

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4471355号
(P4471355)

(45) 発行日 平成22年6月2日(2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日(2010.3.12)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
A 2 3 K	1/00	(2006.01)	A 2 3 K	1/00	1 0 1
A 2 3 K	1/02	(2006.01)	A 2 3 K	1/02	
A 2 3 K	1/16	(2006.01)	A 2 3 K	1/16	3 0 4 B
C 1 2 P	7/56	(2006.01)	C 1 2 P	7/56	

請求項の数 10 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2004-123291 (P2004-123291)
 (22) 出願日 平成16年4月19日(2004.4.19)
 (65) 公開番号 特開2005-21156 (P2005-21156A)
 (43) 公開日 平成17年1月27日(2005.1.27)
 審査請求日 平成18年8月25日(2006.8.25)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-112373 (P2003-112373)
 (32) 優先日 平成15年4月17日(2003.4.17)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-166047 (P2003-166047)
 (32) 優先日 平成15年6月11日(2003.6.11)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM P-19169

(73) 特許権者 506148822
 日本アルコール産業株式会社
 東京都中央区日本橋小舟町6番6号
 (74) 代理人 100084076
 弁理士 首藤 俊一
 (72) 発明者 藤井 桂子
 東京都墨田区緑4丁目20番17号田栄ビル401
 (72) 発明者 佐藤 充克
 千葉県千葉市稲毛区稲毛東4丁目10番地
 6号207

審査官 六笠 紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸菌、乳酸発酵生成物、飼料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液に生育するラクトバチルス・パラカセイ(Lactobacillus paracasei)に属し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169。

【請求項2】

アルコール発酵物を蒸留し、得られる残渣であるアルコール発酵残液に増殖するラクトバチルス・パラカセイ・サブスピシズ・パラカセイ(Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)に属し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169。

【請求項3】

温度耐性およびエタノール耐性を有する請求項1又は請求項2に記載の乳酸菌FERM P-19169。

【請求項4】

アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液と当該アルコール発酵残液に生育し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169を含む乳酸発酵生成物。

【請求項5】

アルコール発酵後に蒸留し得られる残渣であるアルコール発酵残液と当該アルコール発酵残液を乳酸発酵して得られ、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169。

10

20

R M P - 1 9 1 6 9 を含む乳酸発酵生成物。

【請求項 6】

動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌 F E R M P - 1 9 1 6 9 を含む乳酸発酵生成物を原料若しくは少なくとも原料の一つとする飼料。

【請求項 7】

乳酸発酵生成物の発酵原料がサトウキビから砂糖を分離した糖蜜および/または柑橘果汁搾汁残渣より回収する果汁蜜である請求項 4 又は請求項 5 に記載の乳酸発酵生成物。

【請求項 8】

乳酸発酵生成物の発酵原料がサトウキビから砂糖を分離した糖蜜および/または柑橘果汁搾汁残渣より回収する果汁蜜である請求項 6 の飼料。

10

【請求項 9】

乳酸菌 F E R M P - 1 9 1 6 9 の生菌濃度が 10^8 cells / mL 以上である、請求項 4 又は請求項 5 に記載の乳酸発酵生成物。

【請求項 10】

アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液に生育し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有するラクトバチルス・パラカセイ (*Lactobacillus paracasei*) に属する I - 5 株 (F E R M P - 1 9 1 6 9) の乳酸菌。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は発酵アルコール製造工業から副生する、アルコール発酵残液であるアルコール発酵残液の有効利用に関し、アルコール発酵残液であるアルコール発酵残液に極めて良く増殖し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌の提供、前記乳酸菌の乳酸発酵によるアルコール発酵残液であるアルコール発酵残液の乳酸発酵生成物の付加価値の高い飼料原料および飼料としての提供を目的とするものである。

【背景技術】

【0002】

発酵アルコールは、サトウキビから得られる糖蜜、砂糖大根（シュガービート）から得られる廃液濃縮物、あるいはトウモロコシや甘蔗の加水分解にて得られる糖類を発酵し、発酵もろみを蒸留して製造される。アルコール発酵にて排出される蒸留残渣は所謂廃液であり、環境問題から海洋投棄が禁止されることとなり、有効利用が望まれている。

30

アルコール発酵後の蒸留残渣は、一部肥料として利用されているが、付加価値が低く、有効な廃棄物処理法とはなっていない。海外では海洋投棄により環境問題を引き起こしており、その有効利用法の開発は世界的に望まれている。飼料としての利用は、アルコール発酵原料となる糖蜜については、飼料の賦形剤（バインダー）としての利用や糖蜜飼料として、飼料に配合するなどの応用が知られているが、アルコール発酵廃液を飼料化することは知られていない。

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

我々は、アルコール発酵後に排出される残渣（もろみ濃縮液と称す）の有効利用について、鋭意研究を重ねた結果、もろみ濃縮液に極めて良好な増殖を示す乳酸菌を見出した。乳酸菌は生菌体および死菌体共に、生体の免疫力を高めたり、腸内細菌叢を調節し、便秘を軽減し、整腸作用を示すなど、種々の有用性が示されている（細野朗、上野川修一：腸管免疫とプロバイオティクス、Food

Style 21、vol. 6、pp. 45 - 49、2002年；MR. Herich and M. Levkut: Lactic acid bacteria、probiotics

50

and immune system、Vet. Med. - Czech、vol. 47、pp. 169 - 180、2002年)。

また、もろみ濃縮液を発見した乳酸菌にて乳酸発酵し、乳酸菌の菌体濃度が高く、タンパクやビタミンを含み、最近注目されているプロバイオティックスとなる飼料原料を開発することに成功し、本発明を完成した。

【0004】

発酵アルコールは甲類焼酎原料、食酢の発酵原料、味噌や醤油の保存性を高める為の添加剤、あるいは食品の保存性を高める為のアルコール製剤の原料として、消費量が増加傾向にある。アルコール発酵原料として最も多いのが、砂糖を採取した残液である糖蜜である。

10

従来、アルコール発酵・蒸留廃液は、色は黒く問題はあるが、毒性を示すものは含まないので、多くは海洋投棄されていた。

しかし、環境汚染問題から、多くの自治体で海洋投棄を禁止する方向にあり、また、海外でも生産量が多く、大量の蒸留廃液の不法投棄が環境問題を引き起こしており、コストの低い処分法あるいは付加価値の高い有効利用法が求められている。

【0005】

アルコール発酵・蒸留廃液の一部は肥料原料として利用されている。また、焼酎業界では共同で燃焼処理設備を導入し、廃液を燃焼して処理している。

然るに、肥料原料としての利用は付加価値が低く、運送費用も出ない現状がある。燃焼処理については、必ずしも十分な処理量でなく、また、燃焼する為には費用がかかり、コスト的に負担が大きい。本発明の課題は、アルコール発酵残液に付加価値をつけ、有効利用を図ることである。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

我々は、アルコール発酵にて副生の残渣、例えばアルコール発酵残液即ちもろみ濃縮液の有効利用につき鋭意研究を重ねた結果、意外にも、このもろみ濃縮液に良好に生育する動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌を見出した。また、発見した乳酸菌を用い、乳酸発酵飼料および乳酸菌高濃度液の開発に成功し発明を完成した。

即ち、本発明は、アルコール発酵・蒸留残渣に良好に生育する動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌株、およびアルコール発酵蒸留残渣濃縮物(もろみ濃縮液)の乳酸菌発酵により、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌体、ビタミン類、タンパクなどを多く含み、飼料としても好適な乳酸発酵生成物としての乳酸発酵もろみ濃縮物の提供に関する。

30

【0007】

本発明は、アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液に生育するラクトバチルス・パラカセイ(Lactobacillus paracasei)に属し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169である。

40

【0008】

また本発明は、アルコール発酵物を蒸留し、得られる残渣であるアルコール発酵残液に増殖するラクトバチルス・パラカセイ・サブスピズ・パラカセイ(Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)に属し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌FERM P-19169である。

【0009】

また本発明は、温度耐性およびエタノール耐性を有する請求項1又は請求項2に記載の乳酸菌FERM P-19169である。

50

【0011】

また本発明の乳酸発酵生成物は、アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液と当該アルコール発酵残液に生育し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌 FERM P - 19169を含むことを特徴とする。

【0012】

また本発明の乳酸発酵生成物は、アルコール発酵後に蒸留し得られる残渣であるアルコール発酵残液と当該アルコール発酵残液を乳酸発酵して得られ、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌 FERM P - 19169を含むことを特徴とする。

10

【0013】

また本発明の飼料は、乳酸菌 FERM P - 19169 を含む乳酸発酵生成物を原料若しくは少なくとも原料の一つとすることを特徴とする。

【0015】

また本発明の乳酸発酵生成物は、請求項4又は請求項5に記載の乳酸発酵生成物において、乳酸発酵生成物の発酵原料がサトウキビから砂糖を分離した糖蜜および/または柑橘果汁搾汁残渣より回収する果汁蜜であることを特徴とする。

【0016】

また本発明の飼料は、請求項6の飼料において、乳酸発酵生成物の発酵原料がサトウキビから砂糖を分離した糖蜜および/または柑橘果汁搾汁残渣より回収する果汁蜜であることを特徴とする。

20

【0017】

また本発明の乳酸発酵生成物は、請求項4又は請求項5に記載の乳酸発酵生成物において、乳酸菌 FERM P - 19169 の生菌濃度が 10^8 cells/mL以上であることを特徴とする。

【0018】

また本発明は、アルコール発酵にて副生の残渣であるアルコール発酵残液に生育し、動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有するラクトバチルス・パラカセイ (Lactobacillus paracasei)に属する I - 5 株 (FERM P - 19169) の乳酸菌であることを特徴とする。

30

【発明の効果】

【0019】

本発明により、従来低付加価値の利用しかされていなかった、アルコール発酵にて副生する残渣例えば蜜原料アルコール発酵後の蒸留残渣であるアルコール発酵残液を有効利用することが出来、この残渣に良好に増殖する動物体内の病原菌に対し免疫増強作用を有する乳酸菌を発見したことで、発見したこの乳酸菌をプロバイオティクスとして利用できると共に、発酵生成物は付加価値のある乳酸発酵生成物および飼料或いは飼料原料として利用可能となった。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明を実施例1乃至6に基づいて説明する。

【実施例1】

50

【0021】

乳酸菌分離

食品用に使用される工業用アルコールは、主として基質としてサトウキビ搾汁液の蔗糖採取後の廃液である、糖蜜を発酵して行う。通常、アルコール発酵の糖蜜培地は加熱殺菌を施さないで、微量であるが種々の雑菌が含まれる。アルコール発酵時には、多量の酵母菌を種母として接種するので、短時間でアルコール濃度が上昇し、雑菌汚染の頻度は低い。

我々は、微量含まれる雑菌の中から乳酸菌に着目し、アルコール発酵もろみからの乳酸菌分離を試みた。

【0022】

アルコール発酵は、凝集性アルコール酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

F-5をグルコース1.0%、酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ペプトン0.3%を含む培地(以下YM培地と略記する)に接種し、32℃で一晩培養したものを一次種母とし、これを糖蜜を希釈し、全糖16%(w/v)とし、N源として硫酸アンモニウムを0.03%添加した培地に5%添加し、32℃で一晩培養し、2次種母とした。

アルコール発酵は糖蜜を希釈し、全糖18%(w/v)とし、N源として硫酸アンモニウムを0.03%添加した液に、2次種母を10%添加し、30℃にて48時間発酵した(発酵1回目)。

以後、全糖濃度18%とした糖蜜培地に発酵1回目の発酵もろみを20%接種し、30℃で24時間発酵した(発酵2回目)。

発酵3回目は全糖濃度20%、発酵4回目は全糖濃度22%とし、種母量は20%とした。

発酵5回目以降は、発酵4回目と同様の条件とし、8回から10回繰り返し発酵を行った。

【0023】

繰り返し回分発酵の最終回のもろみから、乳酸菌および酢酸菌分離用培地を用い、乳酸菌を分離した。

分離培地としては乳酸菌用にGYP-CaCO₃培地(Glucose 20g/L、酵母エキス10g/L、ペプトン10g/L、Tween-80 5g/L、CaCO₃10g/L、シクロヘキシミド2μg/mL)、MRS培地(Difco

MRS broth)、酢酸菌用培地として、シクロヘキシミド2μg/mL、CaCO₃10g/L、エタノール5g/Lを添加したポテト-デキストロース寒天培地を使用した。

分離された菌は、桿菌、連鎖桿菌、球菌、連鎖球菌などであり、形態および乳酸の生成などから、多くは*Lactobacillus*であり、*Leuconostoc*と思われる乳酸菌も分離された。結果的に36株の乳酸菌と考えられる菌株が単離・取得できた。

【0024】

得られた36株の乳酸菌より、アルコール耐性(8%エタノール以上に耐性)の観点から、6株(I-5、I-8、I-9、I-13、I-19、I-28)を選択した。

更に、選ばれた6株について、もろみ濃縮液での増殖を調べ、最終的に良好な増殖を示す株として、I-5株が選択された。

本株はアルコール発酵蒸留残液の2.5~3倍濃縮液(もろみ濃縮液)の2倍希釈液にも、極めて良好な増殖を示した。

従来、アルコール発酵蒸留廃液で良好な増殖を示す乳酸菌は知られていなかった。

【実施例2】

【0025】

菌学的性質

10

20

30

40

50

本発明の前記6株のうちI-5株の菌学性質を調べた結果を以下に示す。
本株(I-5株)をDifco社製MRS培地に寒天を1.5%添加した培地でガスパック嫌気システム(Becton Dickinson Microbiology Systems、MD、USA)にて、37、1~2日間培し、形態を観察した。I-5株は短径0.9~1.1 μ m、長径1.9~3.3の桿菌であり、単一の細胞でも存在したが、多くは2ヶの菌が連鎖状となり、それ以上の鎖状を示すものも観察された。本株は孢子を形成しなかった。本株をMRS培地で液体培養し、有機酸の生成を調べたところ、乳酸のほかに酢酸の生成もあり、ヘテロ型乳酸発酵を行う乳酸菌と考えられた。

【0026】

I-5株の同定を行う為、炭水化物代謝試験にて同定を行う、Biomerieux社(フランス、輸入販売元:日本ピオメリュウ(株))のAPI 50CHを用い、30、48時間培養し、同定を行った。その結果、本株はラクトバチルス・パラカセイ・サブスピシズ・パラカセイ(Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)と同定された。そこで、ラクトバチルス・パラカセイ・サブスピシズ・パラカセイのタイプ・カルチャーであるL. paracasei NBRC 15889を取り寄せ、種々の性質を比較検討した。

【0027】

API 50CHによる各種糖の発酵性について調べた結果、多くの糖質でI-5株とNBRC 15889は類似の資化パターンを示したが、表1に示す種々の糖質について、異なる結果を示した。また、図1に各種培養温度における生育についての結果を、図2に各種エタノール濃度におけるエタノールの生育阻害についての結果を示す。

【0028】

【表1】

表1. *L. paracasei* subsp. *paracasei* I-5株の糖の発酵性

基質	I-5	NBRC 15889 標準菌株
Sorbose	-	±
Sorbitol	-	+
Inulin	-	±
Gluconate	±	+

糖発酵性試験はAPI 50CH system(Biomerieux社製)を用いて行った。培養は30°Cで48時間行った。+:陽性、±:微陽性、-:陰性。

【0029】

表1よりI-5株はソルボース、ソルビトール、イヌリン、グルコン酸の発酵性がタイプカルチャーであるNBRC

15889と異なった。温度特性は、図1よりNBRC 15889が40 までの増殖温度であるのに対し、I-5株は45 でも生育し、増殖温度特性が異なった。また、図2に示すように、エタノールに対する耐性もI-5はNBRC

15889より高く、タイプカルチャーでは8%(v/v)でほぼ完全に増殖が阻害するのに対し、I-5株はエタノール8%(v/v)で生育し、16%(v/v)でも若干の増殖が認められた。以上より、I-5株はAPI

50CHを用いる同定キットではL. paracasei subsp. paracaseiと同定されるが、タイプカルチャーであるNBRC 15889とは、生理的に種々の点で異なり、I-5株はL. paracasei subsp. paracaseiの生理的変種であり、ラクトバチルス・パラカセイ・サブスピシズ・パラカセイI-5株(L. paracasei subsp. paracasei I-5)と命名された。La

ctobacillus paracasei subsp. paracasei
I - 5 株は F E R M P - 1 9 1 6 9 とし、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に寄託されている。

【実施例 3】

【0030】

本発明のもろみ濃縮液での乳酸菌増殖試験について示す。

まず、もろみ濃縮液の各希釈液で乳酸菌（I - 5 株）の増殖を調べた。

純粋分離した I - 5 株を 5 m L の M R S に接種し、ガスパック中で 3 7 °C で一晩培養した。試験管にて調製した、各試験区のもろみ濃縮液 1 0 m L に本種母を 5 % 接種し、スクリーキャップをし、3 7 °C で増殖試験を行った。

その結果、もろみ濃縮液原液では、乳酸菌の増殖は認められず、

2 倍希釈以上の希釈液にて増殖が認められた。

また、各希釈液にブドウ糖 2 % を添加した培地も検討したが、4 倍希釈液まではブドウ糖の添加は増殖に影響を与えなかった。

もろみ濃縮液は N E D O アルコール事業本部出水アルコール工場にて得られた、もろみ 2 . 5 倍濃縮のもろみ濃縮液を使用した。

分析データを以下に示す。

アルコール発酵原料としては糖蜜と果汁蜜の混合物を使用した。試験に供したもろみ濃縮液の pH は 4 . 6 9 、全糖（%、w t / v ）は 7 . 0 0 % 、直接還元糖（%、w t / v ）は 6 . 0 8 % 、ケットの赤外線水分計による水分（%、w t / v ）は 6 8 . 9 % であった。表 2 に液体クロマトグラフィー（H P L C ）による糖および有機酸分析値を示す。

【0031】

【表 2】

表2 もろみ濃縮液の糖および有機酸分析値

	糖類	分析値mg/L		有機酸	分析値mg/L
糖 分 析 値	スクロース	ND	有 機 酸 分 析	リン酸	867
	セロビオース	49		クエン酸	2927
	マルトース	361		酒石酸	ND
	ラクトース	ND		ピルビン酸	1273
	ラムノース	ND		リンゴ酸	5525
	リボース	53		コハク酸	1549
	マンノース	ND		乳酸	2675
	フルクトース	910		ギ酸	1292
	ガラクトース	ND		酢酸	1595
	イノマルトース	3548		ピログルタミン酸	22
	キシロース	350		合計	17725
	グルコース	1049			
	合計	6320			

【0032】

2 倍希釈もろみ濃縮液で乳酸菌が良好な生育を示すことが判明したので、この培地を用い、アルコール耐性を示す 6 株の乳酸菌の増殖試験を行った。

2 0 0 m L 容の三角フラスコに、2 倍希釈もろみ濃縮液 2 0 0 m L を入れ、シリコ栓（株式会社三商販売）を施し、M R S 培地で前培養した乳酸菌株を接種し、3 7 °C で時々攪拌し、4 日間培養を行った。ただし、初発 pH は菌の増殖を考慮し、6 . 5 に調整した。培養試験の結果を表 3 に示す。

【 0 0 3 3 】

【 表 3 】

表3 もろみ濃縮液の有機酸等の分析値(菌株スクリーニング検討試験4日目)

	1	2	3	4	5	6
使用菌株	I-5	I-6	I-9	I-13	I-19	I-28
pH	5.04	4.95	5.00	5.04	5.08	5.00
生菌数(cells/mL)	7.0×10^8	4.9×10^8	4.1×10^8	3.8×10^8	3.2×10^8	4.7×10^8
還元残糖(wt%)	2.07	1.96	2.07	1.71	2.11	2.15
リン酸	828	877	828	858	802	805
クエン酸	58	54	55	118	ND	111
酒石酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ピルビン酸	376	341	328	295	307	361
リンゴ酸	3201	3167	3070	3105	3035	3076
コハク酸	1855	2038	2117	1845	1817	1886
乳酸	20056	20030	20188	20237	19121	19878
ギ酸	757	596	605	552	711	754
酢酸	8167	7884	7947	7891	7911	7886
ピログルタミン酸	883	802	862	956	881	886
合計	36278	35888	35885	35856	34583	35649

有機酸単位:mg/L, ND:未検出。

10

【 0 0 3 4 】

表3の結果より、乳酸菌I-5株が優秀菌株として選択できた。

I-5株のもろみ濃縮液培養物には多量の乳酸菌生菌が含有され、プロバイオティクスとしての有用性が示唆された。

また、有機酸である乳酸が約2%も生成され、腸内細菌叢を整える作用が期待できる。

【 実施例 4 】

【 0 0 3 5 】

ビタミンの生成

更に、本発明の効果を明かにするため、スケールアップし、もろみ濃縮液でI-5株を培養し、乳酸菌の生菌数や組成、乳酸菌の特徴であるビタミンの生成を調べた。

3000mL容のジャーファーメンターに、2倍希釈もろみ濃縮液2000mLを入れ、5%アンモニア水で培地pHを6.5に調整した。MRS培地で前培養した乳酸菌培養液100mLを接種し、37℃無通気で、時々攪拌し、4日間培養を行った。乳酸菌増殖の結果を図3に示す。図3から、乳酸菌のもろみ濃縮液での増殖は3日目で最大に達することが判明した。表4に培養3日目の乳酸菌培養もろみ濃縮液の組成を示す。

30

【 0 0 3 6 】

【表4】

表4. 乳酸菌培養もろみ濃縮液の分析値

	もろみ濃縮液2倍希釈液(H14.11)	
	培養前	乳酸菌培養後
pH	6.50(調整前4.69)	5.41
生菌数(cells/mL)	0	1.4×10^9
還元糖精(wt%)	350	215
リン酸	867	733
クエン酸	2927	ND
酒石酸	ND	ND
ピルビン酸	1273	265
リンゴ酸	5525	3006
コハク酸	1549	1783
乳酸	2675	19433
ギ酸	1292	680
酢酸	1595	7111
ピログルタミン酸	22	919
合計	17725	33940

糖及び有機酸の単位:mg/L; ND =未検出

【0037】

表4より、乳酸菌I-5株はもろみ濃縮液の2倍希釈液で良好な増殖を示し、培養3日目で生菌数が 10^9 cells/mLに達し、十分な乳酸生菌を提供できることが判明した。また、有機酸含有量も培養前と比べ、総量で約2倍となり、特に乳酸は約2%となった。十分に乳酸菌I-5株が増殖したので、ビタミン類も生成しているものと考え、(社)日本分析センターにビタミンの分析を依頼し、乳酸菌発酵によるビタミン生成に対する効果を調べた。結果を表5に示す。

【0038】

【表5】

表5. 乳酸菌培養もろみ濃縮液のビタミン含量

分析項目	2倍希釈もろみ濃縮液	乳酸菌培養2倍希釈もろみ濃縮液
ビタミンE2(mg/100g)	0.09	0.14
ビタミンE6(mg/100g)	0.5	0.67
葉酸(μ g/100g)	5	46

【0039】

表5より明らかのように、乳酸菌I-5株にてもろみ濃縮液を発酵すると、多量のビタミンが生成されることが判明した。

中でも、葉酸はI-5株で発酵する前が $5 \mu\text{g/mL}$ であったものが、 $46 \mu\text{g/mL}$ と約10倍に増加しており、本発明の効果は明らかである。

【実施例5】

【0040】

免疫増強効果

乳酸菌I-5株の免疫増強効果を調べる為、マウスを使用した動物試験を行った。乳酸菌の効果を明瞭にするため、被検液として実施例2で培養した乳酸菌発酵もろみ濃縮液を遠心し、含まれる乳酸菌量を約10倍多くした発酵もろみ濃縮液を調製した。

即ち、実施例2で培養した乳酸菌発酵液2Lを遠心チューブにとり、6000回転で20分間遠心し、乳酸菌体を含む沈殿を得た。沈殿を先の遠心上清液で懸濁し、乳酸菌を含む液量を200mLとした。この液の乳酸菌の生菌数は 1.47×10^{10} cells/m

10

20

30

40

50

Lであった。

【0041】

実験動物は日本エスエルシー（株）より3.5週齢で購入したICR系雄性マウス（SPF）を4日間予備飼育して実験に供した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温24±3、相対湿度55±15%の感染動物飼育室（照明時間8時～18時、換気回数18回/時）で飼育した。なお、マウスの大腸菌感染時の週齢は5.5週齢とした。

マウスは5匹/ケージとし、滅菌蒸留水を給水瓶にて、またマウス用放射線滅菌固形飼料（CMF、オリエンタル酵母工業）を給餌器にて、それぞれ自由に与えた。これらの飼育器具は全て滅菌したものを使用した。なお、マウスの個体識別はピクリン酸を被毛に塗布した。

10

【0042】

被験物質として、先に調製した生菌数1.47×10¹⁰ cells/mLである乳酸菌培養もろみ濃縮液を用いた。

この溶液は冷暗所（4℃）に保存し、感染前11日間（1日1回）および感染後2時間の合計12回、それぞれマウス用経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量はマウスの体重30g当り0.5mLとした。

【0043】

感染菌株として病原性大腸菌である*Escherichia coli* Juhl（メルシャン株式会社生物資源研究所保存菌株）を使用した。

20

凍結乾燥保存菌にブドウ糖リン酸ペプトン水を加え復元し、SCD寒天平板培地（Lot No. 055012、日水製薬）に塗抹した。31℃で20時間培養し、再度SCD寒天平板培地に継代培養した（31℃、20時間）。生育した菌体をブドウ糖リン酸ペプトン水に懸濁して6×10⁷ CFU（= Colony Forming unit）/mLおよび2×10⁸ CFU/mLに調製した（MacFarland standard使用）。5.5週齢のマウスに各濃度の大腸菌0.5mLを腹腔内投与した（3×10⁷ CFU/マウスおよび1×10⁸ CFU/マウス）。動物数は一群10匹とした。群構成は表6に示した。

【0044】

【表6】

30

表6. 試験群構成

群No.	菌量 (CFU/マウス)	被験物質名
1	感染なし	対照 (蒸留水)
2	3×10 ⁷	対照 (蒸留水)
3	3×10 ⁷	乳酸菌培養もろみ濃縮液
4	1×10 ⁸	対照 (蒸留水)
5	1×10 ⁸	乳酸菌培養もろみ濃縮液

【0045】

40

検査項目は以下の通りである。

体重：大腸菌の接種日をday 0とし、day - 11, - 8, - 4, 0, 1, 3, 5および7に体重計にて測定した。day 0における体重に群間のバラツキが生じた場合には、day 0を基準とした体重増減で表した。一般症状：大腸菌接種日のday 0よりday 7まで毎日観察した。症状は個体別に記録し、顕著な変化がみられた症状項目を発現個体数で表した。死亡：マウスの死亡をday 0よりday 7まで毎日朝夕の2回調べた。マウスの死亡日より平均生存日数および死亡率（%）を計算した。採血および血漿保存：試験最終日に生存マウスをエーテル吸入麻酔下で心臓より採血し、遠心分離後の上清（血漿）部分を-80℃に凍結保存した。

【0046】

50

統計処理は以下の通りに行った。

体重、体重増減および平均生存日数は群毎の平均値 ± 標準誤差を算出した。また、これらのデータの対照群（2群および4群）に対する各群の統計的有意を検定するため、解析ソフト（Stat View, Abacus

Inc., USA）を用いて有意差の検定を行った（Studentのt検定、2群間の検定）。統計的有意差は $P < 0.05$ の場合を有意であるとした。試験結果を以下に示す。死亡マウスの死亡状況および生存日数を表7および図4に示す。

【0047】

【表7】

10

表7. 病原性大腸菌に対する乳酸菌培養もろみ濃縮液の防御効果試験(生存日数)

群No.	1	2	3	4	5
菌量	0	3×10^7	3×10^7	1×10^8	1×10^8
物質名 団体番号	対照	対照	乳酸菌培養 もろみ濃縮液	対照	乳酸菌培養 もろみ濃縮液
1	7	7	7	2*	7
2	7	7	7	1*	7
3	7	7	7	2*	7
4	7	7	7	7	7
5	7	7	7	3*	7
6	7	2*	7	2*	7
7	7	7	7	2*	2*
8	7	7	7	2*	7
9	7	7	7	2*	2*
10	7	7	7	2*	2*
死亡数 (%)	0/10 0.0	1/10 10.0	0/10 0.0	9/10 90.0	3/10 30.0
Mean	7.0	6.5	7.0	2.5	5.5
S.E.	0.0	0.5	0.0	0.5	0.8
p	NS(vs G2), <0.001(vs G4)		NS	-	<0.01

20

数値の7は7日以上生存を示す

*:死亡動物

NS:有意差なし

30

【0048】

表7および図4より、 3×10^7 CFU/マウスの大腸菌を接種したグループにおいて、対照群（感染）は1/10例の死亡を示した。これに対し、乳酸菌培養もろみ濃縮液投与群は0/10例の死亡を示した。平均生存日数は対照群（感染）が 6.5 ± 0.5 以上を示したのに対し、乳酸菌培養もろみ濃縮液投与群は 7.0 ± 0.0 以上を示し、両群間に大差は認められなかった。 1×10^8 CFU/マウスの大腸菌を接種したグループでは、対照群（感染）が9/10例（90%）の死亡を示した。これに対し、乳酸菌培養もろみ濃縮液投与群は3/10例（30%）の死亡を示し、乳酸菌培養もろみ濃縮液投与群で顕著な死亡マウス数の減少がみられた。また、平均生存日数は対照群（感染）が 2.5 ± 0.5 以上を示したのに対し、乳酸菌培養もろみ濃縮液投与群は 5.5 ± 0.8 以上を示し、乳酸菌培養もろみ濃縮液が有意な生存日数の延長を示した（ $p < 0.01$ ）。乳酸菌培養もろみ濃縮液の大腸菌感染防御効果が明らかとなった。

40

【0049】

体重測定結果を表8、表9および図5、図6に示す。

【表 8】

表8. 病原性大腸菌感染に対する乳酸菌培養もろみ濃縮液の防衛効果試験(体重観測データ)

群	菌量	被験物質	個体番号	体重(g)							
				Day -1	Day -3	Day -4	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
1	感染なし	対照 (蒸留水)	1-1	23.6	29.5	32.0	33.0	33.4	34.0	35.3	36.5
			1-2	22.0	27.5	31.0	32.8	32.8	33.7	34.2	35.9
			1-3	22.4	29.8	33.8	35.7	36.1	36.5	37.1	38.6
			1-4	22.3	28.1	31.9	33.3	33.9	34.1	34.9	36.0
			1-5	19.8	25.8	30.1	31.0	30.3	31.4	32.1	33.1
			1-6	23.4	29.7	33.8	34.8	34.3	35.2	36.2	38.3
			1-7	23.3	28.3	31.5	33.1	33.8	34.5	35.5	36.7
			1-8	24.1	29.4	33.2	35.8	36.4	37.3	38.3	38.8
			1-9	23.3	28.8	30.5	32.1	32.2	33.2	33.8	34.5
			1-10	23.4	28.5	31.8	34.0	34.2	34.8	35.7	37.2
2	3x10 ⁷	対照 (蒸留水)	2-1	24.1	30.8	35.7	37.8	33.8	36.2	38.1	41.3
			2-2	22.8	28.8	32.4	33.8	30.7	31.2	33.1	34.8
			2-3	21.3	26.7	30.4	32.0	28.8	29.7	31.1	32.7
			2-4	20.8	25.7	29.4	31.0	27.8	29.2	30.7	32.8
			2-5	23.7	30.0	34.0	35.8	32.2	29.8	31.6	34.1
			2-6	23.2	28.8	33.9	37.5	34.0	-	-	-
			2-7	23.6	29.0	33.7	37.0	32.8	35.8	37.0	39.8
			2-8	22.7	27.8	32.4	35.1	30.8	31.5	33.9	36.0
			2-9	22.5	27.8	30.4	32.4	28.4	29.8	31.9	33.8
			2-10	22.9	28.1	30.7	32.7	28.8	30.9	31.8	34.0
3	3x10 ⁷	乳酸菌培養 もろみ濃縮液	3-1	20.7	26.2	28.9	30.1	27.9	25.7	27.7	29.9
			3-2	24.4	30.1	33.7	36.1	32.2	33.2	34.7	38.0
			3-3	19.3	24.8	29.7	31.9	28.4	30.7	32.8	34.3
			3-4	21.9	26.4	30.1	32.1	27.8	30.2	32.4	34.9
			3-5	23.8	28.8	33.6	35.7	31.3	33.4	34.7	37.7
			3-6	24.4	30.7	36.0	38.0	34.3	36.3	38.0	39.9
			3-7	23.8	28.5	32.6	35.6	31.7	33.0	35.1	38.3
			3-8	23.7	28.3	32.6	34.9	30.3	31.6	33.2	36.4
			3-9	22.8	27.0	29.8	31.5	28.1	29.4	31.4	33.7
			3-10	24.4	29.4	32.6	33.0	31.1	32.5	34.3	37.0
4	1x10 ⁸	対照 (蒸留水)	4-1	22.8	28.8	33.3	35.3	32.3	-	-	-
			4-2	21.9	27.9	32.6	34.9	-	-	-	-
			4-3	24.0	29.0	30.7	33.1	29.2	-	-	-
			4-4	23.4	28.9	33.4	35.3	32.8	28.4	28.8	29.9
			4-5	23.1	27.5	31.1	34.5	31.5	-	-	-
			4-6	22.3	28.8	34.8	37.4	33.7	-	-	-
			4-7	21.6	26.6	30.5	31.4	29.0	-	-	-
			4-8	22.5	28.9	32.0	34.1	31.9	-	-	-
			4-9	22.2	28.2	32.0	34.5	31.7	-	-	-
			4-10	23.1	28.6	31.8	33.5	31.2	-	-	-
5	1x10 ⁸	乳酸菌培養 もろみ濃縮液	5-1	23.2	28.9	33.2	29.9	27.2	28.2	29.1	31.1
			5-2	24.0	31.8	35.8	38.4	34.0	35.1	37.9	38.8
			5-3	23.0	28.4	32.9	34.6	30.8	28.4	31.6	33.8
			5-4	24.7	30.9	33.5	36.2	32.2	28.0	31.4	34.4
			5-5	21.3	26.9	30.8	32.3	29.2	27.1	28.8	33.3
			5-6	22.5	27.4	30.7	32.8	30.3	25.9	29.5	32.2
			5-7	21.9	27.4	33.0	36.0	32.9	-	-	-
			5-8	23.0	28.4	32.5	34.0	31.8	33.8	34.9	38.4
			5-9	22.0	27.4	32.0	33.2	31.0	-	-	-
			5-10	22.4	28.1	35.8	38.8	38.2	-	-	-

--死亡

【 0 0 5 0 】

10

20

30

【表 9】

表9. 病原性大腸菌感染に対する乳酸菌培養もろみ濃縮液の防御効果試験(体重推移データ)

群	菌量	接種物質		体重(g)							
				Day -11	Day -8	Day -4	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
1	感染なし	対照 (蒸留水)	Mean	22.8	28.5	32.0	33.5	33.7	34.5	35.3	35.6
			S.E.	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6
			p:vs Q2	NS	NS	NS	NS	<0.01	<0.01	NS	NS
			p:vs Q4	NS	NS	NS	NS	<0.05	-	-	-
2	3×10^7	対照 (蒸留水)	Mean	22.7	28.3	32.3	34.5	30.7	31.5	33.4	35.5
			S.E.	0.3	0.5	0.6	0.8	0.7	0.9	1.0	1.0
			p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3	3×10^7	乳酸菌培養 もろみ濃縮液	Mean	22.6	28.0	32.0	34.2	30.3	31.6	33.4	36.0
			S.E.	0.6	0.6	0.7	0.8	0.7	0.9	0.9	0.9
			p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4	1×10^8	対照 (蒸留水)	Mean	22.7	28.2	32.2	34.4	31.5	28.4	28.8	29.9
			S.E.	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	-	-	-
			p								
5	1×10^8	乳酸菌培養 もろみ濃縮液	Mean	22.6	28.5	33.0	34.4	31.5	29.2	32.0	34.4
			S.E.	0.3	0.4	0.5	0.8	0.8	1.4	1.2	1.1
			p	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-

NS:有意差なし。

10

【0051】

表 8、表 9、図 5、図 6 より、感染前の体重推移でみた場合、 3×10^7 CFU/マウスの大腸菌接種および 1×10^8 CFU/マウスの大腸菌接種のいずれのグループにおいても、乳酸菌培養もろみ濃縮液群は対照群（非感染）および対照群（感染）との間に大きな体重差を示さなかった。感染後の体重推移では、 3×10^7 CFU/マウスの大腸菌接種グループにおいて、乳酸菌培養もろみ濃縮液群は対照群（感染）との間に大きな体重差を示さなかった。 1×10^8 CFU/マウスの大腸菌接種グループでは、day 3以降の対照群（感染）の生存動物数が 1 例のため、乳酸菌培養もろみ濃縮液群との差を判断できなかった。

20

【0052】

一般症状の観察結果を表 10 に示した。

【表 10】

表10 病原性大腸菌感染に対する乳酸菌培養もろみ濃縮液の防御効果試験(症状観察)

群No	菌量 被験物質	症状項目	day								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
1	0 対照	立ち毛	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		沈黙化	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		軟便・便付着	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		下痢	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		肛門充血	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2	3x10 ⁷ 対照	立ち毛	0/10	10/10 ^{**}	8/9 ^{**}	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
		沈黙化	10/10 ^{**}	0/10	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
		軟便・便付着	1/10	4/10 ^{**}	3/9 ^{**}	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
		下痢	0/10	1/10	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
		肛門充血	0/10	0/10	0/9	1/9	0/9	2/9	0/9	0/9	0/9
3	3x10 ⁷ 乳酸菌培養 もろみ濃縮液	立ち毛	0/10	10/10 ^{**}	8/10 ^{**}	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		沈黙化	10/10 ^{**}	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		軟便・便付着	2/10	8/10 ^{**}	3/10 ^{**}	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		下痢	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		肛門充血	0/10	0/10	2/10	3/10 ^{**}	2/10	2/10	1/10	1/10	1/10
4	1x10 ⁸ 対照	立ち毛	0/10	8/9 ^{**}	2/2 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}
		沈黙化	10/10 ^{**}	3/9 ^{**}	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		軟便・便付着	1/10	4/9 ^{**}	1/2 ^{**}	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		下痢	0/10	3/9 ^{**}	1/2 ^{**}	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		肛門充血	0/10	0/9	0/2	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}	1/1 ^{**}
5	1x10 ⁸ 乳酸菌培養 もろみ濃縮液	立ち毛	0/10	10/10 ^{**}	5/7 ^{**}	5/7 ^{**}	5/7 ^{**}	0/7	0/7	0/7	0/7
		沈黙化	10/10 ^{**}	1/10	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		軟便・便付着	2/10	6/10 ^{**}	5/7 ^{**}	4/7 ^{**}	4/7 ^{**}	3/7 ^{**}	4/7 ^{**}	4/7 ^{**}	4/7 ^{**}
		下痢	0/10	2/10	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
		肛門充血	0/10	0/10	0/7	1/7	1/7	4/7 ^{**}	1/7	1/7	1/7

異常動物数/供試動物数

※:30%以上の動物に出現した項目

【0053】

表10より、3 × 10⁷ CFU / マウスの大腸菌接種グループにおいて、対照群（感染）に比べて乳酸菌培養もろみ濃縮液群が軽度の軟便および肛門部の便付着を示した動物数の増加と肛門部の充血を示す動物数の増加を示した。また、1 × 10⁸ CFU / マウスの大腸菌接種グループにおいて、day 1までの変化では対照群（感染）と乳酸菌培養もろみ濃縮液群との間に一般症状の差が認められなかった。day 3以降では、対照群（感染）の生存動物数が1例のため、乳酸菌培養もろみ濃縮液群との間の一般症状の差を判断できなかった。

【0054】

一群10匹のマウスに3 × 10⁷ CFU / マウスまたは1 × 10⁸ CFU / マウスの大腸菌を接種し、死亡動物数、生存日数、体重および一般症状の変化から乳酸菌培養もろみ濃縮液の防御効果を検討した。

その結果、3 × 10⁷ CFU / マウスの大腸菌を接種したグループにおいて、乳酸菌培養もろみ濃縮液群は対照群（感染）と比べてマウスの死亡匹数、平均生存日数および体重に顕著な差を示さなかったが、一般症状観察において軽度の消化器症状発現動物数の増加を示した。一方、1 × 10⁸ CFU / マウスの大腸菌を接種したグループにおいて、乳酸菌培養もろみ濃縮液群は対照群（感染）と比べて一般症状に差を示さないものの、顕著なマウスの死亡匹数の減少と有意な平均生存日数の延長を示した。以上の結果から、乳酸菌培養もろみ濃縮液はマウスの大腸菌感染に対する強い感染防御作用を有することが判明した。

したがって、本発明の乳酸菌および発酵もろみ濃縮液の動物における免疫増強作用が証明された。

【実施例6】

【0055】

飼料

本発明の乳酸菌は、上記のとおり、いわゆる熟成もろみ、この例では、繰り返し回分発酵なる発酵法により最終回に取得した熟成もろみであり、その後の蒸留工程で回収するエタノール分も含む中間工程品であって、当該熟成もろみの蒸留によりエタノール分ともろみ濃縮液とに分離された、当該濃縮液から分離されたものである。

飼料は、このもろみ濃縮液（アルコール発酵残渣）を増殖可能な濃度に希釈すると共に pH を例えば 6 ~ 6.5 程度に調整した所要の育成条件の基で、当該もろみ濃縮液に本発明の乳酸菌を添加するという人為的方法によって当該もろみ濃縮液に本発明の乳酸菌を増殖（乳酸発酵）させたものであり、こうしてアルコール発酵によって副生する残渣（廃液）を乳酸発酵生成物化して飼料としたものである。

10

【0056】

この乳酸発酵生成物は、直接、主な飼料の配合物として混合することによって飼料原料として利用することもできるし、乳酸発酵生成物を一旦遠心分離後、沈殿、粉末化したものを主な飼料の配合物として混合することによって飼料原料として利用することもできる。また、乳酸発酵生成物を直接或いは遠心分離後、沈殿、粉末化したもののみを飼料とすることもできる。

【0057】

図7のフローに基づいて、飼料原料の製造方法の一例を説明する。

まず、もろみ濃縮液（濃縮残渣および残渣濃縮液）の一部をスタータータンク（小規模タンク）に導入する。

20

次に、予め培養（前々培養 前培養）してあった本発明の乳酸菌を前記スタータータンクに導入して、所定の攪拌、pH および温度条件の基で本発明の乳酸菌を培養する。

次に、所定の濃度まで達した本発明の乳酸菌を、もろみ濃縮液を導入（所定の攪拌、pH および温度条件の基）した発酵タンク（大規模タンク）に添加し、多量の本発明乳酸菌を培養する。

次に、発酵タンクで所定濃度まで達した本発明の乳酸菌を、遠心分離にかけ、沈殿物（＝乳酸菌を含むもの）とする。

最後に、この沈殿物を粉末化手段例えば流動層造粒、スプレードライ、真空凍結（粉碎工程要）等により粉末化し、当該粉末物を回収しそのままおよび所定の加工（＝配合）、包装を施し飼料とする。

30

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明の乳酸菌を原料若しくは少なくとも原料の一つとした飼料は、当該乳酸菌の免疫増強作用および整腸作用等が発揮される有用な飼料として提供できると共に、当該飼料が、従来では破棄されていたアルコール残渣の乳酸発酵生成物であるため、飼料或いは飼料原料としての生産コストを低廉化することができ、牛・鶏・豚等の家畜やペットの好適な飼料として提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0059】

40

【図1】 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* I-5 株とタイプカルチャーである NBRC 15889 株の増殖温度範囲を示した図である。

【図2】 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* I-5 株とタイプカルチャーである NBRC 15889 株のアルコール存在下での増殖を示した図である。

【図3】 本発明の I-5 株のもろみ濃縮液 2 倍希釈液での増殖曲線である。

【図4】 乳酸菌発酵もろみ濃縮液の生存日数延長効果を示した図である。

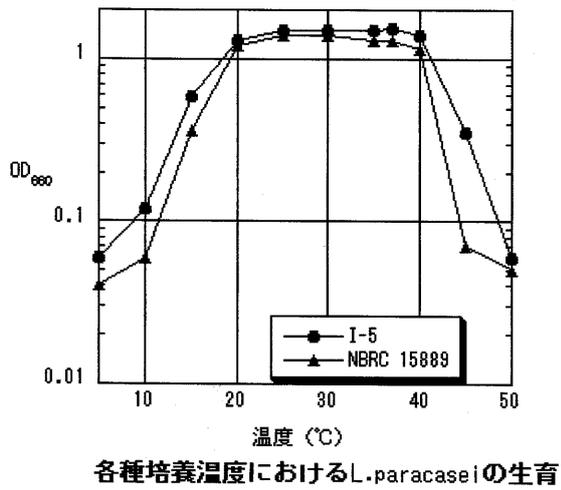
【図5】 乳酸菌発酵もろみ濃縮液の感染防御試験（体重変化、感染菌量： 3×10^7 CFU）結果を示した図である。

50

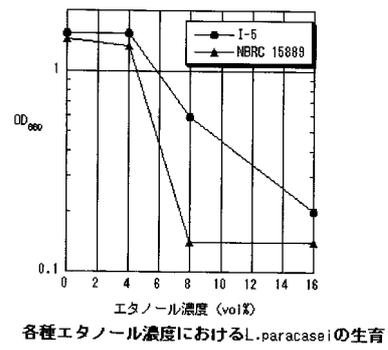
【図6】乳酸菌発酵もろみ濃縮液の感染防御試験（体重変化、感染菌量： 1×10^8 CFU）結果を示した図である。

【図7】飼料原料の製造方法を示すフロー図である。

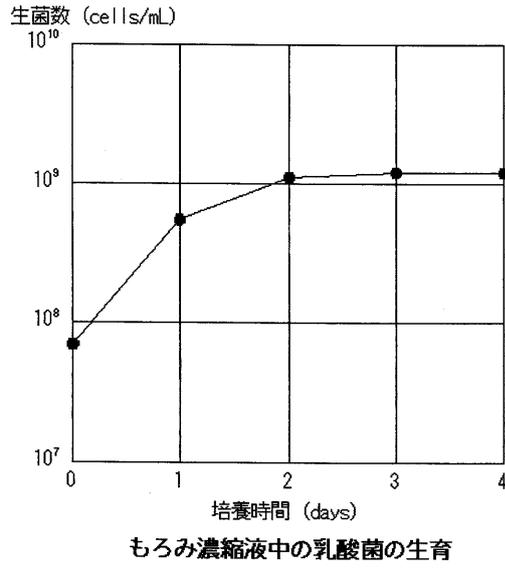
【図1】



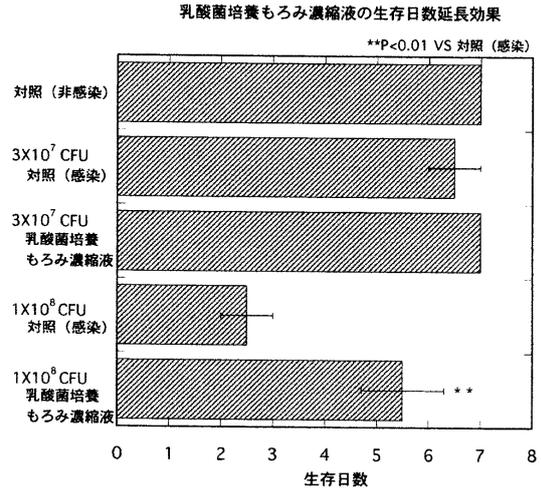
【図2】



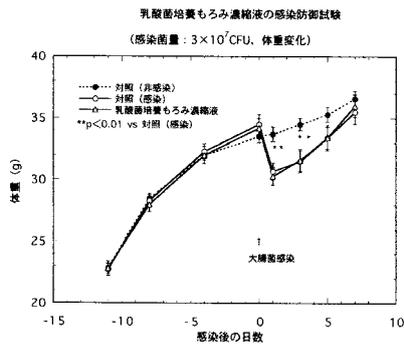
【 図 3 】



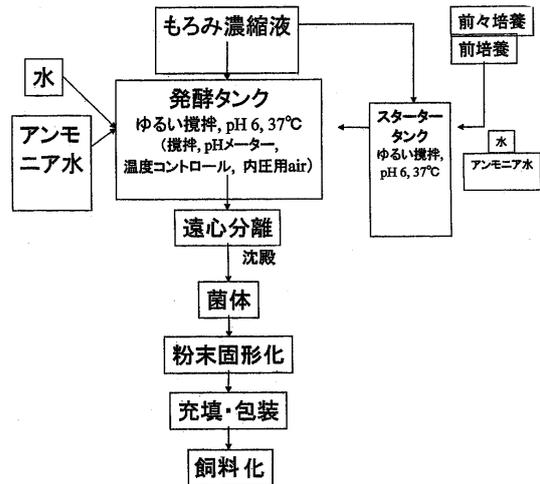
【 図 4 】



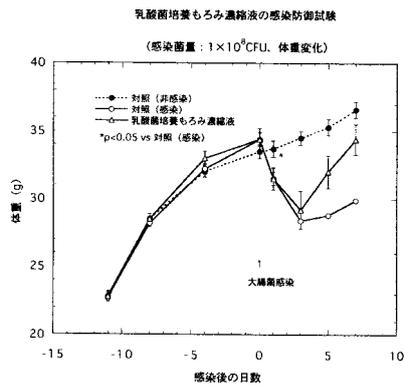
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平02 - 257832 (JP, A)
特開平10 - 243774 (JP, A)
特開2000 - 342247 (JP, A)
特開2002 - 142686 (JP, A)
J. Brew. Soc. Japan, 1993, Vol. 88, No. 3, p. 238-244

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08
A23K 1/00 - 1/175、1/20 - 1/24、
3/00 - 3/04
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)