

2015年度 生物学技術賞 受賞

生酏乳酸菌のバイオジェニックス効果に着目した 米乳酸発酵飲料の開発

高橋 俊成^{1*}・増田 康之¹・吉田 和利²・水野 雅史³

Development of fermented rice drink using lactic acid bacteria isolated from *kimoto*

Toshinari Takahashi^{1*}, Yasuyuki Masuda¹, Kazutoshi Yoshida², Masashi Mizuno³ (¹General Research Laboratory, Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd., 1-8-6 Uozaki-nishimachi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-0026, ²Hyogo Prefectural Institute of Technology, 3-1-12 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, ³Department of Agrobioscience, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501) *Seibutsu-kogaku* **94**: 63-69, 2016.



はじめに

近年、高齢化社会の進展、生活習慣病の予防や美容に対する意識の高まりを背景に健康食品市場は拡大を続けている。健康食品の素材としてはアミノ酸やコラーゲンなどさまざまな成分が知られているが、最近、乳酸菌の注目度が高く、機能性食品市場で順調な伸びを示している。乳酸菌の機能性といえば、真っ先に思いつくのがヨーグルトに代表されるプロバイオティクス効果である。プロバイオティクスとは、「腸内フローラバランスを改善することにより宿主に有益に働く生菌添加物」と定義されている¹⁾が、最近では生菌という考え方にとらわれない「宿主の健康維持に有益に働く微生物」という広い定義のプロバイオティクスが用いられることも多くなってきた²⁾。他方、光岡知足先生は「直接あるいは腸内フローラを介して、免疫賦活、コレステロール低下作用、血圧降下作用、整腸作用、抗腫瘍効果、抗血栓・造血作用などの生体調節、生体防御、疾病予防・回復、老化制御等に働く食品成分」というバイオジェニックスという考え方を提唱している³⁾。乳酸菌体や乳酸菌生産物質はこのバイオジェニックスの代表格である。この学説がプロバイオティクスと明らかに異なる点は、バイオジェニックスとしての乳酸菌は必ずしも生菌である必要がないとい

う点である。死滅菌体においても生体調節機能があれば、乳酸菌を生きのまま摂取する必要がない、言い換えれば、乳酸菌で発酵させた食品を殺菌しても効果が期待でき、流通面での障壁が低くなることから、乳酸菌を用いた発酵食品の多様化につながると考えられる。

このように乳酸菌を利用した食品が注目を集めているが、昔から日本人と乳酸菌のつながりは深く、日本酒、味噌、醤油、漬物など伝統的な発酵食品の製造において、乳酸菌は重要な役割を果たしてきた。日本酒と乳酸菌のつながりといえば、乳酸菌が生産する乳酸酸性環境下でアルコール発酵を担う酵母を純粋培養する工程「生酏」があげられる。生酏では、蒸米、米麴、水を半切桶に仕込んだ翌日、物量を櫛棒ですり潰す作業（山卸作業）を行う。この工程は生酏独特の工程であり、山廃酏とは、この山卸し作業を廃止した酏のことである。山卸し作業が終了すると、半切桶の物量を一つのタンクに集め、3～4日間、6～7°Cの低温に保つことにより野生酵母などの汚染微生物の活動を抑える。この期間が打瀬である。打瀬期間にはまず硝酸還元菌が生育し、硝酸を還元して亜硝酸を生成する。一方、低温増殖性の乳酸菌も活動を開始する。まず、球菌である *Leuconostoc mesenteroides* が生育を始め、その後、桿菌である *Lactobacillus sakei* が増殖することにより優占菌の遷移が起こることが知ら

*著者紹介 菊正宗酒造(株)総合研究所 E-mail: t-takahasi@kikumasanune.co.jp

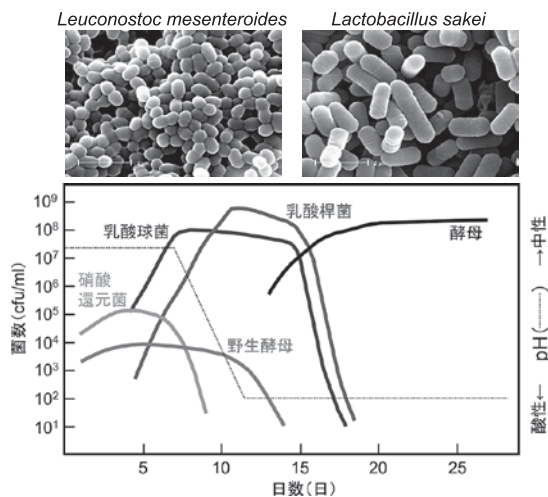


図1. 生酛における微生物の遷移

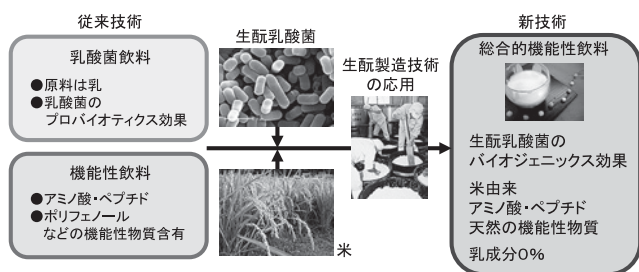


図2. 生酛乳酸菌を利用した米乳酸発酵飲料の開発

れている。そして乳酸菌がつくり出す乳酸と亜硝酸により野生酵母は淘汰される。このような乳酸酸性環境下において、乳酸に強い清酒酵母が増殖するとともにエタノールをつくり出す。生酛で生育する乳酸菌はエタノールに弱いため死滅し、やがて清酒酵母のみが増殖することになる(図1)。このように生酛乳酸菌は酵母を純粋培養するために尽力することが知られているが、これまで清酒醸造以外で利用されることはなかった。

このような背景のもと、生酛より分離した乳酸菌の発酵食品への応用を試みるため、バイオジェニックスという観点から死滅乳酸菌体による免疫調節作用に着目するとともに、機能性成分含量の多い米を原料とし、生酛製造技術を利用した米乳酸発酵飲料を開発することにした(図2)。

生酛乳酸菌とは⁴⁾

生酛乳酸菌とは生酛より分離した乳酸菌の総称であり、そこには *L. sakei* と *L. mesenteroides* が含まれる。菊正宗酒造(株)総合研究所では、1992年から2012年にかけて、清酒製造場である「嘉宝蔵」の生酛より乳酸菌株を分離してきた。これらの乳酸菌は人為的に添加する

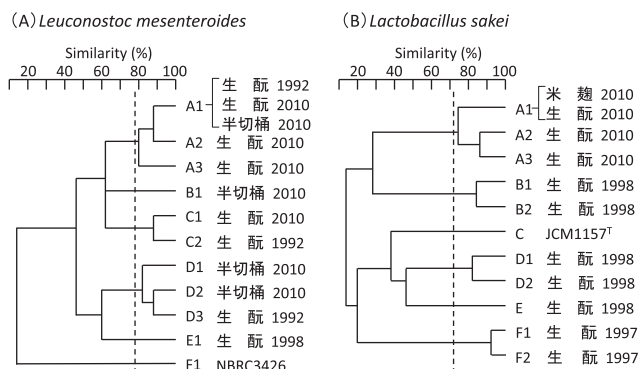


図3. RFLP-PFGE法による生酛乳酸菌のクラスター解析。破線はTenoverらが設定したPFGE解析の疫学基準を示す。

のではなく、酒造用具、原料、環境中から入ってくるものであり、その由来については不明な点が多い。そこで、これらの菌株にDNAレベルでの多様性があるのかを調べるため、院内感染や食中毒の原因特定に広く利用されており、分子疫学の解析において信頼されている restriction fragment length polymorphism (RFLP) と pulse-field gel electrophoresis (PFGE) を用いた RFLP-PFGE 解析を行うことにした。乳酸菌は約200万塩基対の環状ゲノムDNAを持つ。そこで、特定のDNA配列を認識する制限酵素を用いて、保存菌株のゲノムDNAを断片化した後、PFGE解析を行った。得られたバンドパターンの相同性から各菌株間の遺伝学的関連性を調べたところ、*L. mesenteroides* の保存菌株のゲノムDNAを *Sma* Iにより断片化後、PFGE解析結果をもとにクラスター解析を行ったところ、図3Aに示すように6つの系統タイプ(A~F)に分かれ、系統タイプAのなかのサブタイプA1に1992年および2010年に生酛より分離した株および2010年に半切桶より分離した株が含まれていた。また、系統タイプCのなかにも、1992年および2010年に生酛より分離した株が含まれ、さらに系統タイプDに1992年に生酛より分離した株と2010年に半切桶より分離した株が含まれていた。これらの結果から、複数の系統の菌株が酒造蔵内に広くハビタットを持っており、多年にわたり生酛の *L. mesenteroides* の起源になっている可能性が考えられた。

同様に *L. sakei* についてもゲノムDNAを *Not* Iで断片化後、PFGE解析結果をもとにクラスター解析を行ったところ、*L. mesenteroides* とは異なり、1997年に生酛より分離した株は系統タイプFに、1998年に生酛より分離した株は系統タイプB、D、Eに属し、2010年に生酛より分離した株は系統タイプAに属し、異なる年度に分離された株が同一の系統タイプに属することはなかった(図3B)。また、半切桶から *L. sakei* の分離を試みたが、

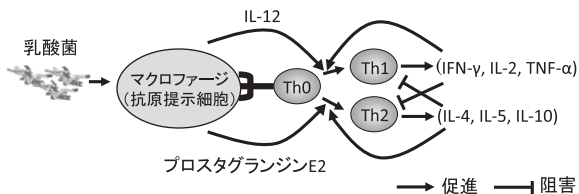


図4. ナイーブT細胞の分化制御メカニズム

分離される株は *L. mesenteroides* であり、*L. sakei* を分離することはできなかった。このことから *L. sakei* が蔵内に生息し、翌年も生配に現れる可能性は低いと考えられる。この結果については環境によって凝集性や耐熱性が増大する *L. mesenteroides*⁵⁾ と比較して *L. sakei* は複雑な栄養要求性⁶⁾ を持つことが関係していると思われる。

以上より、*L. mesenteroides* は、酒造蔵内の木製道具類などにハビタットを持つと推定され、酒造年度をまたいで同じ系統タイプの株が現れる、いわゆる蔵付き乳酸菌のような挙動を示すのに対し、*L. sakei* は酒造蔵内に安定したハビタットを持たず、米麴などの原材料を介して、酒造年度をごとに多様な菌株が生育してくるものと推察された。

IL-12産生促進作用が高い乳酸菌株の選抜⁷⁾

生配乳酸菌のバイオジェニックスとしての評価を行うため、発酵食品由来の乳酸菌で多くの報告^{8,9)}がある免疫調節作用に着目することにした。生体内では、細胞性免疫を活性化するTh1細胞と体液性免疫を活性化するTh2細胞の相互のバランスにより免疫調節機構を維持している。花粉症などのアレルギー疾患を持つ人では、そのバランスがTh2型に偏っていることが知られている。乳酸菌は、マクロファージが産生するサイトカインIL-12の産生量を増加させることにより、Th0細胞（ナイーブT細胞）からTh1細胞への分化を促進する。その結果、Th2細胞に傾いた免疫バランスをTh1細胞とバランスが取れる状態に改善することが知られている¹⁰⁾（図4）。

生配より分離した乳酸菌は種レベルでは、*L. sakei* と *L. mesenteroides* に限定されたが、菌株レベルでいくつかのクラスターに分類されたので、各クラスターから乳酸菌株を数株ずつ選び、その中からバイオジェニックス乳酸菌として、免疫調節作用が高い菌株を選抜することとした。マウス由来マクロファージ様細胞株J774.1の培養液に乳酸菌加熱死滅菌体を添加し、3時間後の培養上清中のIL-12濃度を測定したところ、供した17菌株においてIL-12産生量の増加が認められた。その効果は菌株ごとに差があり、*L. mesenteroides* に比べ、*L. sakei* のほうが高い傾向を示した（図5）。この段階では一次選

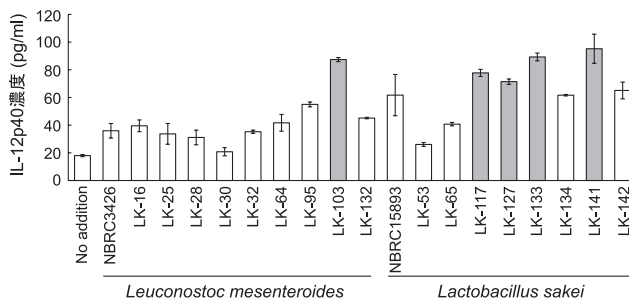


図5. 乳酸菌加熱死滅体がマクロファージ様細胞株J774.1のIL-12産生に及ぼす影響。平均値±標準誤差（ $n=3$ ）

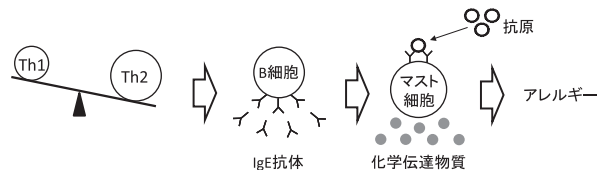


図6. アレルギー発症メカニズム

抜として、効果の高かった菌株の中からLK-103、LK-117、LK-127、LK-133、LK-141の5菌株を選抜した。なお、LK-117株を用いた詳細な解析から、IL-12産生促進作用の一因は、菌体の加熱処理時の細胞膜の崩壊により外部へ漏出し、細胞壁に付着した一本鎖RNAに因ることが明らかとなった⁷⁾。

I型アレルギー抑制効果¹¹⁾

免疫調節機構を司るTh1細胞とTh2細胞のバランスがTh2細胞側に傾くと、Th2細胞はB細胞を活性化してIgE抗体の産生を促進する。IgE抗体は肥満細胞に結合し、抗原が結合すると、肥満細胞からヒスタミンなどの化学伝達物質が放出され、くしゃみ、鼻みず、鼻づまりなどのI型アレルギー症状が誘発される（図6）。そこで、マウスを用いてI型アレルギーモデルである受動性皮膚アナフィラキシー反応に対する抑制効果を調べることとした。5週齢の雌のBALB/cマウスを6群（ $n=5$ ）に分け、加熱処理した乳酸菌乾燥菌体2mgを含むPBSリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁し、1日1回、4日間強制経口投与を行った。なお、PBSのみを同様に投与したものを対照とした。5日目に尾静脈より抗トリニトロフェノール（TNP）IgE抗体を注射し、30分後にマウスの耳厚を測定した後、片耳にピクリルクロライド（PiCl）を塗布し、2時間後の耳厚を測定した。PiCl塗布前後の耳厚差を評価したところ、LK-141株を除いた4株において有意に耳の腫れが抑制され、その効果はLK-117株でもっとも高かった（図7）。

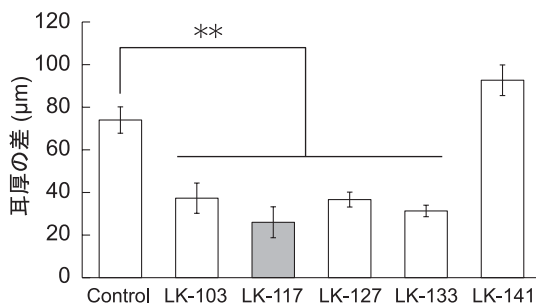


図7. 乳酸菌加熱死滅菌体投与が受動性皮膚アナフィラキシー反応に及ぼす影響. 平均値±標準誤差 (n=5). **: p<0.01

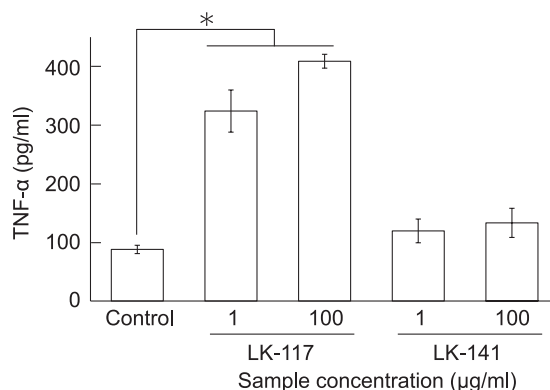


図9. 乳酸菌加熱死滅菌体が腸管免疫応答に及ぼす影響. 平均値±標準誤差 (n=3). *: p<0.05

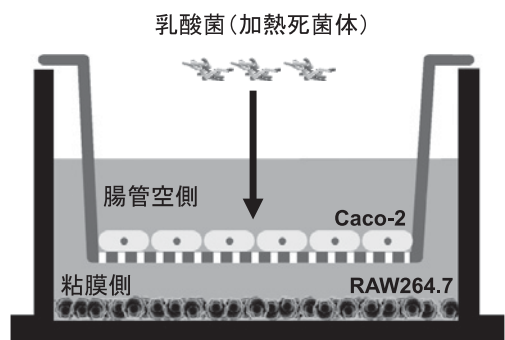


図8. ヒト由来小腸上皮細胞Caco2とマウス由来マクロファージ細胞RAW264.7による腸管モデル

共培養モデルを用いた腸管免疫応答の評価¹¹⁾

乳酸菌加熱死滅菌体がアレルギー抑制作用を示したことから、その作用は腸管での免疫応答に関連していると考え、腸管免疫への影響を調べることにした。

腸管での免疫応答は、小腸粘膜の直下に存在するパイエル板を代表とする腸管免疫が外来異物に対する初期応答には重要であり、そこからの情報伝達によってリンパ球やマクロファージの活性化が起これ、生体防御機構が発動されると考えられている。そこでヒト由来小腸上皮様細胞であるCaco-2とマウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7を共培養し、実際の腸管状態を模した*in vitro*モデルを用いて乳酸菌加熱死滅菌体が腸管免疫に及ぼす影響について評価を行った(図8)。

Caco-2とRAW264.7を半透膜で仕切ったトランズウェルで共培養後、乳酸菌加熱死滅菌体を腸管空側に添加し、3時間後に粘膜側のTNF-α濃度を測定したところ、LK-117株においては、濃度依存的にTNF-αの産生量の増加が認められたが、LK-141株では産生量の増加は認められなかった(図9)。なお、LK-117株を直接マクロファージ様細胞に接触させてもTNF-αの産生量の増大は認められなかった。以上の結果より、LK-117株の加熱死滅菌体は小腸上皮細胞を刺激し、腸管免疫を活性化

するが、LK-141株の接触による刺激は小腸上皮細胞を介した腸管免疫系を活性化しないと推察される。乳酸菌と腸管免疫の関係性を知る上で、両菌株の挙動の違いは大変興味を持たれるところである。

アトピー性皮膚炎発症抑制効果¹¹⁾

L. sakei LK-117株の加熱死滅菌体がI型アレルギー抑制効果を示す結果が得られたことから、I型とIV型のアレルギーが関与するアトピー性皮膚炎に対する効果を調べることにした。自然発症皮膚炎モデルNC/Ngaマウス(雄、8週齢)を2群(n=10)に分け、標準飼料またはLK-117加熱処理乾燥菌体を1%含む標準飼料を自由摂取させた。4日目よりマウス背部にピクリルクロライドの塗布を開始し、5つの評価項目(①掻痒症、②発赤・出血、③浮腫、④擦傷・組織欠損、⑤痂皮形成・乾燥)について、皮膚炎スコアを4段階(0-3点)で評価した。

5つの皮膚炎症状スコアのなかでもっとも顕著な差が認められたのが、痂皮形成・乾燥であり、試験開始後40日以降で標準飼料投与群に比べ、LK-117菌体含有飼料投与群では皮膚炎スコアが有意に低い値を示し(図10)、LK-117加熱死滅菌体投与がNC/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎の発症を抑制することが明らかとなった。LK-117加熱死滅菌体投与がI型アレルギーモデルである受動皮膚アナフィラキシー反応を抑制したことから、血中のIgE濃度の低下が認められると考え、試験開始後47日目のNC/Ngaマウスの血中IgE濃度を測定したところ、LK-117菌体含有飼料投与群と標準飼料投与群に有意な差は見られなかった。アトピー性皮膚炎の発症のメカニズムは、遺伝的または何らかの原因でIgE抗体をつくりやすいアレルギー体質になることによって発症すると考えられているが、新生児への乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus* GG株の投与によって、IgEレベルに変化が

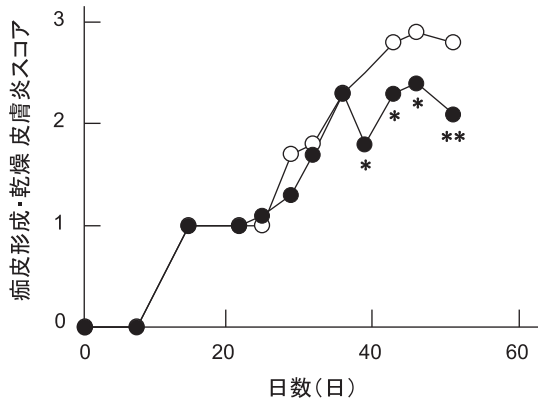


図10. 乳酸菌加熱死滅体投与がアトピー性皮膚炎発症抑制に及ぼす影響. 平均値±標準誤差(n=10). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

ないにも関わらず、2歳までにアトピー性皮膚炎を発症する頻度が半減するという報告¹²⁾もあり、いまだに原因が特定できないのが現状である。今回のIgEレベルに依存せずにアトピー性皮膚炎の発症を抑制したという結果については今後さらなる検討の余地がある。

機能性成分含量を多く含む米品種の選抜¹³⁾

バイオジェニックス乳酸菌の選抜が完了したので、次に発酵基質となる米品種の選抜を行うことにした。米には多種多様な品種があり、アミロース含量が高い高アミロース米にはプレバイオティクス効果が期待される難消

化性デンプンが多く含まれていること¹⁴⁾や、タンニン系赤色素を有する赤米やアントシアニン系色素を有する紫黒米には疾患予防や老化抑制効果が期待される抗酸化作用の強いポリフェノールが多く含まれていること¹⁵⁾が知られている。このような機能性成分の多い米を原料とすることにより、乳酸菌によるバイオジェニックス効果だけでなく、原料に由来する機能性も引き出せるため、これまで以上に機能性の高い商品の開発が可能となる。

一般米や酒造好適米など特徴のある品種について精米歩合が約85%となるように精米を行い、抗酸化作用の指標として、総ポリフェノール量、DPPHラジカル消去能および整腸作用が期待される難消化性デンプン量を測定したところ、表1に示すようにいずれの測定項目においても高アミロース米である夢十色やホシニシキが高い値を示し、今回の米乳酸発酵飲料の原料米として、ホシニシキを選抜することにした。ホシニシキは、農研機構作物研究所でホシユタカと黄金晴の交配で育成された耐倒伏性が強い高アミロース米。一般米のアミロース含量17~20%に対し、アミロース含量は約25%。冷えると硬くなるため一般の飯米には適さないが、さらっとした食感からピラフ、リゾットなどに利用されている。

米乳酸発酵飲料の開発

以上の乳酸菌および米の選抜結果をもとに*L. sakei* LK-117株と高アミロース米ホシニシキを用い、生醗製

表1. 各米品種の機能性成分含量の比較

品種名	特徴	総ポリフェノール量 (mg/g)	DPPHラジカル消去能 (%)	難消化性デンプン含量 (%)
プリンセスサリー	香り米 (うるち)	1.54	14.8	0.04
兵庫牛若丸	高アミロース米	1.16	9.0	0.51
北陸207号	高アミロース米	2.45	18.1	0.55
ホシユタカ	高アミロース米	1.27	9.0	0.60
夢十色	高アミロース米	5.22	41.2	0.92
ホシニシキ	高アミロース米	5.69	51.6	0.67
兵系酒18号	酒造好適米	1.65	17.0	0.16
兵庫北錦	酒造好適米	2.22	19.9	0.10
兵庫夢錦	酒造好適米	3.23	32.3	0.10
山田錦	酒造好適米	1.46	16.1	0.15
五百万石	酒造好適米	2.08	19.7	0.14
日本晴	一般うるち米	3.21	23.0	0.16
きらら397	一般うるち米	1.81	14.4	0.06
コシヒカリ	一般うるち米	1.96	22.3	0.06
ササニシキ	一般うるち米	1.72	14.5	0.09
ヒノヒカリ	一般うるち米	1.58	15.8	0.06
ニシホマレ	一般うるち米	2.25	21.5	0.09
むらさきの舞	一般うるち米	4.26	38.0	0.21



図11. 米乳酸発酵飲料の製造フロー

造技術を応用した米乳酸発酵を行うことにした。90% 精米したホシニシキを食品用酵素剤により液化後、*L. sakei* LK-117株を接種し、プロテアーゼ剤、アミラーゼ剤共存下、25°Cで乳酸発酵を行った(図11)ところ、24時間後には乳酸菌密度が生酏とほぼ同じレベルの約 3.4×10^8 cfu/mlに達した。

乳酸発酵の条件が確立できたことから、最終の製品化を行うことにしたが、ここで大きな問題が発生した。ホシニシキは全国での作付け実績がないため買い付けることができないという状況となった。2008年には兵庫県立農林水産技術総合センターの協力を得て100 m²の試験栽培を行っていただいた。ホシニシキの背丈は一般米に比べ低く、収量は玄米で67 kgと比較的収量が多かった。本格的に事業化するためには栽培面積をさらに増やし、安定的に生産する必要があるため、当社の酒米の契約栽培農家の方に米乳酸発酵飲料のコンセプトを理解して頂き、2009年より兵庫県加東市で本格的なホシニシキの栽培を行うこととなった。

このように原材料を安定的に確保できる体制が整ったことから、米乳酸発酵飲料を2010年1月に「酒蔵の乳酸菌 米のしずく」として商品化することに成功した(<http://komenoshizuku.jp/index.html>)。また、2012年4月からはタブレットタイプとしても商品化し、現在、年間延べ約14,000人の方々に定期購入いただいている。

米乳酸発酵技術の新展開

米をプロテアーゼ存在下で乳酸発酵を行うことにより、発酵液中には米タンパク質に由来する多種多様なペプチドが多量に含まれる。高血圧自然発症ラットを用いて、米乳酸発酵液の単回投与試験、長期投与試験を行ったところ、米乳酸発酵液摂取群では、有意に血圧上昇を抑制する結果が得られた¹⁶⁾ことから、米乳酸発酵液には血圧上昇抑制効果が期待される。

また、近年、医学、薬学分野だけでなく、食品分野においても、呈味性や美容効果などの機能性の面から注目を集めるD-アミノ酸も豊富に含まれることがわかってきた(図12)。D-アミノ酸は乳酸菌の細胞壁の構成成分であり、アミノ酸ラセマーゼ的作用により乳酸菌体内で生合成される成分である。D-アミノ酸の生成能も菌株レベルで多様性があるため、D-アミノ酸を高生産する

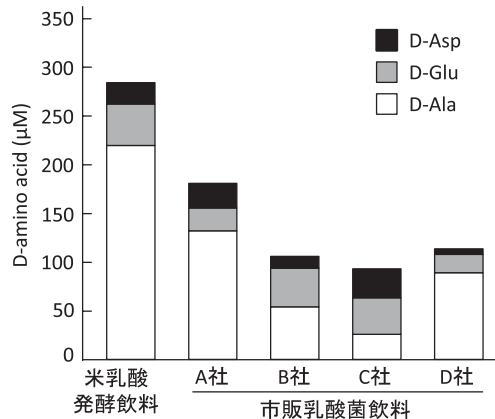


図12. 米乳酸発酵飲料と市販乳酸菌飲料中のD-アミノ酸濃度の比較

菌株を用いて米乳酸発酵を行うことにより美容効果が期待される飲料の開発につながる。

おわりに

微生物の存在を知らない江戸時代に確立された清酒酵母の純粋培養方法としての「生酏」。そこで活躍する乳酸菌については、これまで清酒製造以外に利用されることはほとんどなかった。筆者らは生酏乳酸菌をバイオジェニックスの観点から醸造以外の分野への展開を図るべく、産学官連携のプロジェクトを組み、生酏製造技術を応用することにより米乳酸発酵飲料の開発に成功した。

本技術は、伝統的な発酵技術を応用しつつ、新たな価値を創造するという生物学の原点の発想であり、その応用範囲は食品だけでなく、さらに他の分野にも応用可能である。たとえば、生酏より分離した*L. mesenteroides*を用いた米乳酸発酵液において保湿効果が認められ¹⁶⁾、化粧品素材としての商品化にも成功した。今後も生酏の中に眠る有用微生物を探索し、長年培った発酵技術により、豊かで健やかな暮らしに貢献できる技術開発に励んでいきたいと思う次第である。

謝 辞

本研究開発の遂行にあたり、多くの方々のご助言、ご指導を頂きました。特にPFGE解析に関しては、神戸大学大学院農学研究科の大澤朗教授、ホシニシキの栽培に関しては、兵庫県立農林水産技術総合センターの岩井正志先生、池上勝先生、D-アミノ酸の定量に関しては、関西大学化学生命工学部の老川典夫教授、血圧上昇抑制効果に関しては、沖縄県工業技術センターの丸山進先生、独立行政法人産業技術総合研究所の市村年昭先生に心より感謝申し上げます。また、ご支援を頂きました近畿経済産業局地域資源活用型研究開発事業ならびに全国中小企業団体中央会ものづくり中小企業製品開発等支援補助金事業にも心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fuller, R.: *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365–378 (1989).
- 2) Lee, Y. and Salminen, S.: *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 241–245 (1995).
- 3) 光岡知足：腸内フローラとプロバイオティクス，学会出版センター，1 (1998).
- 4) 増田康之，野口智子，高橋俊成，井口 純，大澤 朗，溝口晴彦：生物工学，**90**，1–7 (2012).
- 5) Bergey, D. H. and Boone, D. R.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Vol. 3, p. 631, Springer (2009).
- 6) 山路悦子，古川恵司，溝口晴彦，原 昌道：醸造協会誌，**100**，281–288 (2005).
- 7) Masuda, Y., Takahashi, T., Yoshida, K., Nishitani, Y., Mizuno, Y., and Mizoguchi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 363–368 (2011).
- 8) Gill, H. S.: *Int. Dairy J.*, **8**, 535–544 (1998).
- 9) Meydani, S. N. and Ha, W. K.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 861–872 (2000).
- 10) Fujiwara, D., Inoue, S., Watanabe, H., and Fujii, T.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **135**, 205–215 (2004).
- 11) Masuda, Y., Takahashi, T., Yoshida, K., Nishitani, Y., Mizuno, Y., and Mizoguchi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 292–296 (2012).
- 12) Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E.: *Lancet*, **357**, 1076–1079 (2001).
- 13) 高橋俊成：醸造協会誌，**109**，705–712 (2014).
- 14) 柳原哲司，中森朋子，加藤 淳：北海道農業研究センター平成14年度研究成果
- 15) 猪谷富雄，建本秀樹，岡本実剛，藤井一範，武藤徳男：日本食品科学工学会誌，**49**，540–543 (2002).
- 16) 近藤紗代，高橋俊成，渡辺敏郎，田辺創一：フレグランスジャーナル，**5**，22–28 (2014).