

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 12 月 9 日(09.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/140348 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/003663
- (22) 国際出願日: 2010 年 6 月 1 日(01.06.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-132263 2009 年 6 月 1 日(01.06.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目 3 番 2 号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 杉山 政則 (SUGIYAMA, Masanori) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 田村 隆由 (TAMURA, Takayoshi) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF γ -AMINOBUTYRIC ACID

(54) 発明の名称: γ -アミノ酪酸の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a process for producing GABA with high efficiency. Specifically disclosed is a process for producing γ -aminobutyric acid, which is characterized by comprising culturing *Enterococcus avium* in a culture medium containing glutamic acid or a salt thereof while passing an inert gas through the culture medium and collecting γ -aminobutyric acid.

(57) 要約: GABA を効率よく製造する方法を提供すること。グルタミン酸又はその塩を含む培地に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて培養し、 γ -アミノ酪酸を回収することを特徴とする γ -アミノ酪酸の製造方法。



WO 2010/140348 A1

明 細 書

発明の名称： γ -アミノ酪酸の製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は、エンテロコッカス アビウムを用いて γ -アミノ酪酸（以下、「GABA」ともいう）を製造する方法に関する。

背景技術

- [0002] GABAは、広く自然界に存在するアミノ酸の一種で、発芽玄米、茶、野菜類、穀類に含まれている。人等の哺乳動物においては脳や脊椎に存在する抑制性の神経伝達物質であり、その生理効果については、血圧降下作用、精神安定化作用、抗ストレス作用、アルコール代謝促進作用、脳代謝促進作用、肥満防止作用等が知られている。

従って、高血圧症の改善や精神安定化作用を期待して、GABA含有量を増加させた食品を摂取することが提唱されている。

- [0003] GABA生産能を有する乳酸菌を利用したGABAの製造方法やこれにより得られた高濃度GABA含有食品が知られている。

例えば、ラクトバチルス ブレビスUAS-4又はラクトバチルス ブレビスUSA-6をグルタミン酸又はその塩を含む培地で、空気雰囲気下、緩やかに攪拌して若干の好気条件にて培養し、培養液中に蓄積したGABAを回収する、GABAの製造方法が知られている（特許文献1）。

また、植物又はその汁液を、グルタミン酸又はその塩及び酒粕又はその抽出物の存在下、エンテロコッカス アビウムG15株を用いて静置培養条件にて発酵させるGABA含有発酵物の製造方法が知られている（特許文献2）。

また、エンテロコッカス アビウムと蒸し大豆及び1%グルタミン酸ナトリウムを含むMRS培地を混合したものを、密閉タンクに入れた後に、タンク内の空気を吸引除去し、炭酸ガスを充填した後、嫌氣的条件下の静置培養にて発酵されるGABA含有発酵物の製造方法が知られている（特許文献3）。

）。

[0004] GABAは、従来より、一般的には、上記の文献等に記載されているように、グルタミン酸又はその塩を原料として製造されてきた。しかし、その原料であるグルタミン酸は工業的に大量に製造されて安価に入手できるものの、GABAは、前述のように高機能を有する物質であることから、付加価値の高いファインケミカルな物質である。従って、そのような付加価値の高い物質を工業的に大量に製造することが強く望まれていた。

[0005] しかしながら、GABA生産能を有する乳酸菌を用いてGABAを安価に効率よく大量生産する研究は未だ十分とは云えず、そのため、GABAの広範な普及に至っていないのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2007-135416号公報

特許文献2：国際公開第2007-52806号パンフレット

特許文献3：特開2007-187501号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、培養物中により高濃度のGABAを効率よく製造する方法を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0008] 従来、GABA生産能を有する乳酸菌を用いる場合、例えば特許文献1～3の記載のように、無攪拌や無通気で微嫌気状態にしてか、或いは空気雰囲気下で若干攪拌して微好気状態にして培養することによりGABAを高濃度に生産させている。

本発明者は、斯かる事情に鑑み、エンテロコッカス・アビウムを用いて効率よくGABAを製造するための培養条件について種々検討したところ、意外にも、培地に不活性ガスを通気した場合、すなわち培地に不活性ガスを混

入するように嫌気培養した場合、更にトランジションフェース (transition phase) においてグルタミン酸又はその塩を追加添加してグルタミン酸濃度を特定量となるようにした場合に、GABAを高濃度に含有する培養物を得ることができ、GABAを効率よく生産し回収できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下の(1)～(7)に係るものである。

(1) グルタミン酸又はその塩を含む培地に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて培養し、 γ -アミノ酪酸を回収することを特徴とする γ -アミノ酪酸の製造方法。

(2) 培養開始時のグルタミン酸濃度を培地中15質量%未満となるようにグルタミン酸又はその塩を用いる上記(1)の γ -アミノ酪酸の製造方法。

(3) トランジションフェース (transition phase) において、グルタミン酸濃度が培地中0.1～6.5質量%となるようにグルタミン酸又はその塩を追加添加する上記(2)の γ -アミノ酪酸の製造方法。

(4) pH5.0～7.0で培養する上記(1)～(3)の γ -アミノ酪酸の製造方法。

(5) エンテロコッカス アビウムが、エンテロコッカス アビウムG15 (NITE BP-142)である上記(1)～(4)の γ -アミノ酪酸の製造方法。

(6) 乳、果実又は野菜から選ばれる1種以上を主成分とする発酵原料を含む培地に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて発酵させることを特徴とする発酵物の製造方法。

(7) エンテロコッカス アビウムが、エンテロコッカス アビウムG15 (NITE BP-142)である上記(6)の発酵物の製造方法。

(8) 上記(6)又は(7)の発酵物の製造方法により製造された発酵物。

発明の効果

- [0010] 本発明によれば、GABAの生産性が向上し、高濃度のGABA含有発酵物を得ることができ、これから効率よくGABAを回収することができる。得られた発酵物や精製されたGABAを用いることにより、血圧降下作用、精神安定化作用などの機能を有する食品又は飼料を得ることができる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1] グルタミン酸フィードによるGABA生産性を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0012] 本願発明のGABAの製造方法は、グルタミン酸又はその塩を含む培地に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて培養し、GABAを回収するものである。

- [0013] 本発明の製造方法に用いられるエンテロコッカス アビウム (Enterococcus avium) は、通性嫌気性のグラム陽性球菌で、人の腸管、口腔などに存在する常在菌であるが、以下に示すエンテロコッカス アビウム (Enterococcus avium) G15 (以下、「G15株」ともいう) を用いるのが好ましい。

「エンテロコッカス アビウム (Enterococcus avium) G15」は、無農薬栽培を行っている畑で育てたニンジンの葉から本発明者により始めて分離され、2005年9月22日、〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD) にNITE BP-142として寄託した菌株であり、以下の菌学的性質を有する。

1) 連鎖球菌、2) グラム染色は陽性、3) ランスフィールドの群抗原Dを有する、4) カタラーゼ活性は陰性、5) 芽胞形成能は無い、6) 通性嫌気性

- [0014] 本発明の製造方法でGABAの原料として使用されるグルタミン酸 (「Glu」と記すことがある) は、化学的にはアミノ酸の一種であるL-グルタミン酸を指し、その塩としては、ナトリウム塩やカリウム塩等のアルカリ金属塩又はカルシウム塩やマグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げら

れる。斯かるグルタミン酸又はその塩は、由来は特に限定されないが、調味料としての用途を持つ食品添加物であるグルタミン酸、グルタミン酸ナトリウムや、食品蛋白質を酸や酵素で加水分解して得られるグルタミン酸のいずれを用いても構わない。

また、遊離グルタミン酸等を含む調味料、水産加工品、トマト等の食材を、本発明のグルタミン酸又はその塩の供給源として用いることもできる。

[0015] グルタミン酸又はその塩の培地への添加は、培養開始時に一度に添加してもよいが、培養中に追加添加するのが好ましく、培養中に間欠的に又は連続的に追加添加する方法（フェイドバッチ方法）を採用するのがより好ましい。更に好ましくは連続的に追加添加する方法が好ましい。

[0016] 一度に添加する場合の培養開始時のグルタミン酸濃度又は追加添加する場合の培養開始時（初発）のグルタミン酸濃度は、培地中、1.5質量%未満、より好ましくは6質量%未満となるようにグルタミン酸又はその塩を用いるのが好ましい。

[0017] グルタミン酸又はその塩を追加添加する場合には、GABA生産能向上の点から、培養期間中、培地中のグルタミン酸濃度が、当該追加添加直後のグルタミン酸濃度が6.5質量%以下、例えば5質量%以下、1.5質量%以下等が挙げられ、下限は0.1質量%になるように、グルタミン酸又はその塩を培地に追加添加して維持するのが好ましい。

追加添加を開始する時期としては、エンテロコッカス アビウムのトランジションフェース（transition phase）であるのが好ましい。

ここで、「トランジションフェース（transition phase）」とは、生育曲線において細胞数が対数的に増殖する対数増殖期から定常期への移行期をいう。本発明のエンテロコッカス アビウムにおいては、植菌後から18～26時間程度経過した時期である。

上記の追加添加する時間は、特に制限はないが、好ましくは培養時間の終了に合わせるのがよい。

尚、培養時間は、GABAの生産効率の点から、培養開始時から20～1

40時間、より20～120時間、更に20～90時間とするのが好ましい。
。

[0018] より具体的には、例えば、初発のグルタミン酸濃度が4～6質量%である場合には、ほぼ全量のグルタミン酸がGABAに変換される20～30時間で、培養を終了してGABAを回収するか、或いは培地中のグルタミン酸濃度が、0.1～6.5質量%、例えば0.2～5質量%、0.2～1.5質量%になるように培地にグルタミン酸又はその塩を追加添加して培養を継続するのが、生産効率向上の点から好ましい。このときの培養時間は、30～80時間とするのが好ましい。

また、初発のグルタミン酸濃度が8～12質量%である場合には、ほぼ全量のグルタミン酸がGABAに変換される40～60時間で、培養を終了してGABAを回収するか、或いは培地中のグルタミン酸濃度が、0.1～6.5質量%になるように培地にグルタミン酸又はその塩を追加添加して培養を継続するのが、生産効率向上の点から好ましい。このときの培養時間は、40～130時間とするのが好ましい。

[0019] 追加添加として間欠的添加を採用する場合、グルタミン酸又はその塩の1回あたりの添加量は、初発のグルタミン酸濃度が0.1～15質量%の際に、培地1L当たり、0.1～200gとするのが好ましく、より40～70g、更に50～60gが好ましい。その時期は、8～28時間毎とするのが好ましく、このときの添加回数は、1～8回、より1～6回とするのが好ましい。

具体的には、初発のグルタミン酸濃度が4～7質量%の場合には、8～16時間毎が好ましく、このときの添加回数は、1～6回、より2～5回、更に3～4回とするのが好ましい。

また初発のグルタミン酸濃度が8～12質量%の場合には、20～28時間毎、より22～26時間毎が好ましく、このときの回数は、1～4回、より1～3回、更に1～2回とするのが好ましい。

[0020] また、追加添加として連続的添加を採用する場合、初発のグルタミン酸濃

度が0.1～1.5質量%、好ましくは3～10質量%、特に4～6質量%の際に、培地中のグルタミン酸濃度が0.1～6.5質量%、好ましくは0.1～5質量%、より好ましくは0.3～1.5質量%となるようにグルタミン酸又はその塩を追加添加するのがよい。このときの連続的に添加する際のフィード速度は、3.0～8.0 (g/培地1 L/1 h)、特に4～7 (g/培地1 L/1 h) 更に4.5～6.7 (g/培地1 L/1 h) とするのが好ましく、連続的に追加添加する期間は、1～70時間、より好ましくは25～50時間とするのがよい。

尚、連続的に添加する際に、培地中のグルタミン酸濃度を所望の範囲内に調整するために、フィード速度を0 (g/培地1 L/1 h) としてグルタミン酸又はその塩の添加を一時的に中断してもよく、またフィード速度を早くしたり遅くしたりしてもよい。

また、「g/培地1 L/1 h」とは、1時間当たり、培地1 Lに対して添加されるグルタミン酸又はその塩の量 (g) をいう。

[0021] 本発明で使用される培地成分は、上記エンテロコッカス アビウムが培養物中にGABAを生産できるものであればよく、当該培地成分としては、例えば、酵母エキス、畜肉エキス、麦芽エキス、魚肉エキス等の各種エキス；カゼイン分解物、畜肉ペプトン、魚肉ペプトン、大豆分解物、脱脂大豆分解物、ポテト分解物等の動物性及び植物性のペプトン又はポリペプトン；コーンステープリカー等を単独で又は2種以上が挙げられる。このうち、植物性ポリペプトン、酵母エキス、コーンステープリカーを使用することが、GABA生産性向上の点で好ましい。更にこの植物性ポリペプトンのうち、大豆分解物及び脱脂大豆分解物を使用することが好ましい。これらのうち、特に、大豆分解物及び／又は酵母エキスを使用することが好ましい。

このときの植物性ポリペプトンの使用量は、培地中、0.1～10質量%が好ましく、特に0.5～2.5質量%が好ましい。また、当該酵母エキスの使用量は、培地中、0.1～5質量%が好ましく、特に0.5～1.5質量%が好ましい。また、コーンステープリカーの使用量は、培地中、0.

1～15質量%が好ましく、特に3～8質量%が好ましい。

[0022] また、本発明で使用される培地成分として、上記の他、ゼラチン、寒天、糖類、香料、果肉等、通常乳酸菌の培養に使用される培地成分を使用することができる。例えば、蔗糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、還元水飴等の糖アルコール、アスパルテーム、アセスルファムカリウム等の高甘味度甘味料、蔗糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、カラギーナン、キサンタンガム、グァーガム等の増粘剤、クエン酸、乳酸、リンゴ酸等の酸味料、レモン果汁、オレンジ果汁等の果汁類の他、ビタミン類やカルシウム、鉄、マンガン、亜鉛等のミネラル類、更には甘草、桂枝、生姜のような生薬、或いは香草等を添加することが可能である。

[0023] 本発明で使用される培地としては、例えば、乳酸菌の培養に一般的なGY P培地、FYP培地の他、市販のGAM培地（日本製薬社製）、MRS培地（Difco社製）等が挙げられ、これら培地に適宜上記各培地成分を更に配合してもよい。

例えば、大豆加水分解物（例えば、商品名：ポリペプトンN：日本製薬社製）0.5～2質量%、酵母エキス0.5～2質量%、酢酸ナトリウム0～0.2質量%、硫酸マグネシウム0～0.05質量%、硫酸マンガン0～0.005質量%、リン酸2カリウム0～0.2質量%、クエン酸2アンモニウム0～0.2質量%、界面活性剤（例えば、ツイーン（登録商標）80）0～0.05質量%、消泡剤0～0.05質量%、グルコース5～15質量%、グルタミン酸ナトリウム0.1～15質量%（好ましくは、3～13質量%より好ましくは5～10質量%）、ピリドキサルリン酸0～0.01質量%、イオン交換水残量を配合した培地を使用することが、GABA生産性向上の点で好ましい。

[0024] なお、上記培地のpHは、エンテロコッカス アビウムの増殖度を高めるため、5～8、より6～8とするのが好ましい。

上記培地の形態は、液体、半固体、固体の何れの状態でもよいが、大量生

産の点から液体培地が好ましい。

また、適宜、上記培地成分を培養時間中の培地に添加して、各成分の濃度が上述のような濃度となるように添加してもよい。

[0025] 本発明の培養は、上記グルタミン酸又はその塩を含む培地中にエンテロコッカス アビウム菌体を接種し、当該培地（培養物）中に不活性ガスを通気しつつ、攪拌、振とう、静置若しくはこれらの組み合わせ等により作用させるバッチ法、又は固定化処理を行なった当該菌体をカラム等に充填して上記培地中で作用させるカラム連続法により実施することができる。

ここで、「培地中に不活性ガスを通気する」とは、通常用いられている手段である培地中にバブリングする他、不活性ガスの雰囲気下で培養物を攪拌或いは振とうすることや、これらを組み合わせて行なうこと等、不活性ガスを培地（培養物）中に混入させることをいう。このとき、培地中の不活性ガスの溶存濃度が高くなるようにするのが、GABAの生産速度が上昇し、GABA生産効率が向上する点から、好ましい。培地中の不活性ガスの濃度を高くする手段としては、例えば、培地中に不活性ガスをバブリングしながら攪拌すること；培地表面に不活性ガスを通気しながら攪拌すること等が挙げられ、特に、培地中に不活性ガスをバブリングしながら攪拌することが好ましい。

このときの培養液1Lあたりの通気量は、0.1～1000mL/分、より10～500mL/分、更に20～300mL/分であるのが好ましく、特に20～200mL/分であるのが好ましい。また攪拌速度は、毎分30～500回転、より毎分50～400回転であるのが好ましく、特に毎分100～300回転であるのが好ましい。

また、菌体の生育向上の点から、培養開始後24時間以内に不活性ガスを培養物中に混入することが好ましく、特に、GABA生産性向上の点から10時間以内に混入することが好ましい。

[0026] 本発明で用いる不活性ガスとしては、例えば窒素ガス、二酸化炭素ガス、アルゴンガス、ヘリウムガス等が挙げられ、当該ガスを単独で又は2種以上

混合して使用してもよい。このうち、工業的スケールで安定的に大量供給できる点から、窒素ガスが好ましい。

[0027] 本発明の培養中の作用温度は、20～50℃であるのが好ましく、より25～45℃、更に34～40℃であるのが、GABA生産性向上の点から好ましい。

また、培養時間は1時間～10日間の範囲で適宜選択すればよく、より10時間～5日間、更に20～96時間であるのが、GABA生産効率向上の点から好ましい。

また、培養（反応）中は、生じるpHの変化に対し、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等の有機酸、硫酸、酢酸等の無機酸、又はカセイソーダ、炭酸カルシウム等のアルカリで培地のpH調整を行ってもよく、pHの測定及び調整は常法に従って行えばよい。このときの培地のpHは、5.0～7.0であるのが好ましく、GABAの生産性向上の点から4.5～5.5であるのが好ましい。

[0028] なお、発酵に用いるエンテロコッカス アビウム菌数には特に制限はないが、作用させる菌数が少ないと菌の増殖に時間を要するために雑菌汚染が起りやすくなり、菌数が多いと前培養に手間がかかり、要する費用も高くなる。このため、スターターとして前培養したエンテロコッカス アビウム培養液を生産培養培地100容量部に対して0.5～10容量部加えるのが好ましく、1～5容量部加えるのがより好ましく、特に2～3容量部加えるのがより好ましい。また、前培養に用いる培地中、グルタミン酸又はその塩を、1～5質量%含有することが、生産培養におけるGABAの生産能を高める点から望ましい。

[0029] 後記実施例に示すとおり、グルタミン酸又はその塩を含む培地中に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて培養することにより、当該菌株のGABAの生産性が優れて向上し、培養物中のGABAが高濃度となる。更に、培養開始時のグルタミン酸濃度を培地中15質量%未満になるようにグルタミン酸又はその塩を用いることによって、またエンテロコッ

カス アビウムの対数増殖期後期においてグルタミン酸濃度が培地中 0.1 ~ 6 質量%となるようにグルタミン酸又はその塩を培地に追加添加することによって、培養物中の GABA を高濃度とすることができる。

[0030] 培養終了後、GABA を高濃度で含有する培養物から菌体を除去後、これから GABA を分離・精製すれば、効率よく GABA を回収することができる。

前記菌体の除去手段として、遠心分離や濾過等の公知の手段が挙げられる。また、前記分離・精製手段として、晶析、限外濾過、イオン交換、活性炭処理、クロマト分離等の公知の手段が挙げられる。

例えば、得られた培養液より菌体を除去後、更に活性炭を用いて脱色して、脱色液を得る。グルタミン酸及び GABA が含まれる脱色液を、pH 4 ~ 6（好ましくは pH 4 ~ 5.5）にて、陰イオン交換樹脂に通過させて、陰イオン交換樹脂してグルタミン酸を吸着し除去することで、GABA を選択的に分別すること等が挙げられる。

[0031] 得られた GABA は、各種の食品又は飼料に配合することにより、血圧降下作用、精神安定化作用、抗ストレス作用、アルコール代謝促進作用、脳代謝促進作用、肥満防止作用等の機能を有する高濃度 GABA 含有食品又は飼料とすることができる。例えば、当該機能を発揮する旨を表示した機能性飲食品、病者用飲食品、特定保健用食品、栄養補助食品等とすることができる。GABA の 1 日当りの摂取量は、10 ~ 20 mg が目安とされている。

[0032] 前記食品の形態は、特に限定されるものではないが、果汁飲料、炭酸飲料、茶系飲料、乳飲料、アルコール飲料、乳酸発酵飲料や清涼飲料等の飲料、ゼリー状食品、各種スナック類、焼き菓子、ケーキ類、チョコレート、ジャム、パン、ガム、飴、スープ類、ヨーグルトや漬物等の発酵食品、佃煮等、あらゆる食品形態とすることができる。また、飼料としては、例えばペット飼料、家畜飼料、養殖飼料等とすることができる。

[0033] また、本発明の発酵物の製造方法は、乳、果汁又は野菜汁から選ばれる 1 種以上を主成分とする発酵原料に、適宜上述の培地組成成分やグルタミン酸

又はその塩を添加し、これを前記GABAの製造方法にて、具体的にはこれに不活性ガスを通気しエンテロコッカス アビウムを用いて発酵させる。これによって、高濃度GABA含有の発酵物を得るものである。

[0034] 主原料として使用する乳は、動物乳、例えば牛乳、ヤギ乳、メシ羊乳等が挙げられ、特に牛乳が好ましい。斯かる乳は、未殺菌乳又は殺菌乳の何れであつてもよく、また、これらの乳から調製した濃縮乳若しくは練乳、またこれらの脱脂乳、部分脱脂乳又はこれらを乾燥した粉乳等であつてもよい。

[0035] また、主原料として使用する果汁及び野菜汁としては、ミカン、モモ、ブドウ、イチゴ、ナシ等の果汁；ニンジン（セリ科）、トマト等の野菜汁等が挙げられる。斯かる果汁又は野汁は、果物又は野菜をミキサー等により粉碎する、また適宜粉碎後水を配合したり、粉碎後更に搾汁することにより得ることができる。斯かる果汁又は野菜汁は、適宜濃縮してもよく、この濃縮液をそのまま、或いは濃縮液を蒸留水等適当な濃度に希釈して使用してもよい。

[0036] 上記の乳、果汁及び野菜汁は、それぞれを単独で又はこれを組み合わせて主原料として使用することができる。

[0037] 斯くして前記GABAの製造方法を用いて得られた発酵物は、GABAが前記発酵物中に高濃度に含まれているので、そのまま前記食品又は飼料として使用することができる。

また、当該発酵物は、前記食品又は飼料に配合して使用することができるが、カラム分離、濾過、濃縮、乾燥等の通常の処理工程によってGABAの含有量をさらに高めてからこれらに使用してもよい。また、前記発酵物を前記食品又は飼料に配合後、適宜他の乳酸菌を添加し、更に発酵させて、例えばヨーグルト、漬物等の発酵食品又は飼料としてもよい。

実施例

[0038] 以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

[0039] 実施例 1

本培養に用いたエンテロコッカス アビウム (*Enterococcus avium*) G 15 菌株 (N I T E B P - 1 4 2) は、2005年9月22日、〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD) に寄託されたものである。

[0040] 本培養に用いた培養液は、下記に示す培地組成になるようにイオン交換水に添加し、オートクレーブしたものである。

[0041] 生産培地組成：

ポリペプトンN (日本製薬製)	2 質量%
酵母エキス	1 質量%
酢酸ナトリウム	0. 2 質量%
硫酸マグネシウム	0. 0 2 質量%
硫酸マンガン	0. 0 0 1 質量%
リン酸2カリウム	0. 2 質量%
消泡剤 (旭電化社製、商品名アデカノールLG-109)	0. 0 5 質量%
グルコース	6 質量%
L-グルタミン酸ナトリウム	5 質量%
水	残量 (pH 6. 8)

[0042] G A B A およびグルタミン酸は、o-フタルアルデヒドを発色剤としたHPLC法にて定量した。

使用カラム; CAPCELL PAK 4.6×250 ACR, 移動相; 100mM sodium acetate buffer-5mM 1-octane sulfonate sodium salt (pH 4.7), flow rate; 1.0mL/min. カラム温度; 40℃の条件にて340nmの吸光を検出し定量した。

乳酸は、HPLC法にて定量した。使用カラム; Shodex Rspak KC-811 8.0×300mm, 移動相; 3mM過塩素酸水溶液, flow rate; 0.8mL/min., カラム温度; 60℃の条件にて220nmの吸光を検出し定量した。

[0043] 上記エンテロコッカス アビウム G 15 菌株を培養液に接種後、前培養を

行い、スターターを得た。このときの前培養は、空気雰囲気下、37℃にて、静置培養で行った。

得られたスターター（50 mL）を本培養液（2000 mL）に添加し、ジャーファーマンター装置を用いて、37℃にて、窒素ガスを培地に通気（バブリング）しながら攪拌培養（pH 5）を行った。このときの通気量は、200 mL／分であり、攪拌速度は、毎分200回転であった。この結果を表1に示した。

[0044] 実施例 2

また、「スターターを添加後一定期間（10時間）、培地に「空気」を通気（バブリング）しながら攪拌培養し、その後「空気」を「窒素ガス」に切り替えて、培地に「窒素ガス」を通気（バブリング）しながら攪拌培養した」以外は、上記実施例1と同様にして培養を行った。この結果を表1に示した。

[0045] 比較例 1

また、「窒素ガス」に代えて「空気」を用いた以外は上記実施例1と同様にして培養を行った。この結果を表1に示した。

[0046] 実施例 3～6

上記実施例1と同様にして培養を行ない、これを実施例3とした。

「窒素ガスを培地に通気（バブリング）しながら攪拌培養」に代えて「窒素ガス雰囲気下、無通気状態で（バブリングせずに）攪拌培養」を行なった以外は上記実施例3と同様にして培養を行い、これを実施例4とした。

また、「窒素ガス雰囲気下、無通気状態で（バブリングせずに）攪拌培養」に代えて「窒素ガスをバブリングせずに通気量200 mL／分にて培地上面に通気しながら、窒素ガス雰囲気下にて、攪拌培養」を行なった以外は上記実施例4と同様にして培養を行い、これを実施例5とした。

また、「攪拌速度毎分200回転」に代えて「攪拌速度毎分50回転」で行なった以外は実施例4と同様にして培養を行い、これを実施例6とした。

これらの結果を表2に示した。

[0047] 表 1 の記載から明らかなように、実施例 1 において窒素をバブリングし攪拌した場合には 30 時間目で 180 mmol/L (18.6 g/L) 以上となり、ほぼ全量のグルタミン酸が GABA に変換されたのに対し、比較例 1 において空気を通気し、攪拌した場合には培養 48 時間目で最高でも GABA 39.0 mmol/L (4.0 g/L) であり、15% 程度のグルタミン酸しか GABA に変換されていなかった。

更に、表 2 の記載から明らかなように、実施例 3～6 の何れでも培養時間 50 時間経過後には、ほぼ全量のグルタミン酸が GABA に変換されていたことから、培地中に窒素ガスを混入させることによって、良好に GABA 生産性が向上することが確認された。

よって、エンテロコッカス アビウムを用いて GABA を効率よく製造する際には、培地中に不活性ガスを通気した方がよいと考えた。

そして、表 2 に示すように、培地中の窒素ガスの濃度が高まるように窒素ガスを培地中に積極的に混入させた場合に、GABA 生産速度が上昇し、GABA の工業的な生産性も向上することが確認された。

よって、エンテロコッカス アビウムを用いて GABA を効率よく製造する際には、培地中の不活性ガスの溶存濃度が高くなるように不活性ガスを培地中に混入させた方がよいと云える。

また、表 1 の記載から明らかなように、培養初期には空気を通気し、一定のフェーズで窒素通気に変更したところ、実施例 2 において培養 10 時間目に変更した場合には、若干生成が遅れるものの 48 時間目にはほぼ完全に変換が終了したことから、好氣的条件下にて生育がある程度進んでも GABA 変換能が回復することが明らかにすることができた。

[0048]

[表1]

	通気 ^{*1}	GABA (mmol/L)				Glutamate (mmol/L)				Lactate (mmol/L)	
		10hr	24hr	30hr	48hr	10hr	24hr	30hr	48hr	24hr	48hr
比較例 1	Air	5.7	20.7	26.4	39.0	187.9	178.1	167.0	150.9	4	185
実施例 1	N ₂	7.6	159.2	181.9	181.0	181.5	33.0	6.7	7.3	4	428
実施例 2	Air (10hr) → N ₂ ^{*2}	6.5	77.2	147.3	185.4	191.1	115.3	40.7	4.4	4	399
培養温度37℃ 通気 ^{*1} ：培地中に気体を200mL/分バブリング。 Air (10hr) → N ₂ ^{*2} ：培地に空気を10時間200mL/分バブリング後、窒素ガスを200mL/分バブリング。											

[0049] [表2]

		GABA生産量 (mmol/L)				GABA生産速度	
		培養期間				10-24hr (mmol/L/hr)	速度比
		10hr	24hr	30hr	48hr		
実施例 3	通気 ^{*1} 攪拌 200rpm	15.3	192.2	223.4	224.7	12.64	2.2
実施例 4	無通気 ^{*2} , 攪拌 200rpm	13.0	131.3	227.7	222.7	8.45	1.4
実施例 5	N ₂ パーシ ^{*3} , 攪拌 200rpm	15.4	169.8	242.2	228.7	11.03	1.8
実施例 6	無通気 ^{*2} , 攪拌 50rpm	17.7	100.9	199.8	218.1	5.94	1
培養温度37℃ 通気 ^{*1} ：培地中に窒素ガスを200mL/分バブリング。 無通気 ^{*2} ：窒素ガス雰囲気下、培地中への通気なし。 N ₂ パーシ ^{*3} ：培地中に窒素ガスをバブリングせず、培地表面（上面）に200mL/分の窒素ガスを通気。							

[0050] 実施例 7 ～ 8

実施例 1 の生産培地を用い、「培地中のグルタミン酸ナトリウムを初発 5 質量% (267 mmol/L) と調整し、培養時間中に、グルタミン酸ナトリウム 50 質量% 溶液 (2670 mmol/L) 800 mL を連続的に添加しつつ、培養液を pH 5.5 に調整して」培養した以外は、上記実施例 1 と同様にして培養を行い、これを実施例 7 とした。

実施例 1 の「生産培地中の有機窒素源（ポリペプトン、イーストエキス）」に代えて「含有窒素量換算で同等となるようにコーンスティプリカー（C

S L) (培地中、5 質量%)」を配合した培地を用いた」以外は、上記実施例 7 と同様にして培養を行い、これを実施例 8 とした。

その結果、G A B A の最高生産量は、実施例 7 及び 8 のそれぞれの培地で 1 0 5 0 m m o l / L (1 0 8 g / L) 及び 1 0 2 0 m m o l / L (1 0 5 g / L) とほぼ同等の G A B A の生産性が認められた。

[0051] 参考例 1

培養終了時、G A B A 4 3 . 4 g / L の培養液 (1 0 0 0 m L) から菌体を濾過し、除菌した濾液に液量あたり 5 % の活性炭を添加し脱色を行った。当該脱色液 (p H 5 . 5) を、陰イオン交換樹脂 (ローム・アンド・ハース社製、商品名アンバーライト、IR-50 型) を通過させて、通過液を得、更にスプレー乾燥して、G A B A 2 7 . 3 質量% 含有粉末 (4 9 . 3 g) を回収した。

[0052] 実施例 9 及び 1 0

実施例 1 で使用した培地に代えて下記の G Y P 培地及び G Y P 2 培地を用いた以外は、実施例 1 と同様にして、不活性ガスを通気 (バブリング) しな
がら、培地中の G A B A 量を測定した (それぞれ、実施例 9 及び 1 0 とする) 。また、エンテロコッカス アビウム G 1 5 菌株の細胞増殖度については、O D 6 1 0 にて、吸光度を分光光度計により測定した。この結果を表 3 に示した。

[0053] G Y P 培地組成 :

トリプトン (D I f c o 製)	0 . 5 質量%
酵母エキス	1 質量%
酢酸ナトリウム	0 . 2 質量%
硫酸マグネシウム	0 . 0 2 質量%
硫酸マンガン	0 . 0 0 1 質量%
リン酸 2 カリウム	0 . 2 質量%
塩化ナトリウム	0 . 0 0 1 質量%
硫酸鉄	0 . 0 0 1 質量%

Tween (登録商標) 80 0.05質量%
 消泡剤 (旭電化社製、商品名アデカノールLG-109)
 0.05質量%
 グルコース 6質量%
 L-グルタミン酸ナトリウム 5質量%
 ピリドキサルリン酸 0.01質量%
 水 残量 (pH 6.8)

[0054] GYP2培地組成:

ポリペプトンN (日本製薬製) 2質量%
 酵母エキス 1.2質量%
 酢酸ナトリウム 0.2質量%
 硫酸マグネシウム 0.02質量%
 硫酸マンガン 0.0005質量%
 リン酸2カリウム 0.2質量%
 Tween (登録商標) 80 0.1質量%
 消泡剤 (旭電化社製、商品名アデカノールLG-109)
 0.05質量%
 グルコース 6質量%
 L-グルタミン酸ナトリウム 5質量%
 ピリドキサルリン酸 0.01質量%
 水 残量 (pH 6.8)

[0055] [表3]

	培地組成	細胞増殖度 (OD610の吸光度)		GABA (mmol/L)	
		24 h	48 h	24 h	48 h
実施例9	GYP	8	9	26.2	61.1
実施例10	GYP2	15	14	28.9	288.0

[0056] 表3の記載から明らかなように、培養時間48時間目で、GYP培地を用いた場合には、GABAが61.1mmol/L (6.3g/L)となったの

に対し、GYP2培地を用いた場合にはGABAが288.0mmol/L(29.7g/L)となった。

以上の結果から、GYP2培地を用いた場合と比較し、窒素源を増量したGYP2培地を用いた場合には、エンテロコッカス アビウムの増殖度が向上すると共にGABAの生産量も増大すると云える。

[0057] 実施例11及び12

培養中のpHを5.0及び6.5とした以外は、上記実施例10(GYP2培地)と同様にして、不活性ガスを通気(バブリング)しながら、水酸化ナトリウム水溶液及び硫酸水溶液を用いて培養中のpHを調整し、培養を行い、培地中のGABA量、乳酸量及び細胞増殖度を測定した(それぞれ、実施例11及び12とする)。この結果を表4に示した。

[0058] [表4]

	pH	細胞増殖度 (OD610)			GABA (mmol/L)		Lactate (mmol/L)	
		10hr	24hr	48hr	24hr	48hr	24hr	48hr
実施例11	5.0	5.5	14	15	208.5	249.2	259	338
実施例12	6.5	6.5	18	26	113.5	116.4	277	773

[0059] 表4の記載から明らかなように、培養時間48時間目で、pH5.0とした場合には、GABAが249.2mmol/L(25.7g/L)となったのに対し、pH6.5とした場合にはGABAが116.4mmol/L(12.0g/L)となった。

以上の結果から、pHを5.0にした場合には、pHを6.5にした場合と比較し、エンテロコッカス アビウムのGABAの生産量が増大した。尚、一方、エンテロコッカス アビウムの増殖度は、pH6.5の方が向上していた。

[0060] 実施例13～15

上記GYP2培地のグルタミン酸ナトリウムの濃度を、5質量%、10質量%及び15質量%に調整した(pH6.8)以外は、上記実施例1と同様にして、培養を行った。この結果を表5に示した。

[0061] [表5]

	Glutamate (質量%)				GABA (mmol/L)		
	0 h	24 h	48 h	120 h	24 h	48 h	120 h
実施例 1 3	5.0%	0.2%	0.3%	—	255.0	261.8	—
実施例 1 4	10.0%	4.5%	0.4%	0.2%	197.8	482.9	534.3
実施例 1 5	15.0%	10.0%	8.9%	8.0%	33.0	103.8	252.1

[0062] 表5の記載から明らかなように、培養開始時（0 h、初発）のグルタミン酸ナトリウム濃度が5質量%、10質量%及び15質量%の場合には、それぞれGABAが、培養時間48時間目で、261.8 mmol/L（27.0 g/L）、482.9 mmol/L（49.8 g/L）及び103.8 mmol/L（10.7 g/L）となった。

また、エンテロコッカス アビウムは、培地中のグルタミン酸ナトリウム濃度が5.0質量%であれば培養時間24時間で、及びグルタミン酸ナトリウムが10.0質量%であれば培養時間48時間で、その殆どがGABAに変換された。

一方、グルタミン酸ナトリウム15.0質量%の場合には、培養時間24時間以降のGABAの生産速度の低下が認められた。

以上の結果から、培養開始時のグルタミン酸濃度を15質量%未満とすることにより、GABAをより大量にかつ効率良く生産できることが認められた。

[0063] 実施例 1 6 及び 1 7

上記GYP2培地のグルタミン酸ナトリウムの濃度を10質量%に調整し（pH 6.8）、培養液中の初発のグルタミン酸濃度を10質量%とした。

培養時間24時間後に、培地1 L当たりグルタミン酸ナトリウム60 gを添加し、このときの培地中のグルタミン酸濃度は11質量%であった（実施例 1 6）。

また、培養時間24時間後及び48時間後に、それぞれ培地1 L当たりグルタミン酸ナトリウム60 gを添加し、このときの培地中のグルタミン酸濃

度はそれぞれ 11 質量%及び 12 質量%であった（実施例 17）。これ以外は、上記実施例 14 と同様にして、培養を行った。この結果を表 6 に示した。

[0064] [表6]

	Glutamate (質量%)				GABA (mmol/L)
	初発	24 h	48 h	120 h	120 h
実施例 16	10.0%	11% (60g/L) *	— (無添加) *	0.2%	822.3
実施例 17	10.0%	11% (60g/L) *	12% (60g/L) *	1.8%	986.2
実施例 15	15.0%	10.7% (無添加) *	8.9% (無添加) *	8.0%	252.1

*培地 1L 当たりの添加量

[0065] 表 6 の記載から明らかなように、初発のグルタミン酸ナトリウム濃度が 10 質量%の際に、培養開始から 24 時間目にグルタミン酸ナトリウムを培地 1 L 当たり 60 g 添加した場合（1 回添加）、並びに培養開始から 24 時間目及び 48 時間目にそれぞれグルタミン酸ナトリウムを培地 1 L 当たり 60 g 添加した場合（2 回添加）には、培養時間 120 時間経過後に、GABA が 822.3 mmol/L (84.8 g/L)、986.2 mmol/L (101.7 g/L) となった。これに対し、実施例 15 とほぼ同じグルタミン酸ナトリウムの使用量である実施例 16 の場合では GABA が 822.3 mmol/L と、GABA の生産量が高まった。また、実施例 17 の場合では、グルタミン酸ナトリウムの総使用量は実施例 15 の場合よりも多いにも拘わらず、グルタミン酸ナトリウムの残量は少なかった。

よって、培養中に使用するグルタミン酸又はその塩の量は、複数回に分けて添加するのが GABA を効率良く大量に生産する上でよいと云える。

[0066] 実施例 18

本培養液として上記 GYP 培地 2 L を使用し、初発グルタミン酸ナトリウム濃度を 5 質量%とした。エンテロコッカス アビウム G15 菌株の本培養

液への植菌方法は、上記実施例 1 と同様にして行った。

本培養は、ジャーファーマンター装置を用いて、37℃にて、窒素ガスを培地中に通気（バブリング）しながら攪拌を行った。このときの通気量は160 mL／分であり、攪拌速度は毎分200回転であった。

ここで、ショット添加法を用いてフェッドバッチ培養を行った。ショット添加法として、トランジションフェースに相当する培養時間22時間目から、培地1 L当たり50 gのグルタミン酸ナトリウムを、8－16時間毎に4回添加した（表7参照）。

尚、トランジションフェース以降に添加したグルタミン酸ナトリウムの総使用量は400 gであり、すなわちグルタミン酸ナトリウムの使用量は培地1 L当たり200 gであった。

この結果を表7及び図1に示した。

[0067] 実施例 19

また、「ショット添加法」から「連続添加法」に代えた以外は、上記実施例 18 と同様にして、培養を行った。

ここで、連続添加法として、トランジションフェースに相当する培養時間22時間目から52時間目まで（30時間かけて）、培地1 L当たり200 gのグルタミン酸ナトリウムを連続的に添加した。このときのグルタミン酸ナトリウムのフィード速度は、培地1 L当たりグルタミン酸ナトリウム4.5～6.7（g／培地1 L／1 hr）であった。引き続き、70時間まで、同様のフィード速度でグルタミン酸ナトリウムを添加した（表7参照）。また、追加添加したグルタミン酸ナトリウムの使用量は、培地1 L当たり、200 gであった。

この結果を表7及び図1に示した。

[0068]

[表7]

培養時間		11 h	22 h	30 h	46 h	58 h	70 h
実施例 18 (ショット添加)	添加直前の Glu 質量%	3.97	0.21	1.12	0.87	1.32	1.77
	添加直後の Glu 質量%	—	5.21	6.12	5.87	6.32	—
	添加 Glu 質量%	—	5	5	5	5	—
	GABA%	0.39	2.72	4.15	5.78	6.415	7.05
	GABA mmol/L	37.8	263.8	402.4	560.5	622.1	683.7
実施例 19 (連続添加)	Glu 質量%	3.4	0.31	1.14	1.47	1.18	0.89
	GABA 質量%	0.62	2.78	4.35	5.93	7.42	8.91
	GABA mmol/L	60.1	269.6	421.8	575.1	719.6	864.0

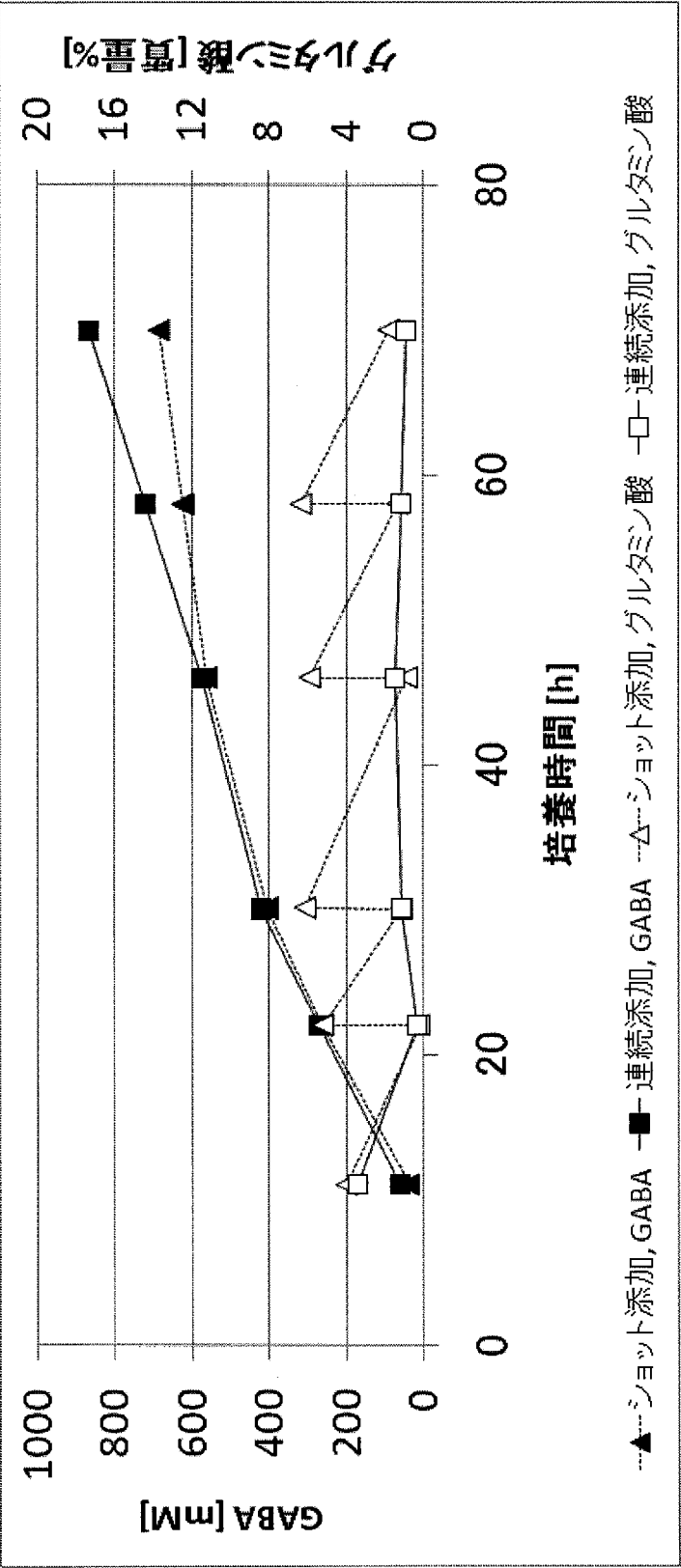
[0069] 実施例 18 のショット添加法の場合、培養時間 70 時間目の GABA の生産量は、 683.7 mmol/L (70.5 g/L) であった。トランジションフェース以降にグルタミン酸ナトリウムを添加することによって、効率良く連続的に大量の GABA を生産できたので、産業上の利用性が非常に高いといえる。

また、実施例 19 の連続的添加法の場合、培養時間 70 時間目の GABA の生産量は、 864.0 mmol/L (89.1 g/L) であり、グルタミン酸ナトリウムの総使用量が同じ実施例 18 のショット添加法の場合よりも、効率良く GABA の生産量を高めることができた。これは、エンテロコッカス アビウムの場合、培地中のグルタミン酸濃度の変動幅を小さくするのがよいと云える。

請求の範囲

- [請求項1] グルタミン酸又はその塩を含む培地に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて培養し、 γ -アミノ酪酸を回収することを特徴とする γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項2] 培養開始時のグルタミン酸濃度を培地中1.5質量%未満となるようにグルタミン酸又はその塩を用いる請求項1記載の γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項3] トランジションフェーズ（transition phase）において、グルタミン酸濃度を培地中0.1～6.5質量%となるようにグルタミン酸又はその塩を追加添加する請求項2記載の γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項4] pH5.0～7.0で培養する請求項1～3の何れか1項記載の γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項5] エンテロコッカス アビウムが、エンテロコッカス アビウムG15（NITE BP-142）である請求項1～4の何れか1項記載の γ -アミノ酪酸の製造方法。
- [請求項6] 乳、果汁又は野菜汁から選ばれる1種以上を主成分とする発酵原料に不活性ガスを通気し、エンテロコッカス アビウムを用いて発酵させることを特徴とする発酵物の製造方法。
- [請求項7] エンテロコッカス アビウムが、エンテロコッカス アビウムG15（NITE BP-142）である請求項6記載の発酵物の製造方法。
- [請求項8] 請求項6又は7記載の製造方法により製造された発酵物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/003663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P13/00 (2006.01) i, A23C9/12 (2006.01) i, C12R1/01 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P13/00, A23C9/12, C12R1/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2007/052806 A1 (Hiroshima University), 10 May 2007 (10.05.2007), claims; paragraphs [0003], [0017]; examples & EP 1949800 A1 & KR 10-2008-0077970 A	8/1-8
X/Y	Masafumi NODA et al., "Ninjin kara Bunri sareta Nyusankin G15 Kabu ni Okeru GABA Ko Seisansei no Kaiseki", Journal of Japan Society for Lactic Acid Bacteria, 15 June 2008 (15.06. 2008), vol.19, no.2, page 126	8/1-8
X/Y	JP 2004-187501 A (Marukome Co., Ltd.), 08 July 2004 (08.07.2004), claims; paragraph [0006]; examples (Family: none)	8/1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2010 (09.08.10)Date of mailing of the international search report
17 August, 2010 (17.08.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/003663

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-24229 A (Katayama Shokuhin Kabushiki Kaisha), 29 January 2004 (29.01.2004), paragraph [0028] (Family: none)	1-8
Y	JP 7-227245 A (Kyoto-Fu, Fukujuen Co., Ltd.), 29 August 1995 (29.08.1995), claims; paragraph [0031] (Family: none)	1-8
Y	JP 2006-314207 A (Otsuka Foods Co., Ltd.), 24 November 2006 (24.11.2006), paragraphs [0011], [0028] (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P13/00(2006.01)i, A23C9/12(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P13/00, A23C9/12, C12R1/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	WO 2007/052806 A1 (国立大学法人広島大学) 2007.05.10, 特許請求 の範囲, 段落【0003】、【0017】、実施例 & EP 1949800 A1 & KR 10-2008-0077970 A	8/ 1-8
X/ Y	野田正文 他, 人參から分離された乳酸菌 G15 株における GABA 高生 産性の解析, 日本乳酸菌学会誌, 2008.06.15, Vol.19, No.2, p.126	8/ 1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2004-187501 A (マルコメ株式会社) 2004.07.08, 特許請求の範囲, 段落【0006】, 実施例 (ファミリーなし)	8/ 1-8
Y	JP 2004-24229 A (片山食品 株式会社) 2004.01.29, 段落【0028】 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 7-227245 A (京都府, 株式会社福寿園) 1995.08.29, 特許請求の範囲, 段落【0031】 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2006-314207 A (大塚食品株式会社) 2006.11.24, 段落【0011】, 【0028】 (ファミリーなし)	1-8