(非特許文献1)。

【0007】

(5) 粘液中の分泌型IgA(S-IgA)は、バクテリア、ウイルスなどの病原体に対する防御作用を示す(非特許文献2および3)とともに、微生物の産生する毒素を中和する役割も担っている(非特許文献4)。

【特許文献1】特許2876006号

【特許文献2】特開平9-220054号

【非特許文献1】Brandtzaeg, P. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 146:13 1989

50

【非特許文献2】Czinn, S, J. et al., Vaccine 11:637 1993

【非特許文献3】Renegar, K. et al., J. Immunol. 146:1972 1991

【非特許文献4】Brandtzaeg, P APMIS 103:1 1995; Kilian, M. et al Microbiol. Rev. 52:296 1988

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明はラクトバチルス属プランタラム種菌（乳酸菌）を用いて発酵させた茶、もしくは該菌を添加した茶であって、従来知られていない高いIgA産生亢進作用を有する飲料を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、先に優れた粘膜免疫賦活作用、生体防御機構向上作用などを奏し得、プロバイオティックスとして、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)に係る発明を特許出願した（特願2003-297570号、PCT/JP2004/012136）。

【0010】

本発明者らは、鋭意研究の結果、先に見出した乳酸菌は、これを茶抽出液に配合する場合に、お茶本来の風味などに悪影響を与えず、しかも上記乳酸菌の有する優れたIgA産生亢進作用または粘膜免疫賦活作用は保持されるという事実を見出した。また、該乳酸菌は茶抽出液中でも発酵（培養、増殖）容易であり、しかも、かくして得られる茶-発酵飲料は、お茶本来の風味などに悪影響を受けておらず、該乳酸菌に由来する優れたIgA産生亢進作用または粘膜免疫賦活作用を奏し得るという事実を見出した。本発明は、これらの知見を基礎として更に研究を重ねた結果、完成されたものである。

20

【0011】

本発明は、下記項1～23に記載の要旨の発明を提供する。

【0012】

項1．ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の茶発酵液を含有することを特徴とする茶-発酵飲料。

30

【0013】

項2．更に茶抽出液を含む項1に記載の茶-発酵飲料。

【0014】

項3．乳酸菌を、粘膜免疫賦活作用を発揮する有効量含有する項1または項2に記載の茶-発酵飲料。

【0015】

項4．乳酸菌を、IgA産生亢進作用を発揮する有効量含有する項1または項2に記載の茶-発酵飲料。

【0016】

項5．乳酸菌を、茶-発酵飲料中に 10^4 cfu/mL～ 10^8 cfu/mL含有する項1または項2に記載の茶-発酵飲料。

40

【0017】

項6．乳酸菌を、茶-発酵飲料中に 10^5 cfu/mL～ 10^7 cfu/mL含有する項1または項2に記載の茶-発酵飲料。

【0018】

項7．ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌および茶抽出液を含有することを特徴とする茶飲料。

【0019】

項8．乳酸菌を、粘膜免疫賦活作用を発揮する有効量含有する項7に記載の茶飲料。

50

【 0 0 2 0 】

項 9 . 乳酸菌を、I g A 産生亢進作用を発揮する有効量含有する項 7 に記載の茶飲料。

【 0 0 2 1 】

項 1 0 . 乳酸菌を、茶飲料中に 10^4 c f u / m L ~ 10^8 c f u / m L 含有する項 7 に記載の茶飲料。

【 0 0 2 2 】

項 1 1 . 乳酸菌を、茶飲料中に 10^5 c f u / m L ~ 10^7 c f u / m L 含有する項 7 に記載の茶飲料。

【 0 0 2 3 】

項 1 2 . 茶含有培地でラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌を培養する工程を含む、項 1 に記載の茶 - 発酵飲料の製造方法。

10

【 0 0 2 4 】

項 1 3 . 茶 - 発酵飲料の乳酸菌含有量を、 10^4 c f u / m L ~ 10^8 c f u / m L に調整する工程を更に含む、項 1 2 に記載の方法。

【 0 0 2 5 】

項 1 4 . 茶含有培地が、任意成分を含んでいてもよい、茶由来のブリックス度 0 . 1 0 ~ 0 . 5 0 の茶抽出液であり且つ培養が、2 5 ~ 5 0 の温度で 1 2 時間 ~ 3 2 時間を要して行われる項 1 2 または項 1 3 に記載の製造方法。

【 0 0 2 6 】

項 1 5 . 茶含有培地が、任意成分を含んでいてもよい、茶由来のブリックス度 0 . 1 8 ~ 0 . 3 0 の茶抽出液であり且つ培養が、3 0 ~ 4 0 の温度で 1 5 時間 ~ 2 0 時間を要して行われる項 1 2 または項 1 3 に記載の製造方法。

20

【 0 0 2 7 】

項 1 6 . 項 2 に記載の茶 - 発酵飲料の製造方法であって、下記の工程：

(1) 茶含有培地でラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌を培養して茶発酵液を得る工程、

および、

(2) 上記 (1) の工程によって得られた茶発酵液に茶抽出液を添加する工程、
を含む方法。

30

【 0 0 2 8 】

項 1 7 . (2) の工程において、茶抽出液を、最終的な茶 - 発酵飲料の茶由来のブリックス度が 0 . 1 0 ~ 0 . 5 0 となり、且つ乳酸菌含有量が 10^4 c f u / m L ~ 10^8 c f u / m L となるように茶発酵液に添加する、項 1 6 に記載の方法。

【 0 0 2 9 】

項 1 8 . 項 7 に記載の茶飲料の製法であって、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌と茶抽出液とを混合する工程を含む茶飲料の製造方法。

【 0 0 3 0 】

項 1 9 . 茶抽出液を、最終的な茶飲料の茶由来のブリックス度が 0 . 1 0 ~ 0 . 5 0 となり、且つ乳酸菌含有量が 10^4 c f u / m L ~ 10^8 c f u / m L となるように乳酸菌と混合する、項 1 8 に記載の方法。

40

【 0 0 3 1 】

項 2 0 . 粘膜免疫賦活作用を有する茶 - 発酵飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも 1 種の乳酸菌の使用。

【 0 0 3 2 】

項 2 1 . I g A 産生亢進作用を有する茶 - 発酵飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からな

50

る群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

【0033】

項22．粘膜免疫賦活作用を有する茶飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

【0034】

項23．I g A 産生亢進作用を有する茶飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用。

【0035】

本発明の茶 - 発酵飲料および茶飲料は、従来のお茶の味を大切に温存させたものである。特に、本発明の茶 - 発酵飲料は発酵させているにも拘わらず、発酵臭および従来が発酵茶などに特有の味を有しないかもしくは軽微にしたものである。本発明の茶 - 発酵飲料および茶飲料は、I g A 産生亢進作用および粘膜免疫賦活作用を奏し得ることを特徴としている。

10

【0036】

以下、本発明の茶 - 発酵飲料および茶飲料に利用する特定の乳酸菌につき詳述し、次いで、本発明の茶 - 発酵飲料および茶飲料につき詳述する。

【0037】

乳酸菌

20

本発明の茶 - 発酵飲料および茶飲料に利用する乳酸菌は、それぞれ、ラクトバチルス (Lactobacillus) ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス (Lactobacillus) ONRIC b0240 (FERM BP-10065)と命名される(以下、両者を、「ONRIC 乳酸菌」と総称する場合がある。)

【0038】

(1)スクリーニング

(1-1)起源微生物

起源微生物としては、ヒト腸内容物、植物性食品および動物性食品から分離され、大塚製薬株式会社大津栄養製品研究所で保存している乳酸菌を利用する。

【0039】

30

(1-2)スクリーニング方法

目的とする乳酸菌のスクリーニングは、マウスパイエル板細胞培養系を用いて、I g A 産生誘導能を指標として実施する。該I g A 産生能の試験方法の詳細は、後記試験例1に示すとおりである。

【0040】

(2)スクリーニングされた微生物

(2-1)ラクトバチルス ONRIC b0239

(a)肉眼的特徴

(a-1)MRS寒天培地

円形からやや不規則、半球形、平滑、乳白色

40

(a-2)BL寒天培地

円形からやや不規則、半球形、平滑、白褐色

(b)顕微鏡的特徴

桿菌で運動性を持たない。芽胞は形成しない。

【0041】

(c)生育温度

30~33 で良好に発育する。

【0042】

(d)生理学的、生化学的特徴

グラム染色性：陽性

50

糖資化性

Glycerol	—	
Erythritol	—	
D-Arabinose	—	
L-Arabinose	—	
Ribose	±	
D-Xylose	±	
L-Xylose	—	10
Adonitol	—	
β -Methyl-D-Xyloside	—	
Galactose	+	
D-Glucose	+	
D-Fructose	+	
D-Mannose	+	
L-Sorbose	—	
Rhamnose	—	
Dulcitol	—	20
Inositol	—	
Mannitol	—	
Sorbitol	+	
α -Methyl-D-Mannoside	+	
α -Methyl-D-Glucoside	±	
N-Acetyl-Glucosamine	+	
Amygdalin	+	
Arbutin	+	
Esculin	+	30
Salicin	+	
Cellobiose	+	
Maltose	+	
Lactose	+	
Melibiose	+	
Saccharose	+	
Trehalose	+	
Inulin	—	

Melezitose	—
D-Raffinose	+
Amidon	—
Glycogen	—
Xylitol	—
β -Gentiobiose	+
D-Turanose	—
D-Lyxose	—
D-Tagatose	—
D-Fucose	—
L-Fucose	—
D-Arabitol	±
L-Arabitol	—
Gluconate	—
2-Keto-Gluconate	—
5-Keto-Gluconate	—

10

以上の諸性質から、バージーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) に照らし、本菌株を Lactobacillus plantarum に属する菌株と同定し、Lactobacillus ONRIC b0239 と命名し、平成15年8月6日に、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6に住所を有する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (AIST) に寄託番号 FERM P-19469 として寄託した。該微生物は、現在、国際寄託に移管されており、その国際寄託番号は FERM BP-10064 である。

20

【0043】

(2-2) ラクトバチルス ONRIC b0240

(a) 肉眼的特徴

(a-1) MRS 寒天培地

円形からやや不規則、半球形、平滑、乳白色

(a-2) BL 寒天培地

円形からやや不規則、半球形、平滑、白褐色

(b) 顕微鏡的特徴

桿菌で運動性を持たない。芽胞は形成しない。

30

【0044】

(c) 生育温度

30~33 で良好に発育する。

【0045】

(d) 生理学的、生化学的特徴

グラム染色性：陽性

40

糖資化性

Glycerol	—	
Erythritol	—	
D-Arabinose	—	
L-Arabinose	—	
Ribose	±	
D-Xylose	—	
L-Xylose	—	
Adonitol	—	10
β -Methyl-D-Xyloside	—	
Galactose	+	
D-Glucose	+	
D-Fructose	+	
D-Mannose	+	
L-Sorbose	—	
Rhamnose	—	
Dulcitol	±	20
Inositol	—	
Mannitol	+	
Sorbitol	+	
α -Methyl-D-Mannoside	—	
α -Methyl-D-Glucoside	—	
N-Acetyl-Glucosamine	+	
Amygdalin	+	
Arbutin	+	
Esculin	+	30
Salicin	+	
Cellobiose	+	
Maltose	+	
Lactose	+	
Melibiose	+	
Saccharose	+	
Trehalose	—	
Inulin	—	
Melezitose	—	40
D-Raffinose	+	
Amidon	—	
Glycogen	—	

Xylitol	—
β -Gentiobiose	+
D-Turanose	—
D-Lyxose	—
D-Tagatose	—
D-Fucose	—
L-Fucose	—
D-Arabitol	—
L-Arabitol	—
Gluconate	—
2-Keto-Gluconate	—
5-Keto-Gluconate	—

10

以上の諸性質から、バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)に照らし、本菌株を Lactobacillus plantarum に属する菌株と同定し、Lactobacillus ONRIC b0240 と命名し、平成15年8月6日に、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6に住所を有する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(AIST)に寄託番号FERM P-19470として寄託した。該微生物は、現在、国際寄託に移管されており、その国際寄託番号はFERM BP-10065

20

【0046】

ONRIC 乳酸菌に認められる特有の粘膜免疫賦活作用およびこれに寄与するIgA産生亢進作用は、次のように考えられている。即ち、まず腸管免疫系を構成するパイエル板のM細胞が管腔にある抗原を取り込む。該抗原は樹状細胞などの抗原提示細胞によってCD4 T細胞に提示される。抗原特異的なT細胞の作用により、未熟なB細胞が成熟しつつ粘膜固有層に移動して最終的にIgA抗体産生細胞に分化する。このIgA産生亢進機構にONRIC 乳酸菌がどのように関与するかについては現在なお明確ではないが、少なくともONRIC 乳酸菌の存在によってIgA産生亢進がなされるためにはパイエル板のM細胞が抗原を取り込む必要があることから、ONRIC 乳酸菌はこの抗原としての機能を果たし得るものであると考えられる。この抗原としての機能を果たすという面からは、ONRIC 乳酸菌は、特に生菌である必要はなく、通常の一般的加熱滅菌操作によって滅菌されたものであってもよい。

30

【0047】

茶 - 発酵飲料

本発明の茶 - 発酵飲料は、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065) からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌(ONRIC 乳酸菌)の茶発酵液をその必須成分として含有することを特徴とする。必須成分としての茶発酵液は、茶を含有する培地でONRIC 乳酸菌を培養することにより調製される。本発明の茶発酵液には、培養後のONRIC 乳酸菌を含む。本発明において、ONRIC 乳酸菌を含む培養後の茶含有培地は、そのまま本発明の茶発酵液とすることができる。

40

【0048】

本明細書において、茶含有培地とは、適当な溶媒(好ましくは水または湯)に茶葉および/またはその粉碎物(粉末など)を含むものであっても、茶葉および/またはその粉碎物を、適当な溶媒(好ましくは水または湯)で抽出して得られる茶抽出液であってもよく、また、該茶抽出液を噴霧乾燥手段などにより粉末化して得られる粉末(粉末エキス)を、適当な溶媒(好ましくは水または湯)に含むものであってもよい。これらの培地の原料として利用することができる茶(茶葉、Tea Sinensis)には、例えば、煎茶、玉露、棒茶、粉茶、番茶、ほうじ茶、玄米茶、抹茶などに分類される各種の緑茶類を代表として、他に

50

、紅茶、烏龍茶、黒茶（プーアル茶、ミアン茶、碁石茶など）や、それら以外の植物からの茶様飲料であるハーブティー、ルイボス茶、甜茶、甘茶などが含まれる。これらは、一種単独で用いてもよく、二種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0049】

このような茶として具体的には、例えば、鉄観音茶、色種茶、水仙茶、黄金桂茶、煎茶、かぶせ茶などを挙げることができる。

【0050】

茶含有培地として、上記各種の茶葉および/またはその粉碎物を含む水または湯などを用いる場合、培地中に含まれる茶葉および/またはその粉碎物の量は、特に限定されるものではないが、一般には最終的な培地における茶由来のブリックス度が0.10~0.50、好ましくは0.18~0.30となるような範囲から選択することができる。

10

【0051】

「ブリックス度」とは、一般に溶液100gあたりの可溶性固形物重量(g)を表し、示差濃度計（例えば、デジタル示差濃度計 DD-5：株式会社アタゴ製）、屈折計などにより計測される。ブリックス度は、溶液中に複数の可溶性固形物が溶解している場合、それらの合計値として測定されるが、本明細書において、「茶由来のブリックス度」とは、茶由来の可溶性固形物の濃度に基づいて測定されるブリックス度を表す。即ち、「茶由来のブリックス度」は、茶含有培地、茶抽出液、最終的な飲料などの溶液100gあたりに含まれる茶由来の可溶性固形物重量(g)を表す。

【0052】

20

茶含有培地として、上記各種の茶葉および/またはその粉碎物の抽出液を用いる場合は、一般的に飲用されるお茶と同様に、これらの茶葉などを水または湯で抽出したものをを用いることができる。該抽出液の濃度は特に限定されるものではないが、通常、茶由来のブリックス度が0.10~0.50、好ましくは0.18~0.30となる範囲から選択される。

【0053】

また、茶を含有する培地として、上記各種の茶葉を原料とする粉末エキスを含む水または湯などを用いる場合、粉末エキスとして具体的には、例えば、FD緑茶エキスパウダー、FDジャスミン茶エキスパウダー、FD烏龍茶エキスパウダー（以上、三栄源社）、麦茶エキストラクトパウダー、紅茶エキストラクトパウダー、緑茶エキストラクトパウダー（以上、高砂香料工業株式会社）などをあげることができる。これらの粉末エキスは、一般にこれらのうちの一種単独もしくは二種以上を水または湯に溶解した水溶液の形態で培地として利用することができる。これらの粉末エキスの水または湯への添加量は、特に限定されるものではないが、通常、得られる水溶液の茶由来のブリックス度が0.10~0.50、好ましくは0.18~0.30の範囲となる量から選択される。

30

【0054】

本発明の茶発酵液は、例えば、上記茶を含有する培地にONRIC乳酸菌を $10^4 \sim 10^8$ cfu/mL（培地）となるように接種し、25~50の温度で、12時間~32時間培養することにより得ることができる。

【0055】

40

ここで、ONRIC乳酸菌の培養（発酵）は、予め適当な発酵用培地に該乳酸菌を接種して培養したスターターを利用する方法によるのが好ましい。ここでスターターとしては、例えば代表的には予め90~121、5~20分間通常の殺菌処理を行った発酵用培地、例えばMRS培地、10%脱脂粉乳培地などに、凍結保存菌体、凍結乾燥菌体などの形態のONRIC乳酸菌を接種して培養したものを挙げることができる。このようにして得られるスターターは、通常、ONRIC乳酸菌を $10^4 \sim 10^7$ cfu/g培養物程度含んでいるのが好ましい。

【0056】

スターターとして用いられる発酵用培地には、必要に応じてONRIC乳酸菌の良好な生育を行うための発酵促進物質、例えばグルコース、澱粉、蔗糖、乳糖、デキストリン、

50

ソルビトール、フラクトースなどの炭素源、ペプトンなどの窒素源、ビタミン類、ミネラル類などを加えることができる。

【0057】

スターターの調製および茶発酵液の調製におけるONRIC乳酸菌の培養条件は、一般に、発酵温度25～50程度、好ましくは30～40程度、発酵時間12～32時間程度、好ましくは15時間～20時間程度から選ばれる。特に好ましい培養条件としては、33、16時間をあげることができる。

【0058】

ONRIC乳酸菌の培養（発酵）の際には、更に必要に応じて、茶含有培地中に、該乳酸菌の維持、増殖などに適した栄養成分などの任意成分を適量含有させることもできる。該栄養成分の具体例としては、各微生物の培養のための培養培地に利用される例えばグルコース、澱粉、蔗糖、乳糖、デキストリン、ソルビトール、フラクトースなどの炭素源、例えばペプトンなどの窒素源、ビタミン類、ミネラル類、微量金属元素、その他の栄養成分などの各成分を挙げることができる。ビタミン類としては、例えばビタミンB、ビタミンD、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンKなどを例示できる。微量金属元素としては、例えば亜鉛、セレンなどを例示できる。その他の栄養成分としては、例えば乳果オリゴ糖、大豆オリゴ糖、ラクチュロース、ラクチトール、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖などの各種オリゴ糖を例示できる。これらのオリゴ糖の配合量は、特に限定されるものではないが、通常、得られる茶発酵液中に3重量%程度以下となる量範囲から選ばれるのが好ましい。

【0059】

かくして得られる茶発酵液は、そのまま本発明の茶-発酵飲料とすることができ、また、該茶発酵液を凍結乾燥などして得られる粉末エキスを水などに溶解して本発明の茶-発酵飲料とすることもできる。さらに、上記の如くして得られる茶発酵液を濃縮、または水などで希釈して本発明の茶-発酵飲料としてもよく、茶発酵液にさらに茶抽出液を加えて本発明の茶-発酵飲料としてもよい。ここで、茶発酵液に添加される茶抽出液は、上記の茶含有培地として使用される茶葉および/またはその粉碎物を適当な溶媒(好ましくは水または湯)で抽出して得られる茶抽出液と同様であり、また、該茶抽出液を噴霧乾燥手段などにより粉末化して得られる粉末(粉末エキス)を、水または湯などに溶解したものをを用いることもでき、その濃度は特に制限されない。

【0060】

本発明茶-発酵飲料中のONRIC乳酸菌の含有量は、茶発酵液を利用する場合もその凍結乾燥品などを利用する場合もいずれも、一般には、 $10^4 \sim 10^8$ cfu/mL前後、好ましくは $10^5 \sim 10^7$ cfu/mL前後となる量から適宜選択することができる。該乳酸菌の含有量は、茶含有培地の培養条件、菌の接種量などを変えることによって調整してもよく、茶発酵液を濃縮または希釈することにより調整してもよい。また、茶発酵液の粉末エキスをを用いる場合には、該粉末エキスの添加量を変えることによってONRIC乳酸菌の含有量を調整してもよい。

【0061】

茶発酵液に茶抽出液を加えて本発明の茶-発酵飲料とする場合、両者の配合割合は、例えば、両者を混合して得られる本発明茶-発酵飲料が、該乳酸菌を 10^4 cfu/mL～ 10^8 cfu/mL、好ましくは 10^5 cfu/mL～ 10^7 cfu/mL含み且つ該茶-発酵飲料の茶由来のブリックス度が0.10～0.50、好ましくは0.18～0.30の範囲となるように適宜決定することができるが、これに限定されない。

【0062】

ここで、cfu(コロニー形成単位)は下記方法により計測された生菌数で示されるものであって、実際に飲料中にこの数の生菌が含まれることを意味するものではない。即ち、本発明飲料は、一般には通常の加熱手段などによって殺菌されて製品とされるものであるため、該製品中には生菌は存在しない場合がある。そのような場合でも、該製品は殺菌前に計測された生菌数に相当する死菌が含まれており、本発明所期の効果を奏し得る。本

10

20

30

40

50

明細書において、このような殺菌処理などを施された飲料についての菌数は、殺菌処理などを施す前に計測した生菌数にて示すものとする。

【0063】

< 乳酸菌数の計測 >

生菌数の測定は、BCP加プレートカウント寒天培地を用いて33℃で混釈培養を行い、生育したコロニー数を計測することにより求められる。この生菌数と濁度とは関連するため、予め生菌数と濁度との相関を求めておくと、生菌数の測定に代えて濁度を測定することによって上記生菌数を計数できる。

【0064】

本発明茶 - 発酵飲料中へのONRIC乳酸菌の配合量は、上記菌数を目安として、調製される飲料の種類、利用する乳酸菌の種類などに応じて適宜変更することができる。

10

【0065】

本発明茶 - 発酵飲料には、更に必要に応じて、通常の飲食品と同様に、適当な可食性担体（食品素材）を添加することができる。

【0066】

かくして、本発明の茶 - 発酵飲料を得ることができる。本発明の茶 - 発酵飲料は、最終的に適当な容器に無菌的に充填して飲料製品とすることができる。この製品は、お茶本来の風味を有しているのに加えて、含有するONRIC乳酸菌に由来する特有の粘膜免疫賦活作用またはIgA産生亢進作用を有している。

【0067】

20

本発明茶 - 発酵飲料の摂取量は、これを摂取する生体の年齢、性別、体重、疾患の程度などに応じて適宜決定され、特に限定されるものではないが、一般には、該飲料中に含まれるONRIC乳酸菌数に換算して、1日ヒト1人当たりの乳酸菌摂取量（菌数）が約 $10^6 \sim 10^{10}$ cfuとなる範囲から選ばれるのがよい。従って、本発明茶 - 発酵飲料の摂取量はまた、該飲料中の菌数に応じて適宜選択され得るが、一般には約50～1000mLの範囲から選択されるのが好ましい。

【0068】

本発明はまた、粘膜免疫賦活作用またはIgA産生亢進作用を有する茶 - 発酵飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用をも提供

30

【0069】

茶飲料

本発明は、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌（ONRIC乳酸菌）を含む茶飲料をも提供する。この茶飲料は、該乳酸菌と茶抽出液とを必須成分として含有する。

【0070】

ここで、利用されるONRIC乳酸菌は、前述した本発明茶 - 発酵飲料の調製に利用される茶発酵液から単離して得られる菌体またはその凍結乾燥品などであってもよい。また、本発明の茶飲料に利用される乳酸菌は、ONRIC乳酸菌を、茶を含有しない適当な培地で培養して得られる、該乳酸菌を含む培養液の形態であってもよく、また、該培養液から単離して得られる菌体またはその凍結乾燥品などの形態であってもよい。

40

【0071】

茶を含有しない培地としては、前述したMRS培地、10%脱脂粉乳培地などの、通常の乳酸菌の培養に用いられることの知られている栄養培地の他、例えば野菜類、果実類、豆乳（大豆乳化液）などを発酵用原料物質として含む液をあげることができる。

【0072】

本発明茶飲料の製造に利用される乳酸菌は、これらの液中でONRIC乳酸菌を培養して得られる発酵液（培養液）の形態であってもよく、該発酵液を利用して得られる粗精製

50

品、精製品、これらの凍結乾燥粉末などであってもよい。

【0073】

発酵用原料物質として利用される野菜類および果実類には、各種野菜および果実の切断物、破砕物、磨砕物、搾汁、酵素処理物、それらの希釈物および濃縮物が含まれる。野菜類には、例えばカボチャ、ニンジン、トマト、ピーマン、セロリ、ハウレンソウ、有色サツマイモ、コーン、ビート、ケール、パセリ、キャベツ、ブロッコリーなどが含まれる。果実類には、例えばリンゴ、モモ、バナナ、イチゴ、ブドウ、スイカ、オレンジ、ミカンなどが含まれる。

【0074】

野菜または果実の切断物、破砕物または磨砕物は、例えば上記野菜類または果実類を洗浄後、必要に応じて熱湯に入れるなどのブランチング処理した後、クラッシャー、ミキサー、フードプロセッサー、バルパーフィッシャー、マイコロイダー(Mycolloider™, 特殊機化工業社製)などを用いて切断、破砕、磨砕することによって得ることができる。搾汁は、例えばフィルタープレス、ジュースミキサーなどを用いて調製することができる。また上記磨砕物を濾布などを用いて濾過することによっても搾汁を調製することができる。酵素処理物は、上記切断物、破砕物、磨砕物、搾汁などにセルラーゼ、ペクチナーゼ、プロトペクチン分解酵素などを作用させることによって調製できる。希釈物には水で1~50倍に希釈したものが含まれる。濃縮物には、例えば凍結濃縮、減圧濃縮などの手段によって1~100倍に濃縮したものが含まれる。

【0075】

発酵用原料物質の他の具体例である豆乳は、常法に従い、大豆原料から調製することができる。該豆乳には、例えば、脱皮大豆を水に浸漬後、コロイドミルなどの適当な粉碎機を用いて湿式粉碎処理後、常法に従いホモジナイズ処理した均質化液、水溶性大豆蛋白質を水中に溶解した溶解液なども包含される。

【0076】

乳酸菌を利用した発酵は、予めスターターを用意し、これを前記各種の発酵用原料物質に接種して発酵させる方法が好ましい。ここでスターターとしては、例えば代表的には予め90~121、5~20分間通常の殺菌処理を行った発酵用原料物質を添加した10%脱脂粉乳培地などに、ONRIC乳酸菌を接種して培養したものを挙げるができる。このようにして得られるスターターは、通常、ONRIC乳酸菌を $10^7 \sim 10^9$ cfu/g培養物程度含んでいる。

【0077】

スターターに用いる発酵用原料物質には、必要に応じてONRIC乳酸菌の良好な生育のための発酵促進物質、例えばグルコース、澱粉、蔗糖、乳糖、デキストリン、ソルビトール、フラクトースなどの炭素源、ペプトンなどの窒素源、ビタミン類、ミネラル類などを加えることができる。

【0078】

培養条件は、一般に、発酵温度20~45程度、好ましくは25~37程度、発酵時間10~30時間程度から選ばれる。

【0079】

また、本発明茶飲料の他方の必須成分である茶抽出液については、前記本発明茶 - 発酵飲料において茶発酵液に添加される茶抽出液についてと同様である。

【0080】

ONRIC乳酸菌と茶抽出液との配合割合は、例えば、両者を混合して得られる本発明茶飲料が、該乳酸菌を 10^4 cfu/mL ~ 10^8 cfu/mL、好ましくは 10^5 cfu/mL ~ 10^7 cfu/mL含み且つ該茶飲料の茶由来のブリック度が0.10~0.50、好ましくは0.18~0.30の範囲となるように適宜決定することができるが、これに限定されない。

【0081】

かくして、本発明の茶飲料を得ることができる。本発明の茶飲料は、最終的に適当な容

10

20

30

40

50

器に無菌的に充填して飲料製品とすることができる。この製品は、お茶本来の風味を有しているのに加えて、ONRIC乳酸菌に由来する粘膜免疫賦活作用またはIgA産生亢進作用を有している。

【0082】

本発明茶飲料の摂取量は、これを摂取する生体の年齢、性別、体重、疾患の程度などに応じて適宜決定され、特に限定されるものではないが、一般には、該飲料中に含まれるONRIC乳酸菌数に換算して、1日ヒト1人あたり乳酸菌数が約 $10^6 \sim 10^{10}$ cfuとなる範囲から選ばれるのがよい。従って、本発明茶飲料の摂取量はまた、該飲料中の菌数に応じて適宜選択され得るが、一般には約50～1000 mLの範囲から選択されるのが好ましい。

10

【0083】

本発明はまた、粘膜免疫賦活作用またはIgA産生亢進作用を有する茶飲料の製造のための、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064)およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)からなる群から選択される少なくとも1種の乳酸菌の使用をも提供する。

【発明の効果】

【0084】

本発明によれば、お茶本来の風味などに悪影響を与えず、優れたIgA産生亢進作用または粘膜免疫賦活作用を有する茶-発酵飲料または茶飲料が提供される。これらの摂取によれば、その優れたIgA産生亢進作用または粘膜免疫賦活作用に基づいて、生体防御作用を強化できると考えられる。

20

【0085】

本発明の茶-発酵飲料または茶飲料は、原料として用いる茶葉の種類や、茶発酵液、茶抽出液などの配合を変化させることによって、例えば、軽い香りと爽やかな酸味、軽い香りとキレのある味、濃褐色を呈しマイルドな味などを付与し得、お茶本来の飽きのこない味、香りなどを有し得る。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】ラクトバチルス ONRIC b0240の投与が、パイエル板細胞からのIgA産生に及ぼす結果を示すグラフである。

30

【図2】ラクトバチルス ONRIC b0240の投与がIgG産生に及ぼす影響を明らかにするグラフである。

【図3】ラクトバチルス ONRIC b0240死菌(2×10^9 cfu相当)摂取21日後のヒト唾液中総S-IgA量の変化を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0087】

以下、本発明を更に詳しく説明するため、本発明の茶-発酵飲料および茶飲料の製造方法を実施例としてあげ、次いで本発明の茶-発酵飲料および茶飲料に利用する特定の乳酸菌につき行った試験例をあげるが、本発明は、これらの例に限定されるものではない。

【0088】

各例中、%は特記しない限り重量%を示す。

40

【実施例1】

【0089】

茶-発酵飲料の製造方法1

(1)凍結保存菌体の製造

前前培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)10 mLに、
-80 で凍結保存したラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)を解凍して100 μ L加え、このものを33 で16時間静置培養することにより、本菌株の前前培養液(菌数:約 10^9 cfu/mL)を調製した。

50

【0090】

前培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)10mLに、前記で調製した前培養液100 μ Lを接種し、33にて16時間静置培養することにより、本菌株の前培養液(菌数:約 10^9 cfu/mL)を調製した。

【0091】

本培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)1Lに、前記で調製した前培養液10mLを接種し、33にて16時間静置培養することにより、本菌株の本培養液(菌数:約 10^9 cfu/mL)を調製した。

10

【0092】

集菌・洗浄

本培養液1Lを11000回転/分にて10分間遠心分離して菌体を回収し、121で15分間オートクレーブ滅菌したリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。さらに遠心分離にて菌体を回収し、再度滅菌済みリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、遠心分離にて菌体を回収した。緑茶エキスパウダー(三栄源社)2gを脱イオン水1000gで溶解後、121で15分間オートクレーブ滅菌した液に上記で回収した菌体を懸濁させ、懸濁液を80で保存した。かくして得られた凍結保存菌の菌数は、 1.6×10^9 cfu/mLであった。

【0093】

(2)茶-発酵飲料の製造

緑茶エキスパウダー(三栄源社)3.4gを脱イオン水2000g中に添加後、60に加温し、同温度で10分間攪拌してエキスを溶解させた。得られた溶液を室温まで冷却し、滅菌済み試薬瓶に2000mL移した。この溶液の茶由来のブリックス度は0.32であった。

20

【0094】

凍結保存したラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065) 1.6×10^9 cfu/mLの200 μ Lを前記試薬瓶中に接種し、菌接種後の試薬瓶内容物を33で16時間保温して静置培養することにより、緑茶発酵液を調製した。このものの乳酸菌量は 10^7 cfu/mLであった。

30

【0095】

一方、ウーロン茶(三井農林社)20gに、93の脱イオン水1000mLを加え、6分間隔でスタート時、中間および終了時の3回攪拌した。得られた茶葉を含む液を、ステンレスフィルターで濾過後、濾液を氷浴上で30以下に冷却した。冷却後の濾液を脱イオン水で2000mLに希釈した。得られた茶抽出液の茶由来のブリックス度は0.24であった。

【0096】

このウーロン茶(茶抽出液)1000mLに前記で調製した緑茶醗酵液1000mLを混合し、混合物に更にビタミンC500mg/Lを添加した。得られた混合液を加熱殺菌し、適当な容器に充填して、本発明の茶-発酵飲料を調製した。

40

【0097】

得られた本発明の茶-発酵飲料は、軽い香りと爽やかな酸味を有するものであった。そのpHは5.2であり、含まれる本発明の乳酸菌数は 5.2×10^6 cfu/mLであった。

【0098】

上記で得られた本発明の茶-発酵飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れたIgA産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

【実施例2】

【0099】

茶-発酵飲料の製造方法2

50

(1) 凍結乾燥菌体の製造

前前培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)10mLに、
-80 で凍結保存したラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)を解凍して100
μL加え、このものを33 で16時間静置培養することにより、本菌株の前前培養液(菌数：約 10^9 cfu/mL)を調製した。

【0100】

前培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)10mLに、
前記で調製した前前培養液100μLを接種し、33 にて16時間静置培養することにより、本菌株の前培養液(菌数：約 10^9 cfu/mL)を調製した。

10

【0101】

本培養

121 で15分間オートクレーブ滅菌したMRS液体培地(Difco製)1Lに、前記
で調製した前培養液10mLを接種し、33 にて16時間静置培養することにより、本
菌株の本培養液(菌数：約 10^9 cfu/mL)を調製した。

【0102】

集菌・洗浄

本培養液1Lを11000回転/分にて10分間遠心分離して菌体を回収し、121
で15分間オートクレーブ滅菌したリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。さらに遠心分離に
て菌体を回収し、再度滅菌済みリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、遠心分離にて菌体を回収
した。緑茶エキスパウダー(三栄源社)20gを脱イオン水1000gで溶解後、121
で15分間オートクレーブ滅菌した液に上記で回収した菌体を懸濁させ、懸濁液を凍結
乾燥した。かくして得られた凍結乾燥菌体粉末中の菌数は、 3.7×10^9 cfu/gであ
った。

20

【0103】

(2) 茶 - 発酵飲料の製造

緑茶エキスパウダー(三栄源社)4gを脱イオン水2000g中に添加後、60 に加
温し、同温度で10分間攪拌してエキスを溶解させた。得られた溶液を室温まで冷却し、
滅菌済み試薬瓶に2000mL移した。この液の茶由来のブリックス度は0.36であ
った。

30

【0104】

凍結乾燥したラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065) 3.7×10^9 cfu/g
の25mgを前記試薬瓶中に接種し、試薬瓶内容物を33 で16時間保温して、菌を静
置培養した。(想定初期菌数 5×10^4 cfu/mL)。

【0105】

かくして得られた培養液1000mLに、ビタミンC500mgを添加した後、得られ
た混合液を加熱殺菌し、適当な容器に充填して、本発明の茶 - 発酵飲料を調製した。

【0106】

(3) 茶 - 発酵飲料の品質評価

得られた茶 - 発酵飲料は、以下の物性を有するものであった。

40

<凍結乾燥菌を用いて得られた本発明の発酵茶>

pH：4.75

菌数： 4.1×10^6 cfu/mL(乳等省令(食品衛生法)乳酸菌数の測定法による)

濁度：0.038(分光光度計U-3000、日立)

乳酸含量：14.8mg/100mL(高速液体クロマトグラフィ、日本分光)

酢酸含量：0.6mg/100mL(高速液体クロマトグラフィ、日本分光)

クエン酸含量：1.2mg/100mL(高速液体クロマトグラフィ、日本分光)

茶由来のブリックス度：0.24(デジタル示差濃度計DD-5(株式会社アタゴ製))

50

官能評価：茶の風味があり、酸味が感じられる（供試茶を4で試飲させて評価）

上記で得られた本発明茶 - 発酵飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れたIgA産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

【実施例3】

【0107】

茶飲料の製造方法1

ウーロン茶（三井農林社）40gに、93の脱イオン水1000mLを加え、6分間でスタート時、中間および終了時の3回攪拌した。得られた茶葉を含む液を、ステンレスフィルターで濾過後、濾液を氷浴上で30以下に冷却した。得られた茶抽出液の茶由来のブリックス度は0.96であった。

10

【0108】

一方、予め、人参果汁15%を含む水溶液1000mLに、ラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM P-10065)の凍結保存菌（実施例1 - (1)で調製したもの）1mLを接種し、33で24時間培養後、培養液を遠心分離して60、10分間以上で殺菌した後、濃縮菌液（菌体含量：約 10^{10} cfu/mL）を調製した。

【0109】

前記ウーロン茶濾液（茶抽出液）1000mLに、上記ラクトバチルス ONRIC b0240の濃縮菌液4mLを添加し、得られた混合液中にビタミンC500mg/Lを添加して、更に水で全量を4000mLに希釈し、得られた希釈液を適当な容器に充填して、本発明茶飲料製品を調製した。

20

【0110】

かくして得られた本発明茶飲料は、軽い香りとキレのある味であった。そのpHは5.5であり、菌数は 2.6×10^7 cfu/mLであった。

【0111】

上記で得られた本発明茶飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れたIgA産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

【実施例4】

【0112】

茶飲料の製造方法2

実施例3において、原料として利用したウーロン茶に代えてプーアル茶（三井農林社）（得られた茶抽出液の茶由来のブリックス度は0.64である）を用い、ラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM P-10065)に代えてラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM P-10064)（実施例1 - (1)と同様にして調製した凍結保存菌体）を用い、同様にして、本発明茶飲料製品を調製した。

30

【0113】

得られた本発明の茶飲料は、濃褐色を呈しており、マイルドな味で、独特の香りがあった。そのpHは5.5であり、菌数は 2.6×10^7 cfu/mLであった。

【0114】

上記で得られた本発明茶飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れたIgA産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

40

【実施例5】

【0115】

茶 - 発酵飲料の製造方法3

実施例2において、ラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM P-10065)に代えてラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM P-10064)を用いて、同様にして、本発明茶 - 発酵飲料を調製した。

【0116】

得られた本発明茶 - 発酵飲料は、茶の風味があり、酸味があった。そのpHは5.0であり、菌数は 4.0×10^6 cfu/mLであった。

【0117】

50

上記で得られた本発明茶 - 発酵飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れた I g A 産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

【実施例 6】

【0118】

茶 - 発酵飲料の製造方法 4

実施例 1 において、原料として利用した緑茶エキスパウダーに代えて紅茶抽出エキスパウダーを用い、ウーロン茶に代えて紅茶を用い、ラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM P-10065) に代えてラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM P-10064) (凍結保存菌体) を用いて、同様にして、本発明の茶 - 発酵飲料を調製した。

【0119】

得られた本発明の茶 - 発酵飲料は、紅茶の味を保持したものであった。その pH は 5.8 であり、菌数は 1.2×10^7 cfu/mL であった。

【0120】

上記で得られた本発明の茶 - 発酵飲料は、後述する試験例に示すような試験において、優れた I g A 産生促進活性及び粘膜免疫賦活活性を有すると認められた。

【0121】

試験例 1

この例は、ONRIC 乳酸菌の I g A 産生誘導能を、Yasuiらおよび Ikenagaらに記載の方法 [Yasui, H., et al., Microbial Ecology in Health and Disease, 5, 155 (1992); Ikenaga, T., et al., Milk Science, 51, 27 (2002)] に従ってパイエル板細胞培養系を用いて in vitro で試験した例であり、次の通り実施された。

【0122】

(1) 供試動物

近交系雌性マウス SPF/VAF BALB/c AnNCrj を使用した。

【0123】

試験マウスを入荷後、1週間検疫した。検疫期間中は MF 固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由摂取させた。

【0124】

(2) パイエル板細胞培養法

検疫終了後、各群の体重が均等になるように 80 匹のマウスを 10 匹ずつ群分けした。群分け後、毎日 10 匹のマウスを屠殺し、小腸を取り出し、小腸からパイエル板を切り出し、MEM 培地 [イーグル MEM (NISSUI 社製)、2mM グルタミン (GIBCO 社製)、1mM ピルビン酸ナトリウム (GIBCO 社製)、MEM 非必須アミノ酸 (GIBCO 社製)] を添加した遠沈管中で氷冷した。メッシュを用いて単一細胞懸濁液を調製し、5 mL の MEM 培地によく洗い込んだ。細胞懸濁液を濾過し、4 下、1000 回転/分、10 分間遠心処理を行った。遠心後、培養上清を吸引除去し、沈殿を 5 mL の MEM 培地に懸濁させた。同様の操作を 2 回繰り返した後、沈殿を 10 mL の 5% FBS (GIBCO 社製) 含有 MEM 培地に懸濁させ、パイエル板細胞の生細胞数を計数し、細胞浮遊液を 96 ウェル細胞培養用プレートに播いて細胞培養用プレートを調製した。

【0125】

(3) 供試菌体の調製

供試菌体として、ラクトバチルス ONRIC b0239 (FERM BP-10064) およびラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065) を利用した。各菌は、それぞれその培養に適した培地にて定常期まで培養後、遠心して菌体を集菌した (7000 g × 10 分間、4 下)。PBS (-) にて 3 回洗浄後、菌体を 5 mL の生理食塩水に懸濁させた。菌数を把握するため 660 nm にて濁度を測定し、その後、オートクレーブにて 100 度で 30 分間加熱滅菌処理した。660 nm における濁度が 1.0 のとき菌数を 2.0×10^9 / mL とした。

【0126】

(4) 培養上清中の I g A 濃度の測定

上記 (2) で調製したパイエル板細胞を 5% FBS 含有 MEM 培地に懸濁させて、2 .

10

20

30

40

50

5×10^6 細胞/mLに調整し、その200 μ Lを96ウエル細胞培養用プレートに入れた。このプレートの各ウエルに 2.0×10^9 /mLの供試菌体懸濁液(前記(3)で調製したもの)を20 μ L添加し、37、5%CO₂下で7日間培養した。

【0127】

上記菌体20 μ Lに代えて、50 μ g/mLのLPS(リポポリサッカライド)を20 μ L添加したものを陽性対照とした。

【0128】

次いで、得られた各培養物上清の総IgA濃度を市販キットを用いたELISA法により測定した。

【0129】

(5) ONRIC乳酸菌のIgA産生促進活性

前記(4)に従って測定されたONRIC乳酸菌における総IgA量を、対照としてのMEM培地にPBS(-) 10 μ Lを添加して(菌体無添加)同様に7日間培養して得た培養物上清の同測定値を基準(1.0)として、その相対比(Stimulation Index; S.I.)にて、下記表1に示す。

【0130】

また、下記表1～表4には、既知の各種乳酸菌などについて行った同一試験の結果を併記する。また陽性対照(LPS 50 μ g/mL)における試験結果を「陽性対照」として併記する。表中、Strain No.に示される微生物保存機関の略号と名称は、それぞれ以下の通りである。

【0131】

ATCC: アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection; Manassas, VA, U.S.A.)

JCM: 理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganism, The Institute of Physical and Chemical Research, RIKEN)

NRIC: 東京農業大学応用生物化学部菌株保存室 (NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture; Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

【0132】

10

20

【表 1】

Strain No.		Genus	Species	Subsp.	IgA S.I.
		对照 (PBS)			1
		陽性对照 (LPS)			13.1
ONRIC	b0239	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		5.61
ONRIC	b0240	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		6.31
ATCC	43121	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		1.10
JCM	1059	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.20
JCM	1115	<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>		1.17
JCM	1134	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.03
JCM	1096	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1.63
JCM	1002	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	1.23
JCM	1012	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>delbrueckii</i>	1.41
JCM	1248	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	1.31
JCM	1173	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.08
JCM	1131	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>		1.15
JCM	1155	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		1.11
JCM	2012	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>		1.11
JCM	8572	<i>Lactobacillus</i>	<i>kefirgranum</i>		1.08
JCM	5818	<i>Lactobacillus</i>	<i>kefiri</i>		1.21
JCM	8130	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1.11
JCM	1171	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.11
JCM	1149	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.66
JCM	1551	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.14
JCM	8341	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.18
JCM	1112	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1.15
ATCC	7469	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>		1.05
JCM	1157	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	<i>sakei</i>	1.52
JCM	1150	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	<i>salicinius</i>	1.06
JCM	1231	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	<i>salivarius</i>	1.14
JCM	9504	<i>Lactobacillus</i>	<i>suebicus</i>		1.28
JCM	5885	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	(<i>pentosaceus</i>)	1.51
JCM	5890	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1.44
JCM	6124	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1
NRIC	0103	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		1.06
NRIC	0110	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		1.08
NRIC	0134	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.07
NRIC	0137	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.13
NRIC	1713	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.08
NRIC	1950	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.12
NRIC	1964	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.07
NRIC	1965	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1.07

【表 2】

Strain No.	Genus	Species	Subsp.	IgA S.I.
NRIC 1042	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.00
NRIC 1597	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	0.96
NRIC 1917	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.01
NRIC 1941	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.02
NRIC 1962	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.00
NRIC 1963	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.05
NRIC 1968	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1.07
NRIC 1975	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1.02
NRIC 1976	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1.14
NRIC 1977	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1.04
NRIC 1978	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1.11
NRIC 1979	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		0.99
NRIC0191	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	1.07
NRIC 1682	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	1.12
NRIC0129	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.00
NRIC0131	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.19
NRIC0132	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.03
NRIC0135	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.02
NRIC0139	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.14
NRIC0141	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.08
NRIC0142	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		0.94
NRIC0143	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.04
NRIC0144	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		0.97
NRIC0145	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.09
NRIC0146	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.05
NRIC0147	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.05
NRIC 1949	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.09
NRIC 1952	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.06
NRIC 1955	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1.12
NRIC 1966	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		0.94
NRIC 1967	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		1.06
NRIC 1936	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0.96
NRIC 1937	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0.94
NRIC 1942	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0.93
NRIC 1944	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1.00
NRIC 1945	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0.98
NRIC 1946	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1.01
NRIC 1934	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.09
NRIC 1935	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.03
NRIC 1938	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.03

10

20

30

40

【表 3】

Strain No.	Genus	Species	Subsp.	IgA S.I.
NRIC 1939	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.01
NRIC 1940	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1.01
NRIC 1943	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	0.99
NRIC 1947	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	0.98
NRIC 0391	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1.00
NRIC 0392	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1.04
NRIC 0393	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1.19
NRIC 0394	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1.15
NRIC 1919	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.32
NRIC 1920	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.08
NRIC 1921	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.14
NRIC 1922	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.37
NRIC 1923	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		0.96
NRIC 1957	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.01
NRIC 1958	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1.31
NRIC 1715	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		0.95
NRIC 1974	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1.16
NRIC 1980	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1.31
NRIC 1599	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		0.97
NRIC 1600	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1.52
NRIC 1601	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1.07
NRIC 1602	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1.37
NRIC 1603	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1.03
NRIC 1575	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		0.85
NRIC 1576	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		0.92
NRIC 1578	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1.00
NRIC 1580	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1.03
NRIC 1582	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		0.93
NRIC 1750	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1.03
NRIC 1087	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1.33
NRIC 1507	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1.02
NRIC 1541	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	0.90
NRIC 0124	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>		0.93
NRIC 0122	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1.03
NRIC 0123	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		0.96
NRIC 1913	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1.62
NRIC 1914	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1.05
NRIC 1915	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1.28
NRIC 0001	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.04
NRIC 0002	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.02
NRIC 0004	<i>Saccharomyces</i>	<i>Cerevisiae</i>		1.12

10

20

30

40

【表 4】

Strain No.	Genus	Species	Subsp.	IgA S.I.
NRIC0005	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.00
NRIC0006	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.01
NRIC0007	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.98
NRIC0008	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.97
NRIC0009	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.98
NRIC0011	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.03
NRIC0013	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.95
NRIC0014	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.94
NRIC0015	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.04
NRIC0016	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.88
NRIC0059	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.12
NRIC0060	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.11
NRIC1412	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.00
NRIC1414	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.03
NRIC1415	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.85
NRIC1417	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.97
NRIC1461	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.92
NRIC1465	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.00
NRIC1466	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.07
NRIC1624	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.91
NRIC1478	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.91
NRIC1482	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.94
NRIC1483	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.24
NRIC1484	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.87
NRIC1485	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.95
NRIC1486	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.04
NRIC1487	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.91
NRIC1488	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.91
NRIC1489	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.84
NRIC1490	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0.88
NRIC1811	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1.03

【 0 1 3 6 】

表 1 ~ 4 に示されるとおり、対照 (P B S) の I g A 産生を 1 とした場合、陽性対照の平均 S . I . は、1 3 . 1 を示し、I g A 産生を強く誘導していることが判った。よって本培養系はパイエル板細胞からの I g A 産生を評価する上で有用であると判断した。

【 0 1 3 7 】

各種乳酸菌による I g A 産生誘導能を見ると、S . I . は、ラクトバチルス ONRIC b0239 が 5 . 6 1、ラクトバチルス ONRIC b0240 が 6 . 3 1 であり、他の菌株の 0 . 8 ~ 1 . 4 に比べて突出して高い I g A 産生誘導能を有することが判った。

【 0 1 3 8 】

I g A は病原微生物の粘膜からの侵入阻止、ウイルス・毒素の中和、食物アレルギーの侵入阻止などの働きをしており、このような機能を有する I g A の産生を高めておくことは生体防御の上で重要である。

【 0 1 3 9 】

試験例 2

この例は、ラクトバチルス ONRIC b0240 (FERM BP-10065)の I g A 産生誘導能を in vivo で試験したものであり、次の通り実施された。

【 0 1 4 0 】

(1) 供試動物およびその飼育

8 週齢BALB/c雄性マウス 5 0 匹を入荷後、1 週間検疫した。検疫期間中および引き続き試験期間中、実験動物にはM F 固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由摂取させた。

【 0 1 4 1 】

検疫終了後、各実験動物を生理食塩水投与群 (1 5 匹)、ラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) 投与群 (1 5 匹) およびラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群 (1 5 匹) に群分けた。

10

【 0 1 4 2 】

(2) 経口投与用ラクトバチルス ONRIC b0240の調製

経口投与用のラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) およびラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) は、それぞれ以下の方法により調製した。

【 0 1 4 3 】

生菌 :

ラクトバチルス ONRIC b0240をM R S 培地にて定常期まで培養した後、遠心 (3 5 0 0 回転 / 分 × 1 0 分、4) にて集菌した。生理食塩水にて 2 回遠心洗浄後、菌体を生理食塩水に懸濁して、 4×10^9 c f u / m L に調整した。

20

【 0 1 4 4 】

死菌

上記で得た生菌懸濁液を、オートクレーブ (1 2 1 、 1 5 分加熱) 処理後、洗浄用ソニケーター (BRANSON 2510) で 4 5 分間超音波処理を行った。

【 0 1 4 5 】

(3) 試験方法

上記 (2) で調製したラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌および死菌) のそれぞれを、試験開始より 7 日間 (5 匹)、1 4 日間 (5 匹) または 2 1 日間 (5 匹) に亘って、ラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) 投与群 (5 + 5 + 5 = 1 5 匹) およびラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群 (5 + 5 + 5 = 1 5 匹) の各群マウスに、毎朝、経口投与 (10^9 C F U / 2 5 0 μ L / 匹 / 日) した。各投与期間終了後に、各群マウスを断頭屠殺してチューブに採血し、4 下、3 0 0 0 回転 / 分、1 0 分間遠心分離して血清を調製した。また、以下の方法によりパイエル板細胞を調製した。即ち、各群マウスを屠殺後、小腸を摘出し、眼科用ハサミで小腸からパイエル板を切り出し、不完全培地 (incomplete medium; 10mg ゲンタマイシン添加RPMI1640培地) を添加した 2 4 ウェルマイクロプレートに入れて氷冷した。メッシュを用いて単細胞懸濁液を調製し、5 m L の不完全培地で良く洗った。得られた細胞浮遊液を濾過し、4 下、1 0 0 0 回転 / 分で 1 0 分間遠心分離処理した。遠心分離処理後、培養上清を吸引除去し、沈殿を 5 m L の不完全培地に懸濁させた。上記洗浄、濾過、遠心分離、培養上清の吸引除去操作を、更に 1 回繰り返した後、得られた沈殿をパイエル板細胞とした。

30

40

【 0 1 4 6 】

また、コントロールとしての生理食塩水投与群 (1 5 匹) のマウスは、ラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌および死菌) を与えることなく飼育し、同様に試験開始より 7 日間 (5 匹)、1 4 日間 (5 匹) および 2 1 日間 (5 匹) 後に、血清およびパイエル板細胞を調製した。

【 0 1 4 7 】

I g A 産生試験

調製した各パイエル板細胞 (沈殿) を、0 . 5 m L の完全培地 (2 m M L - グルタミン、5 0 μ Mメルカプトエタノール、1 0 0 U / m L ペニシリン、1 0 0 μ g / m L スト

50

レプトマイシン、10% FBS 添加 RPMI 1640 培地)に懸濁させて、細胞濃度を 2×10^6 細胞/mL に調整し、生細胞数をカウント後、細胞浮遊液を 100 μ L ずつ 96 ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに播種した。

【0148】

パイエル板細胞が産生する IgA 量は、パイエル板細胞をそのまま培養し、産生される IgA 量を調べる方法と、この培養系に更にパイエル板細胞刺激物質としてラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) を添加して培養し、産生される IgA 量を調べる方法との 2 つの方法により検討した。後者の方法は、実際の生体内におけるパイエル板細胞の環境に近いものと想定される。即ち、この試験でラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌または死菌) を経口投与する場合は、摂取された乳酸菌は何らかの形でパイエル板細胞に刺激を与えることが予想される。

10

【0149】

パイエル板細胞刺激物質としてのラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) は、下記方法に従って調製した。

【0150】

パイエル板細胞刺激用ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌)

前記で調製した経口投与用のラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) の懸濁液を、更にリン酸バッファーで菌数が 10^7 cfu/mL (660 nm での濁度 0.275) となるように希釈し、得られた菌体懸濁液を、オートクレーブ (121、15 分加熱) 処理後、洗浄用ソニケーター (BRANSON 2510) で 45 分間超音波処理した。

20

【0151】

パイエル板細胞刺激物質を利用する方法は、パイエル板細胞刺激用ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 10 μ L を各ウェルに添加し、さらに FCS を含まない RPMI 1640 を 100 μ L 各ウェルに添加し、37、5% CO₂ 下で 7 日間パイエル板細胞を培養した。パイエル板細胞刺激物質を利用しない方法では、上記ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) の代わりに 10 μ L の生理食塩水を各ウェルに添加して、以下同様の操作によってパイエル板細胞を培養した。

【0152】

(4) 測定

細胞培養液から遠心分離にて培養上清を回収し、該培養上清中に分泌される総 IgA 濃度の測定に供するまで -80 で凍結保存した。

30

【0153】

上記培養上清中の総 IgA 濃度の測定および血清中の総 IgG 濃度の測定は、いずれも市販のキットを用いた ELISA 法により測定した。

【0154】

(5) 結果

結果を図 1 (IgA 濃度) および図 2 (IgG 濃度) に示す。

【0155】

図 1 は、培養上清中の IgA 濃度 (μ g/mL) を示す棒グラフである。図中、白抜き棒は、コントロールとしての生理食塩水投与群 (「生理食塩水」と表示) の結果である。網掛け棒は、ラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) 投与群 (「b0240 生菌」と表示) の結果である。黒塗り棒は、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群 (「b0240 死菌」と表示) の結果である。無刺激は、各群マウス由来のパイエル板細胞の培養系にラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) を添加することなく培養した場合を示す。菌体刺激は、各群マウス由来のパイエル板細胞の培養系にラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) を添加して該菌の刺激下に培養した場合を示す。各結果は、各群供試マウス 5 匹について得られた結果を平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で表示する。各結果の上に表示した P 値は、スチューデント t - テスト (Student t-test) におけるコントロールに対する危険率を示す。

40

【0156】

該図に示される結果から、次のことが明らかである。

50

【 0 1 5 7 】

(1) 7日間投与の場合 :

菌体刺激の場合、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群は、生理食塩水投与のコントロールよりも有意に高値を示した ($P = 0.010$)。

【 0 1 5 8 】

(2) 14日間投与の場合 :

無刺激の場合、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群 (無刺激の黒塗り棒参照) は、コントロール (生理食塩水投与後無刺激) よりも、有意に高値を示した ($P = 0.048$)。

【 0 1 5 9 】

また、菌体刺激を行った場合は、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) を投与した群およびラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) を投与した群のいずれも、コントロール (生理食塩水投与) に比して有意に高値を示した (それぞれ $p = 0.034$ および $p = 0.002$)。

【 0 1 6 0 】

(3) 21日間投与の場合 :

無刺激の場合、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) を投与した群は、コントロール群よりも有意に高値を示した ($P = 0.047$)。

【 0 1 6 1 】

また、菌体刺激を行った場合、ラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) 投与群およびラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) 投与群は、コントロール群よりもいずれも有意に高値を示した (それぞれ $p = 0.015$ および $p = 0.005$)。

【 0 1 6 2 】

図 2 は、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) の 21日間投与が I g G 産生に及ぼす影響を明らかにする棒グラフであり、縦軸は血清 I g G 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示す。

【 0 1 6 3 】

該図に示される結果から、ラクトバチルス ONRIC b0240 (死菌) の投与は、コントロール (生理食塩水投与) に比して有意に高い血清 I g G 濃度を示すことが判る ($p = 0.0064$)。またラクトバチルス ONRIC b0240 (生菌) の投与も、コントロール (生理食塩水投与) に比して、高い血清 I g G 濃度を示すことが判る。

【 0 1 6 4 】

以上の結果より、ラクトバチルス ONRIC b0240は、パイエル板に存在する免疫担当細胞あるいは腸管上皮細胞とその周辺の免疫担当細胞を刺激することで粘膜免疫応答を誘導し、最終的にパイエル板細胞からの総 I g A 産生を高めたものと推定される。また、ラクトバチルス ONRIC b0240の投与は、I g Aのみならず血清中の I g G も高めることが判った。

【 0 1 6 5 】

これらのことから、ONRIC 乳酸菌の摂取は、粘膜免疫のみならず全身免疫も賦活し、これらの 2 段階で生体の免疫応答を賦活し、体の内と外から生体を防御する可能性が示唆される。このような作用が生菌のみならず死菌においても認められることから、ONRIC 乳酸菌は、経口ワクチン的なプロバイオティクスの新たな活用法として期待できるものと考えられる。

【 0 1 6 6 】

試験例 3

この試験は ONRIC 乳酸菌の摂取がインフルエンザ下気道感染の防御に有効であることを明らかにするものである。

【 0 1 6 7 】

本発明者らは、ONRIC 乳酸菌の I g A を介した感染防御効果を明らかにするため、インフルエンザウイルス (I F V) を下気道にまで到達させる下気道感染モデルマウスを用いて、ラクトバチルス ONRIC b0240を利用して調製した発酵物の摂取による感染防御効

10

20

30

40

50

果を、感染後の生存日数を指標として検討した。本試験は以下の通り実施された。

【0168】

(1) 供試動物

日本チャールス・リバー株式会社より入荷した近交系雌性SPF/VA/VAF マウス(系統名: BALB/c AnNCrj)(5週齢)を4日間、以下の条件で検疫後、体重による群分け(蒸留水群、牛乳群およびラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵乳群)を行った。

餌/給餌法: MF固形飼料(オリエンタル酵母株式会社)/自由摂取

水/給水法: 水道水/給水瓶による自由摂取

環境: 温度: 23 ± 2 °C、湿度: 60 ± 10 %

照明時間: 明期 7:00~19:00、暗期 19:00~7:00

10

(2) 試験方法

各群マウス($n = 45$)に、MF固形飼料(オリエンタル酵母社製)と共に、被験物(1)蒸留水、(2)牛乳または(3)ラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵乳)を、2週間摂取させた。

【0169】

被験物としての牛乳は、LL牛乳(大阿蘇牛乳:らくのうマザーズ社製)を蒸留水で75%に希釈して利用した。被験物としてのラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵乳は、予め10%スキムミルク水溶液に懸濁させ-80 で凍結保存しておいたラクトバチルス ONRIC b0240 をスターターとして、牛乳1Lに該スターター(生菌数 10^8 cfu)を加え、33 で16時間発酵させたものである。該ラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵物の菌体含量は 5×10^7 cfu/mLである。これを蒸留水で75%に希釈して試験に利用した。

20

【0170】

被験物は給水瓶による自由摂取とし、摂取量は摂取前後の被験物の重量減少量とした。

【0171】

摂取開始2週間後に、各群マウスをケタラ-ル(塩酸ケタミン)により麻酔後、その一方の鼻腔にIFV液50 μ Lを経鼻接種(10 、 10^2 または 10^3 pfu/50 μ L PBS/匹、それぞれの濃度における $n = 15$)して、IFVをマウスに感染させた。その後、各群実験動物の生死を毎日観察した。被験物は感染後から死亡を確認するまで与え続けた。

30

【0172】

使用IFV株としては、大塚製薬株式会社微生物研究所に保存されているIFV: A/PR/8/34/H1N1株を用いた。該株を0.1%BSAおよび10mM HEPESを含有するMEM培地に懸濁させ、次いでPBS(+)を用いてウイルス含量が $10 \sim 10^3$ pfu/50 μ Lとなるように希釈し、IFVの接種用ウイルス液を調製した。なお、PBS(+)はPBS(-)粉末(コージンバイオ社製)9.55g、CaCl₂(無水)100.00mgおよびMgCl₂(無水)46.90mgを蒸留水に溶解して1000mLとして調製した。

【0173】

(3) 結果

各群マウスの生存日数を、IFV経鼻摂取後、毎日朝(8:30~9:00)および夕方(17:30~18:00)の二回、確認した。

40

【0174】

その結果、蒸留水を摂取させたコントロール群および牛乳を摂取させた対照群では、接種ウイルス量を 10^2 pfu/匹とした場合、いずれも7日目までに全例が死亡した。接種ウイルス量を 10^3 pfu/匹とした場合、いずれも6日目夕方までに全例が死亡した。これに対して、ラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵乳を摂取させた群では、コントロール群に対して、実験動物の生存日数を延長する傾向が認められた。

【0175】

また、接種ウイルス量を10 pfu/匹とした場合、全ての群において14日目で70

50

%以上が生存しており、ラクトバチルス ONRIC b0240含有発酵乳を摂取させた群では、86.7%が生存しており、コントロール群のそれ(80%)に対して、生存率を延長させる傾向が認められた。

【0176】

また、各群マウスの体重を被験物摂取開始から感染日までは2日毎に、感染後は毎朝(8:30~9:00)、電子天秤を用いて測定した。なお、測定は各測定日において生存していたマウスについて行い、得られた値は全測定値の平均値で示した。

【0177】

その結果、全ての群において、2日目から若干の体重減少が認められた。体重変化の推移は、各群において同様であり、差は認められなかった。

10

【0178】

(4) 考察

本試験の結果および前記試験例1および2に示される試験の結果から、総合的に判断して、ONRIC乳酸菌およびこれを含む発酵物は、IFV感染に対して感染防御効果を奏し得ると考えられる。

【0179】

本発明は、免疫賦活作用およびIgA産生促進作用を有するONRIC乳酸菌を含む茶-発酵飲料および茶飲料を提供するものであり、これらはその摂取によって病原微生物などの粘膜からの侵入を阻止する生体防御効果を奏することが期待できる。

【0180】

20

試験例4

この試験はONRIC乳酸菌死菌の摂取がインフルエンザ下気道感染の防御に有効であることを明らかにするものである。

【0181】

(1) 被験物質

ラクトバチルス ONRIC b0240死菌を被験物質として用いた。

【0182】

(2) 供試動物

日本エスエルシー株式会社より入荷した雌性BALB/c/Cr Slc(SPF)マウス(5週齢)を7日間、以下の条件で検疫後、群分けを行った。

30

餌/給餌法: 固形飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)/自由摂取

水/給水法: 123~124、100分間高圧蒸気滅菌済み水道水/給水瓶による自由摂取

環境: 温度: 23 ± 2 、湿度: $55 \pm 15\%$ 、換気: 15回/時間

照明時間: 明期 8:00~20:00、暗期 20:00~8:00。

【0183】

(3) ウイルスの調製

超低温冷凍庫に凍結乾燥保存してあるインフルエンザウイルスA型(IFVA:PR8株)を細胞増殖用培地中(10%FBS含有イーグルMEM(Gibco))でMDCK細胞(イヌ腎細胞;RCB0995株)にM.O.I.(Multiplicity of infection)=0.01で感染させ、37、5%CO₂存在下で72時間培養した(1継代)。連続して5代継代したものを大量培養し、蔗糖密度勾配超高速遠心法によりウイルス液を分離・精製し、1mLずつ分注後-80超低温冷凍庫にて実験使用時まで保存した。ウイルス液の一部は、10段階希釈法にて細胞変性効果を確認し、ウイルス感染力価(TCID₅₀)を測定した。

40

【0184】

(4) 試験方法

(4-1) 群分け

群構成は、ウイルス摂取群4群およびウイルス非接種群2群の計6群とした。ウイルス摂取群の4群の摂取ウイルス濃度は $10^{7.5}$ TCID₅₀/mLとした。ウイルス摂取が確実に行われたマウスを各群に10匹ずつ割り付けた。なお、群分けの指標には動物番号を

50

用い、被験物質投与開始時に層別無作為に割り付けた。ウイルス非接種群の動物数も10匹とした。

【0185】

(4-2) 被験物質の投与

検疫・検収の終了後、1週間予備飼育を行った6週齢のBALB/c雌マウスに、被験物質をマウス1匹当たり0.2mLずつ、試験期間を通じて1日1回強制経口投与した。被験物質の濃度は、マウスの体重1kgあたりの被験物質投与量が、500、100または20mg/kgとなるように設定した。なお、陰性対象には生理食塩液を同様に投与した。

【0186】

(4-3) IFVAの接種

被験物質または生理食塩液を3週間連続強制経口投与した6週齢のBALB/c雌マウスに、動物番号順に動物体重20g当たり、塩酸ケタミン注射液(50mg/mL;三共株式会社)20倍希釈液0.2mLとドロペリドール注射液(2.5mg/mL;三共株式会社)20倍希釈液0.1mLを後肢筋肉内に注射し、全身麻酔を施した。麻酔下において、上記(3)で調製したIFVA液をマウスの右鼻腔に50μL経鼻的に接種した。なお、ウイルス非接種群には生理食塩液50μLを同様に注入した。

【0187】

(4-4) 生存率の測定

IFVA接種後2週間の経過観察を行った。IFVA接種後生存した個体数を群当たりの総数で除した値に100を乗じた値を生存率とした。

【0188】

(5) 統計処理

実験対照群と各被験物質投与群間の有意差は、クラスカル-ウォリスのH検定またはマン-ホイットニーのU検定を用いて検定し、危険率5%未満を有意とした。また、観察期間における生存期間に関してはフィッシャー検定による有意差検定を行った。

【0189】

(6) 結果

結果を表5に示す。

【0190】

【表5】

	ラクトバチルス ONRIC b0240 死菌の用量 (mg/kg body weight)	マウス数	生存率	生存期間 (日)
IFVA 接種群	500	10	8/10 (80.0%)	13.1
	100	10	3/10 (30.0%)	9.2
	20	10	0/10 (0.0%)	8.5
	-(生理食塩液)	10	0/10 (0.0%)	8.5
IFVA 非接種群	500	10	10/10 (100.0%)	14.0
	-(生理食塩液)	10	10/10 (100.0%)	14.0

【0191】

ウイルス感染動物における生理食塩水投与群の生存率は0%、平均生存日数は8.5日であった。一方、ウイルス感染動物における被験物質投与群の生存率および平均生存日数は、500mg/kg投与群80.0%、13.1日、100mg/kg投与群30.0%、9.2日および20mg/kg投与群0%、8.5日であった。ウイルス感染後の観察期間中の生存期間および観察期間終了時の生存率において、500mg/kg投与群は対照群に対して有意に高い値を示した(それぞれ、 $p = 0.0002$ および $p = 0.00$

10

20

30

40

50

07)。また、ウイルス未感染動物における被験物質投与群および同物質非投与群の生存率および平均生存日数に関しては、いずれも100%、14.0日であった。

【0192】

試験例5

この試験は、ONRIC乳酸菌(死菌)の継続摂取が、ヒトの唾液中IgA産生量に及ぼす影響を明らかにするものである。

【0193】

被験者は成人女性20名とし、スクリーニング時の唾液中総S-IgA量を指標に、水摂取群(対照群)、ラクトバチルス ONRIC b0240死菌(2×10⁹CFU相当/日)摂取群に各10名を割り付けた。

【0194】

試験期間中は、水またはラクトバチルス ONRIC b0240死菌含有水(菌数2×10⁹CFU相当:200ml/日)を摂取させた。被験物質摂取前後に、下記の要領で唾液中総S-IgA量を測定した。

【0195】

唾液採取日の定刻に蒸留水にて洗口し、5分後、サリベットを用いて唾液を1分間採取し、秤量した。唾液分泌量に応じて2~3回この作業を繰り返した。この際、正確な採取時間をタイマーにより計測し、記録した。得られた唾液は遠心分離を行うまで4℃で冷蔵保存した。その日のうちにサンプルを2500rpmにて10分間遠心分離を行い、沈殿物を取り除いた。得られる上清の量が少ない場合はさらに同条件で遠心分離を行った。上清を1.5ml容マイクロチューブに採取し、測定時まで-30℃で凍結保存した。測定には、上清をブロッキング液(魚ゼラチン(SIGMA, St. Louis, MO)1g/50mlを含む、0.05%ポリオキシエチレンソルビタンモノウレート含有PBS(Tween20相当品、ナカライテスク、京都))で2000倍希釈したサンプルを用いた。IgA濃度はELISA法(一次抗体:ウサギ抗ヒトIgA(DAKO, Denmark)、二次抗体:HRP標識ウサギ抗ヒトIgA(DAKO)、標準抗体:精製ヒト分泌型IgA(Cappel, Aurora, OH))にて測定した。なお、総S-IgA量は、一分間あたりの唾液分泌量とS-IgA濃度の積として算出した。

【0196】

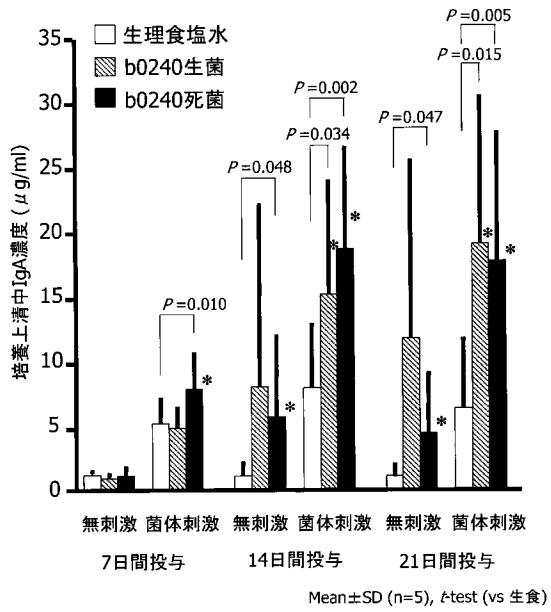
試験期間中の唾液中総S-IgA量の増加量を、被験物質摂取21日目における唾液中総S-IgA量から、被験物質摂取前の唾液中総IgA量を引いた差として算出した。得られた結果を図3に示す。試験期間中の唾液中総S-IgA量の増加量について、ラクトバチルス ONRIC b0240死菌(2×10⁹cfu相当)摂取群(52.21±24.41μg)は、水摂取群(-21.81±28.33μg)に比べて高い値を示し、その差は統計学的にも有意なものであった(p=0.0001)。

10

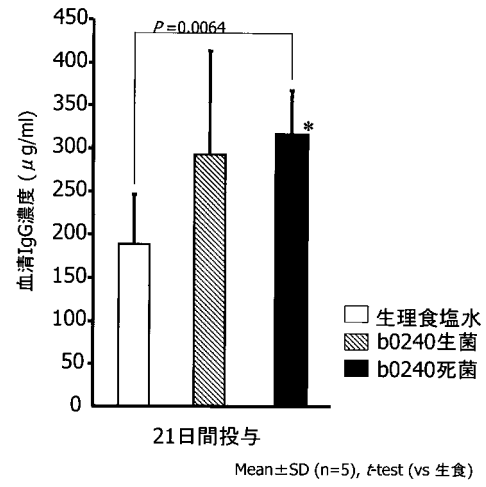
20

30

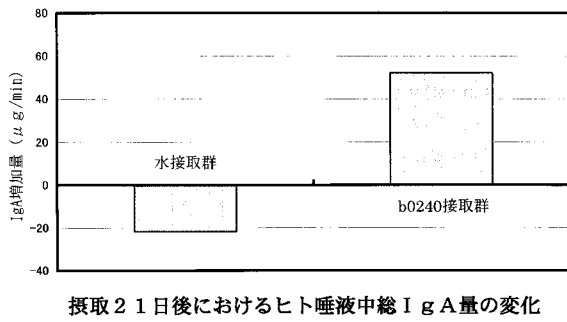
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 呉 博聖
徳島県徳島市川内町加賀須野463-10 大塚製薬製品技術部内
- (72)発明者 山平 聡子
滋賀県大津市際川3-31-13 大塚製薬大津栄養研究所内
- (72)発明者 戸羽 正道
滋賀県大津市際川3-31-13 大塚製薬大津栄養研究所内
- (72)発明者 岡松 洋
滋賀県大津市際川3-31-13 大塚製薬大津栄養研究所内

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 特開平11-276072(JP,A)
特開平11-004665(JP,A)
国際公開第94/026133(WO,A1)
特開2002-080364(JP,A)
特開平10-167972(JP,A)
特開2001-064174(JP,A)
国際公開第2005/019438(WO,A1)
Milk Science, 2002年, Vol.51, No.1, pp.27-32
Microbial Ecology in Health and Disease, 1996年, Vol.9, No.6, pp.261-269
Food and Agricultural Immunology, 1999年, Vol.11, No.3, pp.259-267
Clin. Exp. Immunol., 1999年, Vol.116, No.2, pp.283-290
Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 2006年 6月, Vol.17, No.1, pp.57-60

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23F 3/00 - 5/50
C12P 1/00 - 41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)