〔生物工学会誌　第88巻　第3号　114–120. 2010〕

2009年 生物工学技術賞 受賞

乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築

古田　吉史[1*]・丸岡　生行[1]・中村　彰宏[1]
大森　俊郎[1]・園元　謙二[2,3]

Novel conversion processes with lactic acid bacteria from *shochu kasu* into valuable materials

Yoshifumi Furuta[1*], Naruyuki Maruoka[1], Akihiro Nakamura[1], Toshiro Omori[1], and Kenji Sonomoto[2, 3] (*Research Laboratory, Sanwa Shurui, Co., Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa, Oita 879-0495*[1]; *Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School*[2]; *Department of Functional Metabolic Design, Bio-Architecture Center*[3], *Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581*) Seibutsu-kogaku **88**: 114–120, 2010.

はじめに

近年の焼酎ブームに伴い焼酎製造時に副生する“焼酎蒸留粕”（焼酎粕）の量は急増し，九州・沖縄エリアで年間80～90万トンもの焼酎粕が発生している．焼酎粕は水分90%以上，BOD値で数万ppmと高濃度の有機物を含むため，その処理はきわめて困難であるとされてきた．近年の国際的な地球環境保全の高まりから，各メーカーは鋭意開発を重ね，焼酎粕の一部は濃縮・乾燥により家畜の飼料や肥料[1)]あるいは飲料用素材[2)]などとしてすでに有効活用されている．しかしながら，その多くは依然として海洋投入などにより産廃処理されている．そのため，焼酎粕をさらに有効活用し，リサイクルを促進するための新しいプロセスの構築が望まれている．

今回，焼酎粕の新規用途開発の一環として，著者らは乳酸菌を利用した焼酎粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築を試みた．本取り組みでは，（1）大麦焼酎粕からの食品グレードの発酵大麦エキス（fermented barley extract, FBE）の作製とその培地素材としての有効性の評価，（2）FBE中に含まれる乳酸菌およびビフィズス菌増殖促進成分の探索，（3）FBE培地から乳酸菌を用いた有用物質（ナイシンA，γ-アミノ酪酸（GABA））生産技術の開発，ならびに（4）実証設備における生産性の確認と実用化の4点に着目し技術開発を行った．本稿では，それらの研究成果と実用化の状況について紹介したい．

大麦焼酎粕からのFBEの作製

図1に示すように，減圧蒸留直後の新鮮な大麦焼酎粕を振動篩（1 mm），スクリュープレスおよびセラミックろ過（0.2 μm）に供して大麦由来の繊維質，酵母や麹菌体などの固形分残渣を除去し，清澄なエキスである発酵

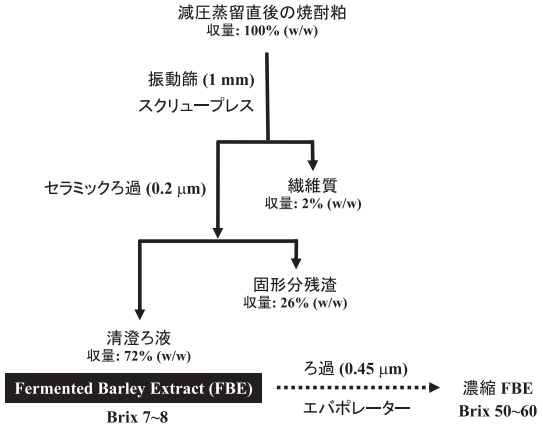

図1．大麦焼酎粕からの発酵大麦エキス（FBE）の作製法

*著者紹介（代表）　三和酒類株式会社研究所（室長）　E-mail: furuta-y@kokuzo.co.jp
[1]三和酒類株式会社，[2]九州大学農学研究院，[3]九州大学バイオアーキテクチャーセンター
写真　上段左より古田，丸岡，中村；下段左より大森，園元．

大麦エキス：FBE（Brix 7 ～ 8）を作製した．なお，本稿のすべての試験において，FBE のエキス分の濃度（Brix）については，屈折計（Atago PAL-1, Tokyo）を用いて測定した．FBE中には，アミノ酸・ペプチド・タンパク質が全体の約45%（w/dry weight），グリセロールやオリゴ糖などの糖類が約37%（w/dry weight），クエン酸を中心とする有機酸類が約11%（w/dry weight）および灰分が約4%（w/dry weight）含まれていた．

FBEの培地素材としての有効性の評価

先に示したように，FBEには主要な構成成分としてアミノ酸・ペプチド・タンパク質が約45%，糖類が約37%含まれているが，糖類については，FBEはエタノール発酵後の残液であるため微生物が資化可能な糖類はほとんど含まれていない．そこで本研究では，主にFBE中に豊富に含まれる窒素源（アミノ酸・ペプチド・タンパク質）に着目し，試薬培地（対照）に含まれる窒素源を等しい全窒素（TN）量の FBE で置換した場合の培地力価について評価を行った．

培地には，乳酸菌の試薬培地（対照）として，TN が0.23%（w/w）のCMG培地（1.00%（w/v）yeast extract, 1.00%（w/v）polypeptone, 0.50%（w/v）NaCl, 5.00%（w/v）glucose）を，ビフィズス菌の試薬培地（対照）として，同じくTNが0.23%（w/w）のBifidobacterium培地（1.00%（w/v）casein, 0.50%（w/v）meat extract, 0.50%（w/v）yeast extract, 1.00%（w/v）ascorbic acid, 0.30%（w/v）K_2HPO_4, 0.05%（w/v）cysteine hydrochloride, 0.10%（w/v）Tween 80, 1.00%（w/v）glucose）を用いた．また，どちらの対照についても，窒素源のみを2分の1量および4分の1量にしたTN 0.12%（w/w）CMG培地とTN 0.06%（w/w）CMG培地，およびTN 0.12%（w/w）Bifidobacterium培地，TN 0.06%（w/w）Bifidobacterium培地を併せて作製した．一方，FBEを用いた乳酸菌およびビフィズス菌の培地については，対照と TN が等しくなるようにFBEのエキス分濃度を調整したBrix 4.6 FBE培地（TN：0.23%（w/w））, Brix 2.3 FBE 培地（TN：0.12%（w/w））および Brix 1.2 FBE 培地（TN：0.06%（w/w））の3種を作製した．なお，窒素源以外のその他の成分については，それぞれの対照と同量・同組成の成分をFBE培地に添加した[3]．

図2Aに*Lactobacillus fermentum* NBRC 3071の増殖曲線を，Bに*Bifidobacterium longum* JCM 1217^{T}の増殖曲線を示した．等しい TN の対照と FBE 培地を比較した場合，*L. fermentum* NBRC 3071と*B. longum* JCM 1217^{T}のどちらについても，いずれの TN においても明らかに対照と比べてFBE培地での増殖が速く，得られた最大菌体量もFBE培地の方が高かった．一方，*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454（図2C）と*Enterococcus faecalis* NCIMB 8275（図2D）の増殖は，等しい3点のTNで対照とFBE培地を比較した場合，ほぼ同様の傾向が見られた．すなわち，FBE培地では対照と比べて培養初期に増殖が立ち遅れたが，培養後期には対照とほぼ等しい菌体量に達した．

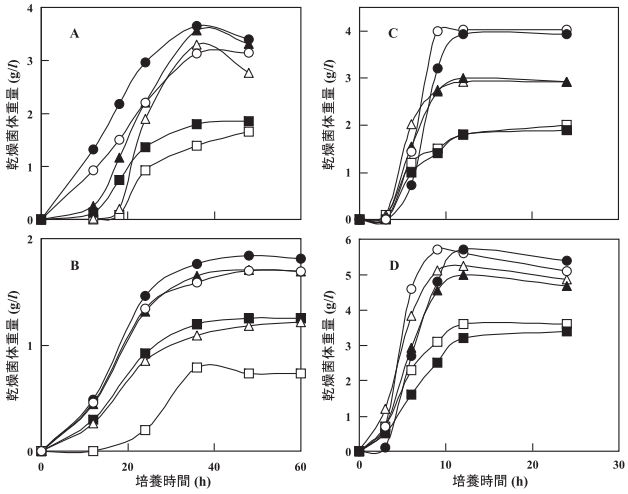

図2．等しいTNの試薬培地（対照）とFBE培地における菌体増殖の比較．A，*L. fermentum* NBRC 3071；B，*B. longum* JCM 1217^T；C, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454；D, *E. faecalis* NCIMB 8275．○，TN 0.23 対照；●，Brix 4.6 FBE (TN 0.23)；△，TN 0.12 対照；▲，Brix 2.3 FBE (TN 0.12)；□，TN 0.06 対照；■，Brix 1.2 FBE (TN 0.06).

以上のように，FBEの培地窒素源としての力価を，等しい TN で既存の高価な対照の窒素源と比較したところ，いずれの菌に関してもFBEは代替可能な優れた培地窒素源であることが示された．さらに菌種によっては，等しいTNの対照に比べてFBE培地での増殖が顕著に高かったことから，FBE中には乳酸菌やビフィズス菌に対する何らかの増殖促進成分が存在している可能性が示唆された[3]．そこで次に，FBE中に含まれる増殖促進因子の探索を行った．

FBE中に含まれる乳酸菌およびビフィズス菌増殖促進因子の探索

図3にFBEの分画法を示した．Brix 8のFBE原液をエバポレーターにより Brix 25まで濃縮し，これにエタノールを終濃度90%（v/v）となるように添加した．得られた上清のエタノール溶性画分（ethanol soluble：ES 画分）と沈殿のエタノール不溶性画分（ethanol insoluble：EI 画分）をろ紙ろ過により分け，それぞれの画分を凍結乾燥した．さらに，EI 画分を蒸留水に再溶解し，その後HPLC 前処理用の Waters 社製 Sep-Pak® Plus C_{18} カート

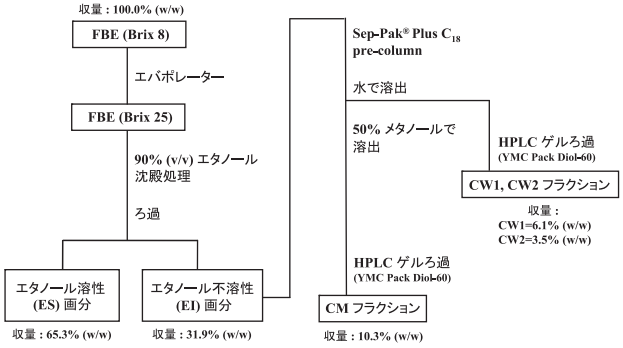

図3. FBEの分画法

リッジに供して，蒸留水と50%メタノールで溶出した．得られた水溶出画分とメタノール溶出画分を濃縮後，それぞれをYMC Pack Diol-60 ゲルろ過カラムを備えたHPLCに供した．254 nmおよび450 nmでのモニタリング結果を基に，水溶出画分からCW1とCW2フラクション，メタノール溶出画分からCMフラクションを分取した．

EIおよびES画分をそれぞれ所定の試薬培地（対照），乳酸菌の場合にはTN 0.12%（w/w）CMG培地，ビフィズス菌の場合にはTN 0.23%（w/w）Bifidobacterium培地に1%（w/v）添加して試験管培養を実施したところ，使用したいずれの乳酸菌（*L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007，*L. fermentum* NBRC 3071，*L. plantarum* NBRC 3070），ビフィズス菌（*B. bifidum* JCM 1254，*B. longum* JCM 1217^T）についても，EI画分を添加した場合に菌体量が対照に比べて顕著に増大した（表1）[4]．次に，EI画分をSep-Pak® Plus C_{18}カートリッジおよびHPLCゲルろ過に供して得られた3つのフラクション（CW1，CW2，CM）を対照に添加した場合の*L. fermentum* NBRC 3071と*B. longum* JCM 1217^{T}の増殖に及ぼす影響を調べたところ，どちらの菌株についても，CMにはほとんど増殖促進効果は見られなかったが，CW1およびCW2はどちらの菌株に対しても強い増殖促進効果を示した（表2）．

CW1およびCW2画分には遊離の糖およびアミノ酸は含まれていなかったため，酸加水分解後にHPLC分析によりその組成を調べたところ，CW1には94%（w/w）のオリゴ糖と6%（w/w）のペプチドが，CW2には88%（w/w）のオリゴ糖と12%（w/w）のペプチドが含まれていた．また，加熱処理試験（110°C，10 min）ならびに

表1. FBE由来EIおよびES画分の菌体増殖に及ぼす影響

菌株	菌体増殖（Absorbance 560 nm）		
	対照	ES画分	EI画分
L. lactis subsp. *lactis* NBRC 12007	1.1	0.9	1.4
L. fermentum NBRC 3071	0.9	1.1	3.1
L. plantarum NBRC 3070	1.2	1.3	4.4
B. bifidum JCM 1254	1.5	1.4	2.3
B. longum JCM 1217^T	4.6	5.2	6.4

EIおよびES画分を対照（乳酸菌の場合はTN 0.12%（w/w）CMG培地，ビフィズス菌の場合はTN 0.23%（w/w）Bifidobacterium培地）に1.0%（w/v）添加．乳酸菌については30°Cまたは37°Cで24時間振とう（100 strokes/min）培養を行い，ビフィズス菌については37°Cで48時間静置培養を行った．

表2. EI画分由来CW1，CW2およびCMフラクションの菌体増殖に及ぼす影響

サンプル	収量%（w/w）	菌体増殖（Absorbance 560 nm）	
		L. fermentum NBRC 3071	*B. longum* JCM 1217^T
EI	100	3.5	6.0
CW1	19	2.6	5.0
CW2	11	2.9	5.1
CM	32	1.2	4.4
対照	—	1.0	4.3

1%（w/v）EI画分に由来する量のCW1，CW2およびCMフラクション（CW1，0.19；CW2，0.11；CM，0.32%（w/v））を，対照（乳酸菌の場合はTN 0.12%（w/w）CMG培地，ビフィズス菌の場合はTN 0.23%（w/w）Bifidobacterium培地）に添加．乳酸菌については30°Cまたは37°Cで24時間振とう（100 strokes/min）培養を行い，ビフィズス菌については37°Cで48時間静置培養を行った．

限外ろ過膜を用いた試験結果から，CW1とCW2に含まれる増殖促進因子は熱に安定な分子量3000以下の低分子物質であると推察された[5].

以上のような結果から，FBE中に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進に関与する成分としてオリゴ糖又はペプチドが考えられる．FBEと同じ原料の大麦に由来するものとして，麦芽エキス由来のペプチド画分[6]やヘミセルロース高含有の発芽大麦[7]に，また原料は異なるがFBEと同様な発酵物として，酒粕の水抽出物[8]や米糠麹[9]に乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進効果があることが報告されている．しかしながら，いずれの報告でも具体的な活性成分の同定まではされていないため，互いに類似する化合物であるかは不明である．今後，さらに精製を進め具体的な成分の特定に努めたいと考えている．

FBE培地を用いたナイシンA生産技術の開発

ナイシンは，異常アミノ酸を含む34のアミノ酸残基からなる抗菌ペプチドであり，これまでのところアミノ酸残基が一部異なる3つの類縁体（ナイシンA，Z，Q）が報告されている[10–12]．その中でも，ナイシンAは乳酸菌バクテリオシンの中で唯一WHO（World Health Organization）やFAO（Food and Agriculture Organization）から安全であるとの承認を受けている物質であり，数十年に亘り世界50ヵ国以上で食品保存料として使用されている[13–16]．なお，日本国内では，ナイシンAは2009年3月2日に厚生労働省により新規食品添加物として認可されている．

ナイシンA生産菌である*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454株を使用し，温度，撹拌速度およびpHを，30°C，250 rpmおよび5.5に制御しつつ培養を実施した．初発に十分量の炭素源である4.5%（w/v）のglucoseを添加したBrix 1 ～ 4のFBE培地にて試験を行ったところ，菌体増殖はBrix 3または4で最大に達したが，ナイシンA生産はBrix 2または3で最大に達し，Brix 4では逆に低下した（図4）．このような結果から，ナイシンA生産を目的とした場合のFBE培地の最適Brixは2～3であると思われた．したがって，Brix 2と3の中間値であるBrix 2.5を，ナイシンA生産用のFBE培地の最適Brixとした．

次に，最適化されたBrix 2.5 FBE培地と，試薬培地（対照）として用いたTN 0.12%（w/w）CMG培地，対照にFBE由来のESおよびEI画分をそれぞれ0.5%（w/v）添加した群の計4群で，ナイシンA生産と菌体増殖を比較した結果を図5に示した．Brix 2.5 FBE培地では，培養初期に菌体増殖およびナイシンA生産が共に対照と比べて遅延したものの，培養後期には対照を若干上回った．また，対照へのEI画分添加により菌体増殖およびナイシンA生産共に顕著に増大し，ES画分添加により菌体増殖はほとんど影響を受けなかったが，ナイシンA生産は低下した（低下の要因は現在のところ不明）．それぞれの群におけるナイシンAの最大生産量は，Brix 2.5 FBE培地は対照の1.1倍，EI画分添加群では対照の1.3倍，ES画分添加群では0.85倍であった．

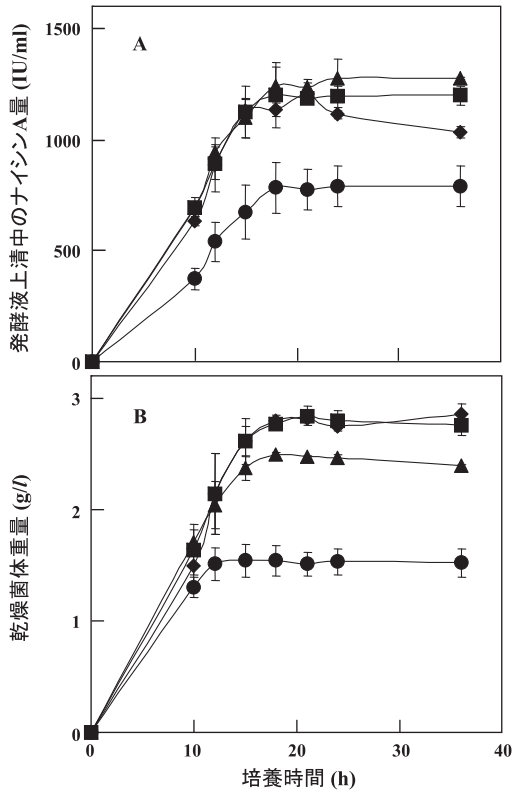

図4．異なる濃度（Brix）のFBE培地における*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454のナイシンA生産と菌体増殖の比較．A，ナイシンA生産；B，菌体増殖．●，Brix 1.0 FBE；▲，Brix 2.0 FBE；■，Brix 3.0 FBE；◆，Brix 4.0 FBE. 4.5%（w/v）glucoseを添加した．データは2回の培養試験の平均値であり，図中のエラーバーは標準偏差を示す．

焼酎粕と同様な食品副産物として乳清ホエーを用いたナイシン生産が報告されているが，十分なナイシン生産を得るためには酵母エキスやカゼイン分解物などの高価な窒素源を添加する必要があった[17–19]．これに対し，本研究では，FBE濃度を最適化し，glucoseのみを添加したシンプルな培地で，栄養豊富な高価な試薬培地と同等量のナイシンAを生産することが可能であった．この結果から，FBEはナイシンA生産用の廉価で優れた培地素材として利用可能であり，かつFBEを抗菌活性を有する付加価値の高い素材に転換できる可能性が示唆された．さらにFBE由来のEI画分にはナイシン生産を顕著に高める効果があることが明らかとなった[20,21]．

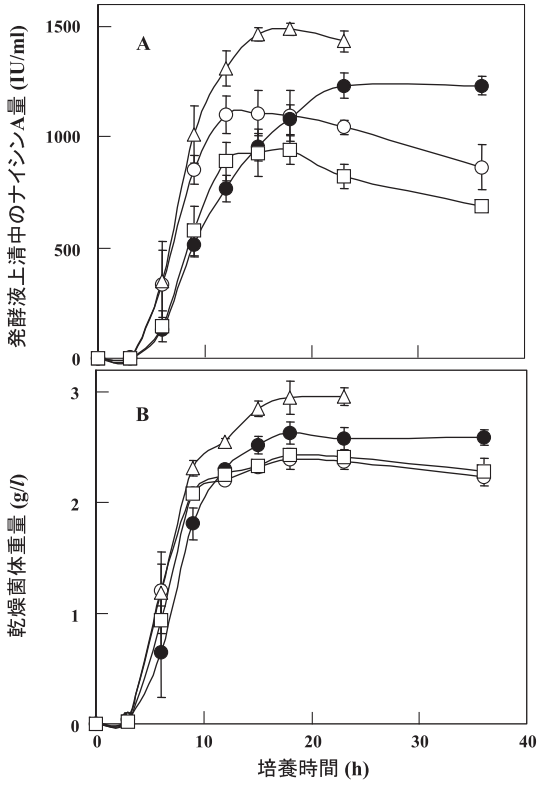

図5. 異なる培地における *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 のナイシンA生産と菌体増殖の比較．A，ナイシンA生産；B，菌体増殖．○，対照（TN 0.12%（w/w）CMG 培地）；△，対照＋EI画分（0.5%（w/v）添加）；□，対照＋ES画分（0.5%（w/v）添加）；●，Brix 2.5 FBE培地（4.5%（w/v）glucose添加）．データは2回の培養試験の平均値であり，図中のエラーバーは標準偏差を示す．

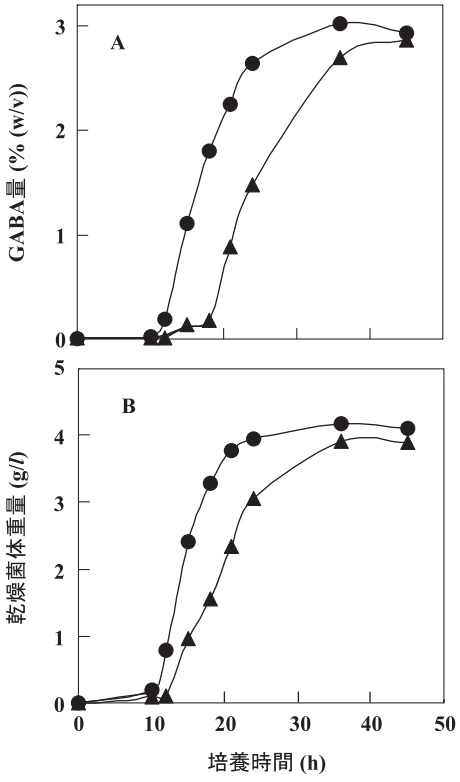

図6. FC 301株と *L. brevis* NBRC 12005株のGABA生産と菌体増殖の比較．A，GABA生産；B，菌体増殖．●，Strain FC 301；▲，*L. brevis* NBRC 12005. 5%（w/v）glucoseと5%（w/v）グルタミン酸ナトリウムを添加したBrix 4.0のFBE培地を使用した．

FBE培地を用いたGABA生産技術の開発

GABAは，非タンパク性アミノ酸で，微生物に広く分布するグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）の作用によりグルタミン酸が脱炭酸されて生成する．GABAは生体内では抑制系の神経伝達物質であり，血圧降下作用や利尿作用，ストレス低減作用，肝機能改善作用，肥満防止作用などを有することが報告されている[22–24]．

本研究では，GABA高生産菌として，当社において市販の乳製品から分離したFC 301株を使用した．このFC 301株については，形態観察結果，酸の生成能，各種の酵素活性ならびに16S rDNAの配列結果から，これまでのところ，*Enterococcus malodoratus* に非常に近縁な菌種であることが分かっている．また，グルタミン酸をGABAへと変換するGADの活性はpHにより大きく変動し[25,26]，培養中のpHを最適に制御することでGABAの生産が向上する[27]ことが先に報告されている．そこで，本FC 301株について，GABA生産に最適なpHを4～7の範囲で調べたところ，pH 5.5においてGABAの生産性が最も高いことが分かった．

次に，FC 301株を用いたFBE培地からのGABA生産を試みたが，FBE中に含まれるGABAの生成基質となるグルタミン酸濃度は非常に低いため（Brix 4.0 FBEではわずかに0.04%（w/v）程度），本研究ではより高濃度のGABAを培地中に蓄積させることを目的として，GABA生産の基質としてグルタミン酸ナトリウムをFBE培地に添加した．図6に，Brix 4.0 FBE培地に5%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムを添加し，pHを5.5に制御しつつ培養を行った際のGABA生産と菌体増殖の経時変化を示した．併せて，FC 301株の比較として，GABA高生産乳酸菌として論文など[26–29]で広く使用されている *Lactobacillus brevis* NBRC 12005株の結果を示した．FC 301株によるGABA生産は培養36時間でほぼ最大に達し，この時点で約3%のGABAが生産され，初発に添加したグルタミン酸のほとんどは培地中から消失していた．また，本培養条件におけるFC 301株の菌体増殖およびGABA生産は共に，*L. brevis* NBRC 12005株より優れていた．

そこで次に，GABAのさらなる高濃度化を目的として，以下のような試みを行った．すなわち，Brix 4.0 FBE培地に初発に5%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムを添加し，その後pHを5.5に制御しつつ，培養2日後，4日後

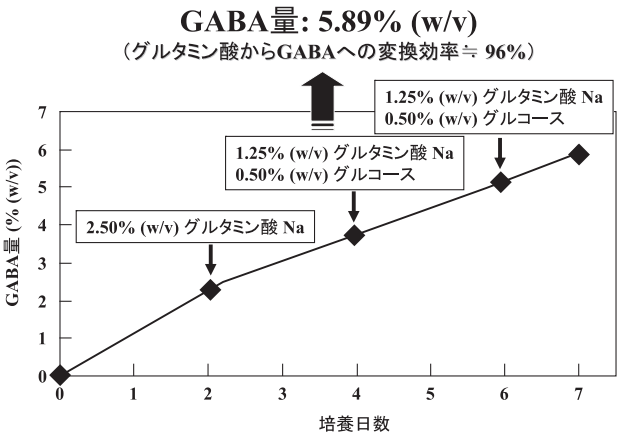

図7. FC 301株を用いたグルタミン酸ナトリウムの追添によるGABAの高濃度化．初発培養条件は図6と同じ．培養2，4，6日後に図中に表記したグルタミン酸ナトリウムなどを添加した．

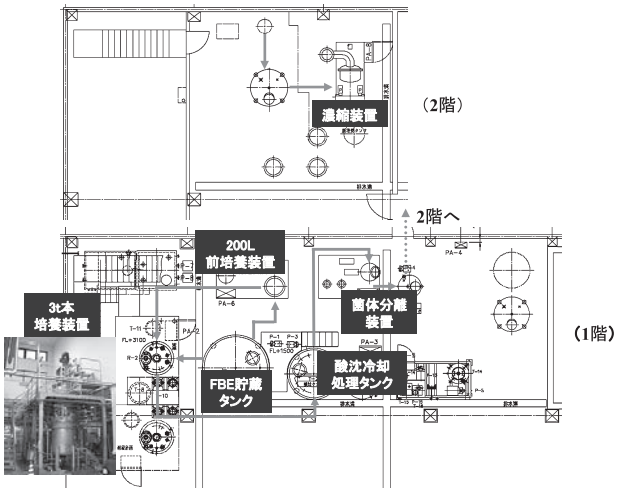

図8. パイロットプラントの平面図．矢印は液の流れる順序を示す．

および6日後に2.5%（w/v），1.25%（w/v）さらに1.25%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムを逐次添加した．その結果，培地中にグルタミン酸がほとんど残存することなく，培養7日間で合計10%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムから5.89%（w/v）という非常に高濃度のGABAを蓄積させることが可能となった（図7）．このときグルタミン酸からGABAへの変換効率は約96%であった．先に京都千枚漬けより分離した*Lactobacillus* sp. L13株を用いて13.5%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムから6.7%（w/v）のGABAが生産されたことが報告されている[27]．この6.7%（w/v）は，恐らくこれまでに報告されているGABAの蓄積濃度としては最も高い値であるが，本研究においてFC 301株を用いて達成された5.89%（w/v）はこれに匹敵するものである．また，グルタミン酸からGABAへの変換率については，*Lactobacillus* sp. L13株が81%であり，FC 301株の方がGABAへの変換効率は高かった．

パイロットプラントでの実証試験と実用化

3トンの本培養装置を軸として，10トンのFBE貯蔵タンク，200 *l*の前培養装置，5トンの酸沈冷却処理タンク，菌体分離装置（セラミックろ過）および濃縮装置（エバポレーター）などにより構成されるパイロットプラントを三和酒類に導入した（図8）．ナイシンAおよびGABA生産のどちらについても，ラボスケールとほぼ同等の発酵生産性が得られ，かつ発酵終了後の回収工程（ダウンストリーム）においても，効率的な生産物（ナイシンA，GABA）の回収が可能であることを確認した．そこで，本研究で得られた成果や構築したプロセスをベースに，FBEを基に作製した高濃度のGABAを含有する食品素材と，高価な試薬培地と比べて遜色のない力価を有する大麦焼酎粕由来の廉価な培地素材を実用化した．

図9. 実用化，販売しているGABA製品

図10. 実用化，販売している培地素材

図9に示すように，GABAについては，“大麦乳酸発酵液ギャバ”という名称で商品化し[30]，GABA濃度20%（w/v）の液状品からGABA濃度90%（w/w）以上の高純度パウダー品まで幅広い濃度のラインナップを取り揃え，現在，各食品会社に素材として販売している．また，培地素材についても，図10に示すように“バーレック

ス”または“バーレックスS”という名称で商品化しており，本稿で報告した乳酸菌やビフィズス菌用の培地素材[31]あるいはナイシン[32]やGABAといった有用物質の生産以外にも，ビタミンKの生産を目的とした*Bacillus subtilis*の培養[33]や微生物がつくる界面活性剤（バイオサーファクタント）の生産[34]にも非常に優れた培地素材であることがこれまでに分かっている．現在，多くのメーカーに培地素材として提供している．

おわりに

以上のように，大麦焼酎粕由来発酵大麦エキスの乳酸菌およびビフィズス菌用の培地素材としての有用性を見いだし，かつFBEを基本成分とした培地から乳酸菌を用いた有用物質（ナイシンAおよびGABA）の生産技術を開発することで，“乳酸菌を利用した焼酎粕の高付加価値素材への転換プロセス”を構築することができた．今後，FBEからの有用物質生産の応用例がさらに広がり，焼酎粕の有効活用ならびに高付加価値化が促進されることを期待している．

また，三和酒類株式会社では，2009年春に一層積極的に焼酎粕の高度利用化に取り組むために，本社工場から少し離れた場所に「グリーンバイオ事業所」を建設した．本事業所内には，焼酎粕の飼料化やメタン発酵設備に加えて，焼酎粕から付加価値の高い食品素材を作り出すための食品加工棟を新たに設立しており，ここを拠点に，高付加価値素材への転換量：2000トン/年，高付加価値素材の売上：2億円/年を当面の目標値として，今後活動を行っていきたいと考えている．

本研究はすべて三和酒類株式会社において実施されたものであり，これまで多大なご支援を頂いた三和酒類株式会社の役員様はじめ従業員の皆様方に深く感謝の意を表します．また，本研究の遂行および成果をまとめるに際して，終始ご指導・ご助言を頂いた九州大学大学院農学研究院の石崎文彬名誉教授，酒井謙二教授，中山二郎准教授，ならびに善藤威史助教に心よりお礼申し上げます．

文　献

1) 下田雅彦，長野壮一，和田久継：醸協，**90**，897–901 (1995).
2) 竹嶋直樹：*Food Style 21*，**2**，53–54 (2005).
3) 古田吉史，丸岡生行，中村彰宏，大森俊郎，園元謙二：生物工学，**87**，16–19 (2009).
4) Furuta, Y., Takashita, H., Omori, T., Sonomoto, K., Shimoda, M. and Wada, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 276–279 (1998).
5) 古田吉史，外薗理佐，高下秀春，大森俊郎，石崎文彬，園元謙二：生物工学，**85**，161–166 (2007).
6) 藤野舜一，丹波博之：ビフィズス1，p. 123–128 (1987).
7) Kanauchi, O., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Araki, Y., Ishii, T., Nakamura, T., Hitomi, Y., Agata, K., Saiki, K., Andoh, A., Toyonaga, A., and Bamba, T.: *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 175–179 (1999).
8) 島村誠一，石橋憲雄，宮川　博，阿部文明，桐原郁子：特願3-197001 (1991).
9) 細山　浩，大沢　学，浜野光年：日食工誌，**38**，940–944 (1991).
10) 善藤威史，中山二郎，園元謙二：バイオサイエンスとインダストリー，**61**，597–602 (2003).
11) Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1616–1619 (2003).
12) Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2232–2235 (2008).
13) Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G. C. Thomas, L. V., and Delves-Broughton, J.: *J. Food Prot.*, **62**, 1004–1010 (1999).
14) Budu-Amoak, E., Harris, J., Ablett, R.F., and Delves-Broughton, J.: *J. Food Prot.*, **62**, 46–50 (1999).
15) Thomas, L. V., Ingram, R. E., Bevis, H. E., Davies, E. A., Milne, C. F., and Delves-Broughton, J.: *J. Food Prot.*, **65**, 1580–1585 (2002).
16) Turtell, A. and Delves-Broughton, J.: *Bull. Int. Dairy Fed.*, **329**, 20–23 (1998).
17) Amiali, M. N., Lacroix, C., and Simard, R. E.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 887–894 (1998).
18) Liu, X., Chung, Y. K., Yang, S. T., and Yousef, A. E.: *Process Biochem.*, **40**, 13–24 (2005).
19) Desjardins, P., Meghrous, J., and Lacroix, C.: *Int. Dairy J.*, **11**, 943–951 (2001).
20) Furuta,Y., Maruoka, N., Nakamura, A., Omori, T., and Sonomoto, K: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 393–397 (2008).
21) 古田吉史，丸岡生行，中村彰宏，大森俊郎，園元謙二：醸協，**104**，579–586 (2009).
22) 茅原　紘，杉浦友美: 食品と開発，**36**，4–6 (2001).
23) Stanton, H. C.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **143**, 195–204 (1963).
24) 山元一弘：食品加工技術，**26**，34–39 (2006).
25) Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki, I.: *J. Dairy Sci.*, **81**, 1846–1891 (1998).
26) Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1168–1171 (1997).
27) 上野義栄，平賀和三，森　義治，小田耕平：生物工学，**85**，109–114 (2007).
28) Yokoyama, S., Hiramatsu, J., and Hayakawa, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 95–97 (2002).
29) 早川　潔，上野義栄，河村眞也，谷口良三，小田耕平：生物工学，**45**，239–244 (1997).
30) 古田吉史，大森俊郎：食品と科学，**48**，77–80 (2006).
31) 大森俊郎，古田吉史，後藤理佐，梅本泰史，下田雅彦：特許3527661 (2004).
32) 大森俊郎，古田吉史，梅本泰史，土橋絵理子，古寺美保子，中村彰宏，石崎文彬：特許3672258 (2005).
33) 林　圭，高下秀春，大森俊郎：特許3431573 (2003).
34) 大森俊郎，丸岡生行，古田吉史，小西正朗，福岡徳馬，森田友岳，井村知弘，北本　大：特願2009-001914 (2009).