

(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
2024年12月12日(12.12.2024)

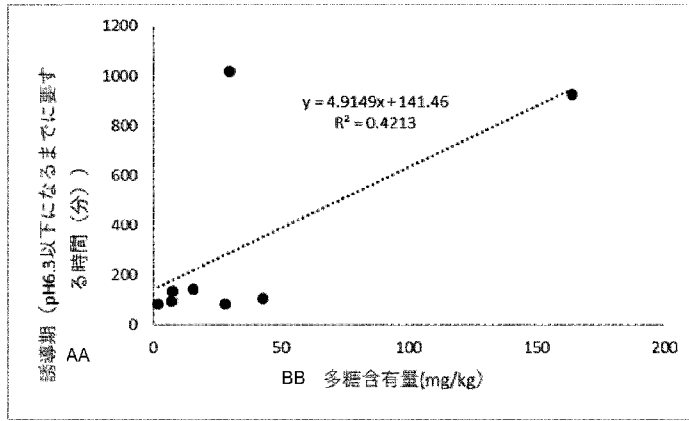


(10) 国際公開番号
WO 2024/253180 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/04 (2006.01) *A23L 29/269* (2016.01)
A23C 9/123 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/020804
- (22) 国際出願日: 2024年6月7日(07.06.2024)
- (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 2023-095345 2023年6月9日(09.06.2023) JP
- (71) 出願人: 株式会社明治(MEIJI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1048306 東京都中央区京橋二丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山本 恵理 (YAMAMOTO Eri); 〒1920919 東京都八王子市七国一丁目29番1号 株式会社明治 研究本体内 Tokyo (JP).
土屋 麻美(TSUCHIYA Asami); 〒1920919 東京都八王子市七国一丁目29番1号 株式会社明治 研究本体内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDE, AND USE OF SAME

(54) 発明の名称: 菌体外多糖の製造方法、及びその利用



AA Induction period (time (min.) required for reaching pH6.3 or lower)
BB Polysaccharide content (mg/kg)

(57) Abstract: The present invention provides a simpler and food-applicable means for increasing the production amount of an exopolysaccharide. Provided is a method for producing an exopolysaccharide, the method comprising a step for treating an exopolysaccharide-producing bacterium under conditions for lengthening the induction period by 10% or more, and culturing the treated exopolysaccharide-producing bacterium in a culture medium to produce the exopolysaccharide. The present invention provides a composition including a lactic acid bacterium that is any of: a bacterium belonging to

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

Lactobacillus delbrueckii having an exopolysaccharide production capacity of 30 mg/kg or more; a bacterium belonging to Streptococcus thermophilus having an exopolysaccharide production capacity of 69 mg/kg or more; and a bacterium belonging to Bifidobacterium breve having an exopolysaccharide production capacity of 4.2 mg/kg or more.

(57) 要約 : 食品に応用可能な、またより簡便な菌体外多糖の生産量を高める手段を提供する。菌体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件で処理し ; 処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる工程を含む、菌体外多糖の製造方法を提供する。菌体外多糖の産生能が30 mg/kg以上であるLactobacillus delbrueckiiに属する菌、菌体外多糖の産生能が69 mg/kg以上であるStreptococcus thermophilusに属する菌、及び菌体外多糖の産生能が4.2mg/kg以上であるBifidobacterium breveに属する菌のいずれかの乳酸菌を含む、組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称：菌体外多糖の製造方法、及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、菌体外多糖の製造方法、及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 乳酸菌の産生する菌体外多糖 (Exopolysaccharide; EPS) は、免疫調節作用、プレバイオティクスとしての作用、抗ガン作用、コレステロール値の低下作用など、様々な機能性を有すること知られている (非特許文献1)。中でも、ラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリカス OLL1073R-1株 (OLL1073R-1) の産生する多糖には、NK細胞の活性化作用 (特許文献1) や抗インフルエンザ効果 (特許文献2) が認められている。そのため、OLL1073R-1をはじめとする乳酸菌の多糖産生量を高めることが検討されてきた。例えば、菌体外多糖産生乳酸菌であるラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリカス用培地であって、脱脂乳及び／又は還元脱脂乳にギ酸及び／又はギ酸塩が添加されて、並びに／若しくは、脱脂乳及び／又は脱脂粉乳が加熱処理されて、ギ酸及び／又はギ酸塩の合計の濃度が0.4～10mMとされたことを特徴とする菌体外多糖産生乳酸菌用培地 (特許文献3)、乳原料に、0.3重量%以上0.55重量%以下の範囲内の量のリン酸のアルカリ金属塩であるpH緩衝剤、および、ストレプトコッカス・サーモフィルス種の乳酸菌と、乳酸菌体外機能性産生物を産生するラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス種の乳酸菌との混合物を配合し、前記pH緩衝剤により前記ストレプトコッカス・サーモフィルス種の乳酸菌の増殖を抑制しつつ前記ラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス種の乳酸菌の増殖を促進させながらその乳原料を発酵させて前記乳酸菌体外機能性産生物を増産する、乳酸菌体外機能性産生物の増産方法 (特許文献4)、及び乳原料に、0.3重量%以上0.55重量%以下の範囲内の量のリン酸のアルカリ金属塩であるpH

緩衝剤、および、ストレプトコッカス・サーモフィルス種の乳酸菌と、乳酸菌体外機能性産生物を産生するラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス種の乳酸菌との混合物を配合し、前記pH緩衝剤により前記ストレプトコッカス・サーモフィルス種の乳酸菌の増殖を抑制しつつ前記ラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス種の乳酸菌の増殖を促進させながらその乳原料を発酵させて前記乳酸菌体外機能性産生物を増産する、乳酸菌体外機能性産生物の増産方法であって、EPSの量は、前記原料乳に含まれる乳糖を分解することなく前記原料乳を発酵させた発酵乳が含有するEPSの量の1.05倍以上4.2倍以下である、発酵乳（特許文献5）が開発されている。

[0003] また、微生物における菌体外多糖産生量を促進させるための方法であって、Lactococcus属の菌体外多糖産生微生物にパルス電界処理を行い、該パルス電界処理の条件は、培養液1lあたりのパルス幅と総パルス回数との積算値を含む、菌体外多糖産生量の促進方法（特許文献6）、玄米を重量精米歩合80%以上で精米したときに得られた米糠を米麴または糖化酵素で糖化させてなる培地に、菌体外多糖産生能を有する乳酸菌を植菌して発酵させ、菌体外多糖を産生させることを特徴とする菌体外多糖の産生方法（特許文献7）、乳酸菌の菌体外多糖（EPS）の一つである中性多糖の産生量を制御する方法であって、乳酸菌を、ビタミンB2を含む乳酸発酵用組成物中で培養する工程を含むことを特徴とする中性多糖産生量の制御方法（特許文献8）等が検討されている。

[0004] 一方、EPSは、乳酸菌をはじめとする微生物が過酷な環境条件に対応するために分泌する生体高分子であって、悪条件から微生物を保護するための細胞外バイオフィルム・マトリクスの形成に関与する主要成分の一つであり、乳酸菌によるEPSの産生と環境ストレスとの関連が知られている（非特許文献2）。ストレスに敏感なビフィドバクテリウム・ビフィダムを亜致死温度42℃、100～300秒間曝露することで、従来のバイオリアクターで培養した細胞と比較して、凍結乾燥に対する細胞の耐性が著しく増加することが報告されている

(非特許文献3)。

[0005] 他方、誘導期 (Lag Phase) とは、新しい培地に導入された菌に見られる一時的に対数増殖が認められない期間であり、菌が栄養素を取り込み、新しい環境に適応するための準備段階であると考えられてきた。最近の研究では、誘導期は、菌を脅威から保護し、増殖能力を促進する、動的、組織的、適応的、進化可能なプロセスであり、細菌の進化、宿主と病原体の相互作用、抗生物質耐性、環境生物学、分子微生物学、食品安全性の研究に広く関連していることが知られている (非特許文献4)。また、*Lactobacillus rhamnosus* GGの増殖速度に対する温度の影響が報告されており、6~41℃において、牛乳中の*L. rhamnosus* GGの誘導期が、温度の低下とともに増加したことが報告されている (非特許文献5)。

[0006] なお誘導期に関し、発酵乳の製造に際し、発酵乳スターターを添加した発酵乳ミックスの状態を通常の発酵に比べて発酵の誘導期が長くなるように調整することと、スターター添加後にミックス中の溶存酸素濃度を5 ppm以下に低減させることを組み合わせて発酵を行うことにより、実際には発酵の誘導期が長くならず通常の発酵時間又は通常の発酵時間より短い時間で発酵が目標の乳酸酸度に達して終了し、その結果、滑らかな舌触りと酸味の抑えられたまろやかな風味及びクリームチーズ様のコクを有し、かつ、流通段階で崩れることのない硬さの組織を有する発酵乳が得られるという技術が提案されている (特許文献9)。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2005-194259号公報 (特許第5177728号)
特許文献2：国際公開WO2011/065300 (特許第5971949号)
特許文献3：特開2014-27925号公報 (特許第6209371号)
特許文献4：国際公開WO2014-084340 (特許第6392668号)

特許文献5：特開2019-62782号公報（特許第7109895号、特開2022-103317）

特許文献6：特開2017-2169276号公報（特許第6621065号）

特許文献7：特開2020-156341号公報

特許文献8：特開2022-45812号公報

特許文献9：特開2010-104376号公報（特許4759643号）

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. Juraskova et al. *Foods*. 2022, 11, 156.

非特許文献2：Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. Phu-Tho Nguyen et al. *AIMS Microbiology*, 2020, 6(4): 451-469.

非特許文献3：Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. Huu Thanh Nguyen et al. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 88: 85-94.

非特許文献4：Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. Robert L. Bertrand. *Journal of Bacteriology* 2019, 201(7): e00697-18

非特許文献5：Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. L. M. Valik et al. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2008 47(2): 60-67

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 菌体外多糖の生産量を高めるための従来法のいくつかは、特殊な成分を培養系に添加するものであり、食品への応用が難しい可能性がある。食品に

用可能な、またより簡便な菌体外多糖の生産量を高める手段があれば望ましい。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は以下を提供する。

[1] 菌体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件で処理し；
処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる
工程を含む、菌体外多糖の製造方法。

[2] 菌体外多糖を産生させる工程が、4～72時間行われる、1に記載
の製造方法。 [3] 菌体外多糖を産生させる工程が、10%長い誘導期を含む
、1又は2に記載の製造方法。

[4] 菌体外多糖の濃縮工程、及び精製工程の少なくとも一方を含む、1
～3のいずれか1項に記載の製造方法。

[5] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス属に属する菌、ラクトコッカ
ス属に属する菌、ストレプトコッカス属に属する菌、ビフィドバクテリウム
属に属する菌から選択されるいずれかである、1～4のいずれか1項に記載
の製造方法。

[6] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobaci
llus delbrueckii*) に属する菌、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus
lactis*) に属する菌、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcu
s thermophilus*) に属する菌、及びビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifid
obacterium breve*) に属する菌から選択されるいずれかである、1～5のい
ずれか1項に記載の製造方法。

[7] *Lactobacillus delbrueckii*が、ラクトバチルス・デルブルッキー亜
種ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) に属する菌
である、1～6のいずれか1項に記載の製造方法。

[8] 誘導期を10%以上長くする条件で処理した、*Lactobacillus*属に属す
る菌、*Lactococcus* 属に属する菌、*Streptococcus*属に属する菌、及び*Bifido
bacterium*属に属する菌のいずれかの菌体外多糖生産菌を含み、機能性関与成

分として菌体外多糖を利用するための組成物。

[9] 菌体外多糖生産菌が、*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、*Lactococcus lactis*に属する菌、*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかである、8に記載の組成物。

[1 0] 誘導期が152分以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、誘導期が236分以上である*Lactococcus lactis*に属する菌、誘導期が199分以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び誘導期が425分以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌。

[1 1] 菌体外多糖の産生能が30 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、菌体外多糖の産生能が2.2 mg/kg以上である*Lactococcus lactis*に属する菌、菌体外多糖の産生能が69 mg/kg以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び菌体外多糖の産生能が4.2mg/kg以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかを含む、組成物。

[1 2] *Lactobacillus delbrueckii*の培養物であって、300 mg/kg以上の*Lactobacillus delbrueckii*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[1 3] *Lactococcus lactis*に属する菌の培養物であって、2.2 mg/kg以上の*Lactococcus lactis*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[1 4] *Streptococcus thermophilus*の培養物であって、69 mg/kg以上の*Streptococcus thermophilus*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[1 5] *Bifidobacterium breve*の培養物であって、4.2 mg/kg以上の*Bifidobacterium breve*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[1 6] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌を含む、1又は2以上の乳酸産生菌で原料乳を発酵させ、菌体外多糖を含む発酵乳を得る工程を含む、発酵乳の製造方法。

[17] 菌体外多糖を産生させる工程が、4～72時間行われる、16に記載の製造方法。

[18] 菌体外多糖を産生させる工程が、10%長い誘導期を含む、16又は17に記載の製造方法。

[19] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*L. delbrueckii ssp. bulgaricus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、30 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Lactococcus lactis*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、2.2 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、69 mg/kg以上である；又は

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Bifidobacterium breve*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、4.2 mg/kg以上である、16～18のいずれか1項に記載の製造方法。

[20] 乳酸産生菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌をさらに含む、16～19のいずれか1項に記載の製造方法。

[21] 乳酸産生菌が、*L. bulgaricus*に属する菌をさらに含む、16から20のいずれか1項に記載の製造方法。

[22] 誘導期を長くする条件で処理することを含む、菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法。

[23] 誘導期を長くする条件での処理が、熱処理、浸透圧処理、及びpH処理からなる群より選択されるいずれかの処理を含む、1～7及び16～21のいずれか1項に記載の製造方法、又は22に記載の方法。

[0011] 本発明はまた、以下を提供する。

[1] 菌体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件で処理し；
処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる

工程を含む、菌体外多糖の製造方法。

[2] 菌体外多糖の濃縮工程、及び精製工程の少なくとも一方を含む、1に記載の製造方法。

[3] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス属に属する菌、ラクトコッカス属に属する菌、ストレプトコッカス属に属する菌、ビフィドバクテリウム属に属する菌から選択されるいずれかである、1に記載の製造方法。

[4] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) に属する菌、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) に属する菌、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する菌、及びビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) に属する菌から選択されるいずれかである、1に記載の製造方法。

[5] *Lactobacillus delbrueckii*が、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) に属する菌である、1に記載の製造方法。

[6] 誘導期を10%以上長くする条件で処理した、*Lactobacillus*属に属する菌、*Lactococcus*属に属する菌、*Streptococcus*属に属する菌、及び*Bifidobacterium*属に属する菌のいずれかの菌体外多糖生産菌を含み、機能性関与成分として菌体外多糖を利用するための組成物。

[7] 菌体外多糖生産菌が、*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、*Lactococcus lactis*に属する菌、*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかである、6に記載の組成物。

[8] 誘導期が152分以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、誘導期が236分以上である*Lactococcus lactis*に属する菌、誘導期が199分以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び誘導期が425分以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌。

[9] 菌体外多糖の産生能が30 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、菌体外多糖の産生能が2.2 mg/kg以上である*Lactococcus lactis*

isに属する菌、菌体外多糖の産生能が69 mg/kg以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び菌体外多糖の産生能が4.2mg/kg以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかを含む、組成物。

[10] *Lactobacillus delbrueckii*の培養物であって、300 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii*の培養物であって、*Lactobacillus delbrueckii*により産生された300 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[11] *Lactococcus lactis*に属する菌の培養物であって、2.2 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。好ましくは、*Lactococcus lactis*に属する菌の培養物であって、*Lactococcus lactis*に属する菌により産生された2.2 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[12] *Streptococcus thermophilus*の培養物であって、69 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。好ましくは、*Streptococcus thermophilus*の培養物であって、*Streptococcus thermophilus*により産生された69 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[13] *Bifidobacterium breve*の培養物であって、4.2 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。好ましくは、*Bifidobacterium breve*の培養物であって、*Bifidobacterium breve*により産生された4.2 mg/kg以上の菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。

[14] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌を含む、1又は2以上の乳酸産生菌で原料乳を発酵させ、菌体外多糖を含む発酵乳を得る工程を含む、発酵乳の製造方法。

[15] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、30 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Lactococcus lactis*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、2

.2 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、69 mg/kg以上である；又は

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Bifidobacterium breve*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、4.2 mg/kg以上である、14に記載の製造方法。

[16] 乳酸産生菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌をさらに含む、14又は15に記載の方法。

[17] 乳酸産生菌が、*L. bulgaricus*に属する菌をさらに含む、14から16のいずれか1項に記載の方法。

[18] 誘導期を長くする条件で処理することを含む、菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法。

[19] 誘導期を長くする条件での処理が、熱処理、浸透圧処理、及びpH処理からなる群より選択されるいずれかの処理を含む、18に記載の方法。

発明の効果

[0012] 菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の製造を効率的に行うことができる。

簡易な処理により、菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の産生能を高めることができる。

菌体外多糖を増量することにより、食品における目的の機能を向上することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]乳酸菌の発酵物における多糖含有量の増加（高温による前処理、脱脂粉乳培地使用）

[図2]乳酸菌の発酵物における多糖含有量の増加（高温による前処理、合成培地使用）

[図3]乳酸菌の発酵物における多糖含有量の増加（60℃3～10分、又は80℃1～3分の前処理）

[図4]乳酸菌の発酵物における多糖含有量の増加（高浸透圧による前処理）

[図5]乳酸菌発酵物における多糖含有量の増加（高浸透圧による前処理）

[図6]乳酸菌発酵物における多糖含有量の増加（高pHに調整した培地で培養を開始した場合）

[図7]乳酸菌の発酵中のpH推移（高温による前処理、脱脂粉乳培地使用）

[図8]乳酸菌の発酵物における生菌数（高温による前処理、脱脂粉乳培地使用）

[図9]乳酸菌の発酵物における多糖含有量の増加（高温による前処理、脱脂粉乳培地使用）

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の実施形態（本実施形態という）に基づき、本発明について詳しく説明する。以下の実施形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施形態のみに限定する趣旨ではない。本発明に関し、いずれかというときは、種類も数も任意である。特に記載した場合を除き、含有量や濃度に関する％は質量に基づく。

[0015] [菌体外多糖の製造方法]

本実施形態は、菌体外多糖生産菌を、誘導期を長くする条件で処理し；処理した菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる工程を含む、菌体外多糖の製造方法に関する。

[0016] <適用可能な菌体外多糖生産菌>

菌体外多糖生産菌とは、菌体外多糖（EPS）の産生能を有する菌であれば特に限定されないが、乳酸菌であることが好ましい。なお本発明に関し、菌体外多糖生産菌のうち、乳酸菌を例に説明することがあるが、その説明は、乳酸菌以外の菌体外多糖生産菌にも当てはまる。本実施形態に用いられる菌体外多糖生産菌は、食品製造に用いられ、菌体外多糖（EPS）の産生能を有する菌であれば特に限定されない。桿菌（ラクトバチルス属に属する菌等）であってもよく、球菌（ラクトコッカス属、ロイコノストック属、ベディオコッカス属、又はストレプトコッカス属に属する菌、等）であってもよい。またビフィ

ドバクテリウム属に属する菌であってもよい。本実施形態では、菌体外多糖生産菌として、一種のみ用いてもよく、また二種以上用いてもよい。

[0017] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、ラクトバチルス属に属する菌、ラクトコッカス属に属する菌、ストレプトコッカス属に属する菌、サーモフィラス属に属する菌、及びビフィドバクテリウム属に属する菌から選択されるいずれかである。

[0018] 好ましい菌体外多糖生産菌の例の一つは、ラクトバチルス属に属する菌である。ラクトバチルス属菌としては、例えば、ブルガリカス種、カゼイ種、アシドフィルス種、プラントラム種などが挙げられる。なお、本明細書において「ラクトバチルス属に属する菌」とは、2020年4月15日付で発行されたINTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, Volume 70, Issue 4における論文「A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*」において発表された乳酸菌の再編成により新たに設定された25の属、すなわち、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、パララクトバチルス (*Paralactobacillus*) 属、ホルザプフェリア (*Holzapfelia*) 属、アミロラクトバチルス (*Amylolactobacillus*) 属、ボンビラクトバチルス (*Bombilactobacillus*) 属、コンパニラクトバチルス (*Companilactobacillus*) 属、ラピディラクトバチルス (*Lapidilactobacillus*) 属、アグリラクトバチルス (*Agrilactobacillus*) 属、シェライフェリラクトバチルス (*Schleiferilactobacillus*) 属、ロイゴラクトバチルス (*Loigolactobacillus*) 属、ラクチカゼイバチルス (*Lacticaseibacillus*) 属、ラチラクトバチルス (*Latilactobacillus*) 属、デラグリオア (*Dellagليا*) 属、リクオリラクトバチルス (*Liquorilactobacillus*) 属、リギラクトバチルス (*Ligilactobacillus*) 属、ラクチプランティバチルス (*Lactiplantibacillus*) 属、フルフリラクトバチルス (*Furfurilactobacillus*) 属、パウシルラクトバチルス (*Paucilactobacillus*) 属、リモシラクトバチルス (*Limosilactobacillus*) 属、フ

ルクチラクトバチルス (*Fructilactobacillus*) 属、アセティラクトバチルス (*Acetilactobacillus*) 属、アピラクトバチルス (*Apilactobacillus*) 属、レビラクトバチルス (*Levilactobacillus*) 属、セクンディラクトバチルス (*Secundilactobacillus*) 属及びレンティラクトバチルス (*Lentilactobacillus*) 属のいずれかの属に属する乳酸菌をいう。一態様では、ラクトバチルス属に属する菌から、ラクチカゼイバチルス (*Lacticaseibacillus*) 属、特に *Lacticaseibacillus rhamnosus*、より特定すると非特許文献5に記載されている *Lactobacillus rhamnosus* GG (上記の論文に拠る再編成後は *Lacticaseibacillus rhamnosus* に分類される。) を除いたものを、菌体外多糖生産菌としてもよい。

[0019] これらのラクトバチルス属に属する菌の中で、ラクトバチルス・デルブルッキーに属する菌であることが好ましく、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) に属する菌であることがより好ましい。

[0020] 特に好ましい態様においては、菌体外多糖生産菌は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (受託番号：FERM BP-10741) (OLL1073R-1と称することがある。) である。

[0021] OLL1073R-1は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター (I P O D, N I T E) (日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) にブタペスト条約に基づき、国際寄託されている (寄託者：株式会社 明治、寄託日：2006年11月29日、受託番号：FERM BP-10741)。

[0022] *Lactobacillus delbrueckii* に属する菌、又は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* に属する菌の他の好ましい株として、下記が挙げられる。
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411)、
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569)、
Lactobacillus delbrueckii OLL204989 (NITE BP-02874)

[0023] 好ましい菌体外多糖生産菌の他の例の一つは、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) に属する菌、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に属する菌、及びビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) に属する菌から選択されるいずれかである。

[0024] *Lactococcus lactis*に属する好ましい株の例として、下記が挙げられる。
Lactococcus lactis spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387)

[0025] *Streptococcus thermophilus*に属する好ましい株の例として、下記が挙げられる。
Streptococcus thermophilus OLS3618 (NITE BP-01815) 、
Streptococcus thermophilus OLS 3290 (FERM BP-19638)

[0026] *Bifidobacterium breve*に属する好ましい株の例として、下記が挙げられる。
。
B. breve JCM1192^T
JCM1192^Tは基準株であり、国立研究開発法人理化学研究所 バイオリソース研究センター微生物材料開発室 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) から入手できる。

[0027] <菌体外多糖生産菌を前処理する工程>

本実施形態のEPSの製造方法は、菌体外多糖生産菌を、所定の培地で培養する前に、誘導期を長くする条件で、前処理する工程を含む。本発明者らは、菌体外多糖生産菌の培養において、培養前に菌体外多糖生産菌を前処理すること、具体的には、培養における誘導期が長くなる条件に曝す処理を行うことにより、未処理の場合と比較して、培養液中に産生されるEPSの濃度が増すこと、及び誘導期の長さや培養液中のEPSの濃度には、正の相関関係があることを見出している (図1～6参照)。なお、「未処理」は「処理なし」ということもある。

[0028] EPSは、乳酸菌をはじめとする微生物が過酷な環境条件に対応するために分泌する生体高分子あり、悪条件から微生物を保護するための細胞外バイオフ

ィルム・マトリクスの形成に関与する主要成分の1つであり、乳酸菌によるEPSの産生と環境ストレスとの関連が知られている（前掲非特許文献2）。ストレスに敏感なビフィドバクテリウム・ビフィダムを亜致死温度42℃、100～300秒間曝露することで、従来のバイオリアクターで培養した細胞と比較して、凍結乾燥に対する細胞の耐性が著しく増加することが報告されている（前掲非特許文献3）。

[0029] 誘導期（Lag Phase）とは、一般に、新しい培地に導入された菌に見られる一時的に対数増殖が見られない期間を指す。最近の研究では、誘導期は、菌を脅威から保護し、増殖能力を促進する、動的、組織的、適応的、進化可能なプロセスであり、細菌の進化、宿主と病原体の相互作用、抗生物質耐性、環境生物学、分子微生物学、食品安全性の研究に広く関連していることが知られている（前掲非特許文献4）。

[0030] 本実施形態の製造方法では、ある前処理条件が誘導期を長くする条件といえるかどうかは、その条件で処理した菌を培養したときに、処理しなかった場合に比較して、培養初期（培養開始時からしばらくの間）において、培養液のpHが所定の程度低下するのに要した時間（誘導期）が長くなるときに、その条件を、誘導期を長くする条件とすることができる。培養液のpHが所定の程度低下するのに要した時間は、より具体的には、培養開始時の培養液のpHが、0.2低下するのに要した時間とすることができる。培養開始時の培養液のpHは、新鮮培地のpHとすることができる。なお、pHは、温度により変わらうが、本発明に関しpHの値を示すときは、特に記載した場合を除き、菌体外多糖生産菌の培養の際の温度で測定された値である。この温度は、多くの場合は40℃であり、*Lactococcus lactis*の場合は30℃である。

[0031] 誘導期の遅延率は、次のように定義できる。

誘導期の遅延率 = [（処理した菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間（分）） - （未処理の菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間（分））] / （未処理の菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間（分））

- [0032] 遅延率を求める際には、処理した菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間を求める培養と、未処理の菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間を求める培養は、同じ培地を用いた同じ培養条件で行う。培地及び培養条件は、未処理の菌のために標準的に用いられるものか、又はEPSの製造を行うために用いられるものとする事ができる。遅延率を求める際に用いることのできる培地の例は、*L. delbrueckii*に属する菌のためには、MRS培地、*L. lactis*に属する菌のためにはMRS培地、*S. thermophilus*に属する菌のためにはM17培地、*B. breve*に属する菌のためにはGAM培地である。遅延率を求める場合には、適切であれば、脱脂粉乳培地を用いてもよい。
- [0033] 一態様では、いずれの菌体外多糖生産菌を用いる場合であっても、また処理後の培養においていずれの培地を用いる場合であっても、目的の効果を得るためには、誘導期を10%以上長くする条件で処理することが好ましく、誘導期を30%以上長くする条件で処理することがより好ましく、誘導期を50%以上長くする条件で処理することがより好ましく、誘導期を70%以上長くする条件で処理することがより好ましく、誘導期を90%以上長くする条件で処理することがさらに好ましい。
- [0034] 本実施形態の製造方法では、菌体外多糖生産菌の誘導期を長くする条件で菌体外多糖生産菌を処理することにより、達成できる。菌体外多糖生産菌の誘導期を長くする（誘導期の延長）条件で処理するとは、菌体外多糖生産菌を、高温処理、低温処理、高浸透圧処理、低浸透圧処理、低pH処理、高pH処理、高圧処理、乾燥処理、凍結処理、凍結融解処理、栄養欠乏処理（窒素、糖、二酸化炭素などの栄養素の飢餓）、栄養過剰供給、CO₂処理、酸化負荷、共培養処理、化学物質処理、抗生物質処理、細胞壁分解酵素処理、抗菌ペプチド処理、超音波処理、及び紫外線照射処理を含む。菌体外多糖生産菌の誘導期を長くする条件として、一種のみ用いてもよく、また二種以上用いてもよい。
- [0035] 目的の効果が比較的高いことがわかっており、また実施が容易であるとの観点からは、誘導期の長化は、熱（高温）処理、浸透圧（高浸透圧）処理、

及びpH（高pH）処理から選択されるいずれかの処理により実施される。

[0036] （熱）

一態様では、誘導期を10%以上長くする条件は、いずれの菌体外多糖生産菌を用いる場合であっても、また処理後の培養においていずれの培地を用いる場合であっても、熱（高温）処理である。

[0037] 温度は、高温に弱い菌以外の菌（60℃10分の処理に耐えられる、すなわち60℃10分の処理後に培養したとき、培養液のpHが、培養初期と比較して0.2低下するのに要した時間が24時間以内である。）の場合は、45℃以上であることが好ましく、50℃以上であることがより好ましく、58℃以上であることがさらに好ましい。温度の上限値は、86℃以下であることが好ましく、84℃以下であることがより好ましく、82℃以下であることがさらに好ましい。

[0038] 高温に弱い菌の場合は、40℃以上であることが好ましく、45℃以上であることがより好ましく、50℃以上であることがさらに好ましい。温度の上限値は、76℃以下であることが好ましく、74℃以下であることがより好ましく、72℃以下であることがさらに好ましく、70℃以下であることが特に好ましい。

[0039] より具体的には、*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus*、又は*Bifidobacterium breve*に属する菌である場合には、50～86℃であることが好ましく、58～82℃であることがより好ましい。*Lactococcus lactis*に属する菌である場合には、45～70℃であることが好ましく、50～70℃であることがより好ましい。

[0040] 熱処理を行う場合、処理時間は温度に応じて適宜決定することができる。高温に弱い菌以外の菌の場合は、58～62℃で処理する場合、処理時間は、0.5分以上であることが好ましく、1分以上であることが好ましく、2分以上であることが好ましく、3分以上であることが好ましく、4分以上であることがより好ましく、8分以上であることがさらに好ましい。上限値は、20分以下であることが好ましく、18分以下であることがより好ましく、16分以下であることが好ましく、14分以下であることがさらに好ましい。78～82℃で処理する場合、処理時間は、0.5分以上であることが好ましく、1分以上であることが

好ましく、2分以上であることがより好ましく、2.5分以上であることがさらに好ましい。上限値は、6分以下であることが好ましく、5分以下であることがより好ましく、4分以下であることがさらに好ましい。

[0041] 高温に弱い菌の場合は、50～70℃で処理する場合、処理時間は、0.25秒以上であることが好ましく、例えば0.5分以上、0.75分以上とすることができる。上限値は、6分以下であることが好ましく、例えば、5分以下、4分以下、3分以下とすることができる。

[0042] より具体的には、*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus*、又は*Bifidobacterium breve*に属する菌を58～62℃で処理する場合、0.5～20分であることが好ましく、2.5～18分であることがより好ましく、3～10分であることがさらに好ましい。*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus*、又は*Bifidobacterium breve*に属する菌を78～82℃で処理する場合、0.5～6分であることが好ましく、0.5～16分であることがより好ましく、1～3分であることがさらに好ましい。*Lactococcus lactis*に属する菌を58～62℃で処理する場合、0.5～2分であることが好ましく、0.5～1分であることがより好ましい。

[0043] (浸透圧)

一態様では、誘導期を10%以上長くする条件は、いずれの菌体外多糖生産菌を用いる場合であっても、また処理後の培養においていずれの培地を用いる場合であっても、高浸透圧処理（高塩濃度処理）である。塩濃度は、0.8%以上であることが好ましく、3%以上であることがより好ましく、5%以上であることがさらに好ましい。上限値は、20%以下であることが好ましく、16%以下であることがより好ましく、12%以下であることがさらに好ましい。

[0044] 高塩濃度処理を行う場合、処理時間は塩濃度に応じて適宜決定することができる。処理時間は、1時間以上であることが好ましく、2時間以上であることがより好ましく、3時間以上であることがさらに好ましい。上限値は、9時間以下であることが好ましく、7時間以下であることがより好ましく、3時間以下であることがさらに好ましい。

[0045] (pH)

一態様では、誘導期を10%以上長くする条件は、いずれの菌体外多糖生産菌を用いる場合であっても、また処理後の培養においていずれの培地を用いる場合であっても、高pH処理である。高pH処理は、培養開始時のpHを高く設定することにより実施できる。培養開始時のpHは、6.3超であることが好ましく、6.5以上であることがより好ましく、6.8以上であることがさらに好ましい。上限値は、7.4以下であることが好ましく、7.2以下であることがより好ましく、7.0以下であることがさらに好ましい。

[0046] (他の誘導期を長くする条件)

熱、浸透圧、pH以外の処理であって、目的の効果が比較的高いと思われる処理の例は、超音波、紫外線、高圧、細胞壁分解酵素、抗菌ペプチド、低温、及び凍結融解からなる群より選択されるいずれかによる処理である。菌体外多糖生産菌を、低温、例えば21℃以下に、短時間、例えば数分間、曝す処理では目的の効果は得られないと考えられるが、低温に数時間、例えば4時間以上曝す処理は、目的の効果を期待しうる。

[0047] 一態様では、菌体外多糖生産菌を前処理する工程は、冷蔵保存、凍結処理、及び凍結乾燥処理を含まないか、又はそれら以外の処理である。また、菌体外多糖の製造方法において、培養開始の菌の培地への添加量を比較的小なくすること、及び培養を比較的低い温度で行うことによっても、誘導期は長くなりうるが、培地への添加量を少なくすること、及び培養を比較的低温で行うことは、菌体外多糖生産菌を前処理する工程に該当しない。

[0048] <菌体外多糖を産生させる工程>

本実施形態の製造方法は、誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる工程を含む。この工程の条件は、処理を行わない菌にEPSを産生させるために培養する場合と同様とすることができる。

[0049] EPS産生用培地は、乳原料を含む培地を用いてもよく、合成培地を用いてもよい。EPSを、発酵乳の形態で得るためには、乳原料を含む培地を用いること

ができる。発酵乳の製造方法については後述する。合成培地を用いる場合、用いる菌体外多糖生産菌に応じて、合成培地を選択することができる。

[0050] 培養は、嫌気条件であってもよく、好気条件であってもよい。培地の溶存酸素濃度は、10%以上長化した誘導期が確保される限り、特に限定されない。用いる菌にも拠るが、溶存酸素濃度が低いと乳酸菌の増殖が促進され、誘導期が短くなると考えられる（特許文献9）。したがって、長化した誘導期を確保する等の観点からは、培地の溶存酸素濃度は低すぎないほうがよい。一態様では、他の培養条件がどのような場合であっても、培養開始時の培地の溶存酸素濃度は、1ppm以上であり、2ppm以上、3ppm以上、4ppm以上、5ppm以上、5ppm超、5.1ppm以上、5.2ppm以上、5.3ppm以上、5.4ppm以上、5.5ppm以上とすることができる。また培養開始時の培地の溶存酸素濃度は、他の培養条件がどのような場合であっても10ppm以下とすることができ、9ppm以下、8ppm以下、7ppm以下、6ppm以下としてもよい。また別の態様では、他の培養条件がどのような場合であっても、本実施形態の菌体外多糖の製造方法は、培地の溶存酸素を低減させる処理や工程を含まない。

[0051] 培養温度は、37～43℃が好ましく、培養時間としては、菌体外多糖生産菌の増殖と産生されるEPSの観点から4～72時間が好ましく、例えば、4～48時間、4～36時間、4～24時間、6～72時間、6～48時間、6～36時間、6～24時間、8～72時間、8～48時間、8～36時間、8～24時間、12～72時間、12～48時間、12～36時間、12～24時間、14～72時間、14～48時間、14～36時間、14～24時間、16～36時間、16～24時間でありうる。培養時間が4時間以上であれば十分なEPSが得られうる。また培養時間が48時間以下であれば、菌体外多糖生産菌の生菌数の減少が少なく、時間に応じたEPSの産生量の増加が見込まれる。培養液のpHは、培養期間を通じ、3.5～7.5が好ましく、4.5～7.0がより好ましく、pH5.5～6.5がさらに好ましい。菌体外多糖生産菌の培養液のpHは、通常、培養時間とともに低下するので、培養時に中和を行って、pHを維持することで、EPSの産生量をより高くすることができる場合がある。

[0052] 本実施形態の製造方法での菌体外多糖を産生させる工程は、10%以上長い誘

導期を含むことができる。10%以上長い誘導期とは、前処理していない同じ菌を同じ条件で培養した場合に比較して10%以上長い誘導期をいう。ここでいう誘導期は、新しい培地に導入された菌に見られる一時的に対数増殖が見られない期間としてもよく、培養開始時のpHが所定の程度、例えば0.2、低下するのに要した時間としてもよい。

[0053] 菌体外多糖を産生させる工程において、誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌を用いる場合であっても、菌の増殖が促進され、誘導期が短くなると考えられる条件で培養すると、実際の誘導期の長さは、処理していない菌を用いた場合と同程度か、又はそれより短くなる場合があると考えられる。このような場合は、菌体外多糖を産生させる工程は、処理した菌を用いてはいるが10%以上長い誘導期を含むとはいえない。一態様では、菌体外多糖を産生させる工程は、用いる菌や培養条件に関わらず、10%以上長い誘導期を含むことが好ましく、30%以上長い誘導期を含むことがより好ましく、90%以上長い誘導期を含むことがさらに好ましい。

[0054] なお、誘導期は、培養開始の乳酸菌の培地への量を比較的少なくすること（特許文献9）、及び比較的低温で培養すること（非特許文献5）によっても長くなりうるが、本実施形態の製造方法における菌体外多糖を産生させる工程は、一態様では、用いる菌や他の培養条件に関わらず、培養開始の菌の培地への添加量を少なくすることで長くした誘導期を含まず（又は、培養開始の菌の培地への量を少なくする以外の手段で長くした誘導期を含み）、また比較的低温で培養することで長くした誘導期を含まない（又は、比較的低温で培養する以外の手段で長くした誘導期を含む。）。また、菌体外多糖は、培地に用いる原料乳の乳糖を減じることによって増産されうるが（特許文献5）、本実施形態の製造方法における菌体外多糖を産生させる工程は、一態様では、用いる菌や他の培養条件に関わらず、予め乳糖を減じた原料乳を用いる態様を含まない（又は、予め乳糖を減じた原料乳を用いる以外の手段で菌体外多糖が増産される）。

[0055] <他の工程等>

本実施形態の製造方法は、上述した以外の工程を含んでいてもよい、そのような工程の例として、菌の培養により得られた培養液をろ過する工程、遠心分離する工程、膜分離する工程、除菌する工程、濃縮する工程、産生させたEPSを精製する工程、乾燥する工程等が挙げられる。

[0056] 精製工程は、下記を含んでいてもよい：

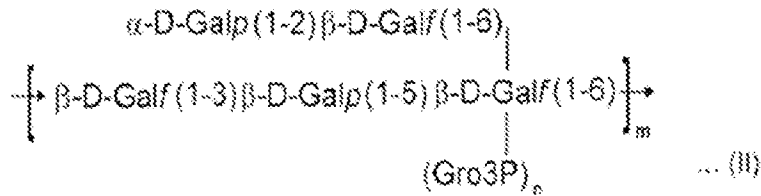
1. 遠心分離で培養物から菌体を除去する。
2. 最終濃度が5~10重量%程度になるようにトリクロロ酢酸を添加してタンパク沈殿し、遠心分離する。
3. エタノール沈殿によって高分子量の多糖類や、タンパク質を沈殿として回収する。
4. タンパク質と核酸を除去する。
 - a) DNase、RNaseで核酸を分解処理する。
 - b) プロティナーゼでタンパクを分解する。
 - c) タンパク質を熱変性させた後、遠心分離と透析を行う。
5. 陰イオン交換樹脂で酸性多糖体類を吸着した後、溶出して回収する。

[0057] また、例えば、中性多糖体のみを用いる場合には、特開2000-247895号公報に記載の方法等で中性多糖体を単離し、また必要に応じて、精製したものを用いることができる。

[0058] EPSは、以下の手順によって単離することもできる。

1. 培地にトリクロロ酢酸を最終濃度10重量%で加え、タンパク質を変性させる。
2. 遠心分離により培養物から変性タンパク質と菌体を除去する。
3. エタノール沈殿によって高分子量の多糖体を沈殿させこれを回収する。
4. 陰イオン交換樹脂により酸性多糖体類を吸着させ、残りの溶出液より中性多糖体を回収する。
5. DNase、RNase処理により核酸を分解する。
6. プロティナーゼ処理によりタンパク質を分解する。

[化2]



[0066] 式(11)中、nは、繰り返し単位毎に独立して0又は1の整数を表す。
式(11)中、mは整数であり、1～300であってよく、1～200であってよい。

[0067] 式(1)及び(11)中、 $\alpha\text{-D-Galp}$ は、ピラノース型の $\alpha\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、 $\beta\text{-D-Galp}$ は、ピラノース型の $\beta\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、 $\beta\text{-D-Galf}$ は、フラノース型の $\beta\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、Gro3Pはグリセロール3-リン酸基を表す。式(1)及び(11)中の(1-2)、(1-3)、(1-5)、及び(1-6)は、それぞれ、残基間の1-2結合(すなわち、1位炭素-2位炭素結合)、1-3結合、1-5結合、及び1-6結合を表す。

[0068] 酸性多糖体は、一態様では、式(1)で表される繰り返し単位が連なった繰り返し構造(例えば、式(11))において、繰り返し単位1個当たり平均約1個(例えば、各繰り返し単位に対し1個($n=1$)又は0個であり、かつ、酸性多糖体全体での加重平均で繰り返し単位1個当たり約1個)のグリセロール3-リン酸基が付加されているが、それに限定されない。

[0069] <その他>

本実施形態の菌体外多糖の製造方法の特に好ましい態様は、特定の菌体外多糖生産菌を用いて特定の時間培養を行う、下記である。

Lactobacillus delbrueckiiに属する菌、Lactococcus lactisに属する菌、Streptococcus thermophilusに属する菌、及びBifidobacterium breveに属する菌から選択されるいずれかの体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件で処理し；

処理した菌体外多糖生産菌を培地で4～48時間培養し、菌体外多糖を産生さ

せる

工程を含む、菌体外多糖の製造方法。

この態様では、菌と培養時間以外は、本明細書で説明する様々な条件を取りうる。この態様では、培養時間は、4～36時間、4～24時間、6～48時間、6～36時間、6～24時間、8～48時間、8～36時間、8～24時間、12～48時間、12～36時間、12～24時間、14～48時間、14～36時間、14～24時間、16～36時間、16～24時間でありうる。

[0070] [誘導期を長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌、それを含む組成物]

本実施形態は、誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌、EPSの産生能が従来よりも約5%増した菌体外多糖生産菌を含む、組成物に関する。誘導期を10%以上長くする条件で処理することにより、EPSの産生能が従来よりも約5%増した菌が得られる。

[0071] <誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌>

本実施形態の菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた場合の菌体外多糖の産生能（以下、EPS産生能とも表記）により、下記のように特定されうる。

EPS産生能が、125 mg/kg超、好ましくは150 mg/kg以上、より好ましくは175 mg/kg以上、さらに好ましくは300 mg/kg以上である、*Lactobacillus*属に属する菌、好ましくは*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、より好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌、さらに好ましくは*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (FERM BP-10741) ;

EPS産生能が、2.2 mg/kg以上、好ましくは5 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、さらに好ましくは15 mg/kg以上である、*Lactococcus*属に属する菌、好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis*に属する菌、より好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387) ;

EPS産生能が、69 mg/kg以上、好ましくは72 mg/kg以上、より好ましくは75 mg/kg以上、さらに好ましくは80 mg/kg以上である、*Streptococcus*属に属す

る菌、好ましくは*Streptococcus thermophilus*に属する菌、より好ましくは*Streptococcus thermophilus* OLS 3290 (FERM BP-19638) ;

EPS産生能が、4.2 mg/kg以上、好ましくは7 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、より好ましくは14 mg/kg以上である、*Bifidobacterium*属に属する菌、好ましくは*Bifidobacterium breve*に属する菌、より好ましくは*Bifidobacterium breve* JCM1192T。

[0072] なお本発明に関し、EPSの濃度又は量をいうときは、特に記載した場合を除き、フェノール硫酸法 (Ziadi et al., BioMed Research International, (2018) Vol.2018, doi: 10.1155/2018/1896240.) で測定された濃度又は量を指す。フェノール硫酸法の詳細な条件の例は、本明細書の実施例の項に記載されている。対象物におけるEPSの濃度又は量は、フェノール硫酸法以外の方法で測定した値を、必要に応じフェノール硫酸法での測定値に換算することにより求めてもよい。フェノール硫酸法以外のEPSの測定方法としては、EPSに特異的に結合するレクチンを用いて菌体外多糖をサンドイッチすることにより、EPSを効率良く検出する方法 (国際公開W02022/220154) 等が知られている。

[0073] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた場合のEPSの産生能により、下記のように特定されうる。

EPS産生能が2.1 mg/kg以上、好ましくは5 mg/kg以上、より好ましくは7 mg/kg以上、さらに好ましくは7.5 mg/kg以上である、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411) ;

EPS産生能が16.4 mg/kg以上、好ましくは20 mg/kg以上、より好ましくは24 mg/kg以上、さらに好ましくは28 mg/kg以上である、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569) ;

EPS産生能が7.7 mg/kg以上、好ましくは20 mg/kg以上、より好ましくは30 mg/kg以上、さらに好ましくは40 mg/kg以上である、*Lactobacillus delbrueckii* OLL204989 (NITE BP-02874)

[0074] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた場合のEPSの産生

能により、下記のように特定されうる。

EPS産生能が4.4 mg/kg以上、好ましくは6 mg/kg以上、より好ましくは7.5 mg/kg以上、より好ましくは9 mg/kg以上である、*Streptococcus thermophilus* OLS3618 (NITE BP-01815)

[0075] 本実施形態の菌体外多糖生産菌は、合成培地を用いた場合のEPSの産生能により、下記のように特定されうる：

EPS産生能が、301 mg/kg以上、好ましくは 305 mg/kg以上、より好ましくは310 mg/kg以上、さらに好ましくは314 mg/kg以上である、*Lactobacillus*属に属する菌、好ましくは*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、より好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌、さらに好ましくは*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1；

EPS産生能が、32 mg/kg以上、好ましくは45 mg/kg以上、より好ましくは70 mg/kg以上、さらに好ましくは80mg/kg以上である、*Lactococcus*属に属する菌、好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis*に属する菌、より好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387)

なお合成培地を用いる場合、用いる菌体外多糖生産菌に応じて、合成培地を選択することができる。

[0076] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、合成培地を用いた場合のEPSの産生能により、下記のように特定されうる。

EPS産生能が255 mg/kg以上、好ましくは260 mg/kg以上、より好ましくは270 mg/kg以上、さらに好ましくは280 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411)

EPS産生能が209 mg/kg以上、好ましくは240 mg/kg以上、より好ましくは275 mg/kg以上、さらに好ましくは305 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569)

EPS産生能が218 mg/kg以上、好ましくは230 mg/kg以上、より好ましくは240 mg/kg以上、さらに好ましくは250 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii* OLL204989 (NITE BP-02874)

[0077] <特定の長さの誘導期を有する菌体外多糖生産菌>

本実施形態の菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた場合の誘導期の長さにより、下記のように特定されうる。

誘導期の長さが、152分以上、好ましくは400分以上、より好ましくは700分以上、さらに好ましくは1000分以上である、*Lactobacillus*属に属する菌、好ましくは*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、より好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌、さらに好ましくは*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569) ;

誘導期の長さが、236分以上、好ましくは240分以上、より好ましくは244分以上、さらに好ましくは248分以上である、*Lactococcus*属に属する菌、好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis*に属する菌、より好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387) ;

誘導期の長さが、199分以上、好ましくは206分以上、より好ましくは212分以上、さらに好ましくは219分以上である、*Streptococcus*属に属する菌、好ましくは*Streptococcus thermophilus*に属する菌、より好ましくは*Streptococcus thermophilus* OLS3618 (NITE BP-01815) ;

誘導期の長さが、425分以上、好ましくは431分以上、より好ましくは436分以上、さらに好ましくは442分以上である、*Bifidobacterium*属に属する菌、好ましくは*Bifidobacterium breve*に属する菌、より好ましくは*Bifidobacterium breve* JCM1192T。

誘導期に発酵乳製造等の観点から上限値を設定する場合には、1010分以下、好ましくは800以下である。

[0078] なお本発明に関し、菌体外多糖生産菌を誘導期の長さにより特定する場合、その長さは、特に記載した場合を除き、乳原料を含む培地を用いて対象となる菌体外多糖生産菌を培養したときに、培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間をいう。乳原料を用いた培地としては、いずれの菌を用いる場合においても、脱脂粉乳培地を用いることが好ましく、10%還元脱脂乳培地(pH6.5)を用いることがより好ましい。10%還元脱脂乳培地は、脱脂乳成分を10%

(W/W) で含む培地（還元脱脂乳）を、適切な手段による殺菌、例えば95℃で達温殺菌をしたものをいう。脱脂粉乳の組成は、例えば脂肪分1質量%、タンパク質34質量%、乳糖54質量%、灰分8質量%、無脂乳固形分96質量%である。10%還元脱脂乳培地は、例えば、乳糖含量5.4質量%、無脂乳固形分9.6質量%を含む。

また、乳原料を含む培地を用いて対象となる菌体外多糖生産菌を培養する前に、賦活培養の条件や培地は、具体的には、実施例に記載の方法や、＜菌体外多糖の産生能（EPS産生能）＞の項の記載に従い行うことができる。

[0079] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた誘導期の長さにより、下記のように特定されうる。

誘導期の長さが、126分以上、好ましくは380分以上、より好ましくは630分以上、さらに好ましくは900分以上である、*Lactobacillus delbrueckii*ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (FERM BP-10741) ;

誘導期の長さが、89分以上、好ましくは102分以上、より好ましくは115分以上、さらに好ましくは128分以上である、*Lactobacillus delbrueckii*subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411) ;

誘導期の長さが、99分以上、好ましくは100分以上、より好ましくは102分以上、さらに好ましくは103分以上である、*Lactobacillus delbrueckii*OLL204989 (NITE BP-02874)

[0080] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、脱脂粉乳培地を用いた場合の誘導期の長さにより、下記のように特定されうる。

誘導期の長さが、99分以上、好ましくは100分以上、より好ましくは102分以上、さらに好ましくは103分以上である、*Streptococcus thermophilus* OLS3290 (FERM BP-19638)

誘導期に発酵乳製造等の観点から上限値を設定する場合には、1000分以下、好ましくは700以下、より好ましくは300以下である。

[0081] 本実施形態の菌体外多糖生産菌は、合成培地を用いた場合の誘導期の長さにより、下記のように特定されうる：

誘導期の長さが、136分以上、好ましくは355分以上、より好ましくは574分以上、さらに好ましくは793分以上である、*Lactobacillus*属に属する菌、好ましくは*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、より好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌、さらに好ましくは*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (FERM BP-10741) ;

誘導期の長さが、198分以上、好ましくは191分以上、より好ましくは194分以上、さらに好ましくは196分以上である、*Lactococcus*属に属する菌、好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis*に属する菌、より好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387)

なお合成培地を用いる場合、用いる菌体外多糖生産菌に応じて、合成培地を選択することができる。

誘導期に発酵乳製造等の観点から上限値を設定する場合には、1000分以下、好ましくは700以下、より好ましくは300以下である。

[0082] 一態様では、菌体外多糖生産菌は、合成培地を用いた場合の誘導期の長さにより、下記のように特定されうる。

誘導期の長さが、105以上、好ましくは129分以上、より好ましくは152分以上、さらに好ましくは176分以上である、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411)

誘導期の長さが、115分以上、好ましくは167分以上、より好ましくは219分以上、さらに好ましくは271分以上である、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569)

誘導期の長さが、89分以上、好ましくは91分以上、より好ましくは92分以上、さらに好ましくは93分以上である、*Lactobacillus delbrueckii* OLL204989 (NITE BP-02874)

誘導期に発酵乳製造等の観点から上限値を設定する場合には、500分以下、好ましくは300分以下である。

[0083] <菌体外多糖の産生能 (EPS産生能)>

本実施形態に関し、脱脂粉乳培地を用いた場合の菌体外多糖生産菌のEPS産生

能は、 $1.0 \times 10^4 \sim 10 \times 10^{10}$ cfu/gの菌液を、1質量%となるように脱脂粉乳培地に添加し、至適な温度で24時間培養（本培養）したときの培養物のEPS含有量（mg/kg）として定義することができる。至適な温度は、*Lactococcus lactis* spp. *lactis*は30℃前後、その他の乳酸菌は37～43℃である。脱脂粉乳培地は、特に記載した場合を除き、10%脱脂粉乳培地を指す。

[0084] 菌の添加量は、脂粉乳培地、又はMRS培地に対して、生菌数で $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ cfu/gとなる量であることが好ましく、 $4 \times 10^6 \sim 4 \times 10^7$ cfu/gとなる量であることがより好ましく、 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ cfu/gとなる量であることがより好ましい。

[0085] 脱脂粉乳培地は、必要に応じ発酵促進剤を添加して用いてもよい。詳細には、*Lactobacillus*属に属する菌、例えば*L. delbrueckii*に属する菌のためには、イノシン酸、*Streptococcus*属に属する菌、例えば*S. thermophilus*に属する菌のためには、カゼインペプチド、*Bifidobacterium*属に属する菌、例えば*B. breve*に属する菌のためにはイノシン酸、*Lactococcus*属に属する菌、例えば*L. lactis*に属する菌のためには、酵母エキスを、有効な濃度で添加する。菌体外多糖生産菌のEPS産生能を評価する際、脱脂粉乳培地は、ギ酸、リンゴ酸、フマル酸、及びこれらの塩を含まない。また、用いる乳由来の原料は、乳糖分解酵素により乳糖を減じていないもの（原料中に乳糖分解酵素を含まないもの）を用いる。

[0086] なお、必要に応じて、本培養前に賦活培養を行うことが好ましい。賦活培養としては、対象となる菌体外多糖生産菌に適した培地において、37℃、嫌気で16～18時間（好ましくは16時間）、培養を行うことが好ましい。このとき、賦活培養に供する菌量としては、対象となる菌に適した培地に対して、生菌数で $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ cfu/gとなる量であることが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cfu/gとなる量であることがより好ましい。

[0087] 賦活培養のための培地の例として、*L. delbrueckii*に属する菌のため、及び*L. lactis*に属する菌のためには、脱脂粉乳培地又はMRS培地、*L. lactis*に属する菌のためにはMRS培地、*S. thermophilus*に属する菌のためにはM17培地

、*B. breve*に属する菌のためにはGAM培地が挙げられる。

[0088] EPSの産生能は、合成培地を用いた場合としても定義できる。詳細には、 $1.0 \times 10^4 \sim 10 \times 10^{10}$ cfu/gの乳酸菌液を1質量%となるように対象となる菌に適した培地に添加し、至適な温度で24時間培養したときの培養物のEPSの含有量（mg/kg）として定義することができる。合成培地の例として、*L. delbrueckii*に属する菌のためにはMRS培地、*L. lactis*に属する菌のためにはMRS培地、*S. thermophilus*に属する菌のためにはM17培地、*B. breve*に属する菌のためにはGAM培地、が挙げられる。菌体外多糖生産菌のEPS産生能を評価する際、合成培地は、標準的な成分以外は含まない。

[0089] <組成物>

本実施形態の組成物は、機能性関与成分（有効成分ということもある。）としてEPSを利用するために用いることができる。乳酸菌の産生するEPSは、免疫調節作用、プレバイオティクスとしての作用、抗ガン作用、コレステロール値の低下作用など、様々な機能性を有すること知られている（前掲非特許文献1）。したがって、一態様では、EPSを含む組成物は、免疫調節のため、プレバイオティクスとして用いるため、がんの処置（リスクの低減、予防、治療、等）、コレステロール値の制御のために、EPSを利用するために用いることができる。

[0090] OLL1073R-1の産生するEPSには、NK細胞の活性化作用（前掲特許文献1）や抗インフルエンザ効果（前掲特許文献2）が認められている。したがって、OLL1073R-1を含む組成物は、免疫調節のため、プレバイオティクスとして用いるため、がんの処置（リスクの低減、予防、治療、等）、コレステロール値の制御のために、OLL1073R-1の産生するEPSを利用するために用いることができる。

[0091] 本実施態様の組成物は、培養物を含んでいてもよい。培養物は、乳酸菌とEPSとを含みうる。

[0092] 本実施態様により提供される培養物の例は、下記である。

Lactobacillusに属する菌、好ましくはLactobacillus delbrueckiiに属す

る菌、より好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*に属する菌、さらに好ましくは*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1の培養物であって、300 mg/kg以上、好ましくは304 mg/kg以上、より好ましくは308 mg/kg以上、さらに好ましくは312 mg/kg以上のEPS、好ましくは当該菌により産生されたEPSを含む培養物；

*Lactococcus*属に属する菌、好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis*に属する菌、より好ましくは*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789の培養物であって、2.2 mg/kg以上、好ましくは5 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、さらに好ましくは15 mg/kg以上のEPS、好ましくは当該菌により産生されたEPSを含む培養物；

*Streptococcus*属に属する菌、好ましくは*Streptococcus thermophilus*に属する菌、より好ましくは*Streptococcus thermophilus* OLS 3290の培養物であって、69 mg/kg以上、好ましくは72 mg/kg以上、より好ましくは75 mg/kg以上、さらに好ましくは80 mg/kg以上のEPS、好ましくは当該菌により産生されたEPSを含む培養物；

*Bifidobacterium*属に属する菌、好ましくは*Bifidobacterium breve*に属する菌、より好ましくは*Bifidobacterium breve* JCM1192Tの培養物であって、4.2 mg/kg以上、好ましくは7 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、より好ましくは14 mg/kg以上のEPS、好ましくは当該菌により産生されたEPSを含む培養物。

なお、前述のとおり、ここでいうEPSの量は、特に記載した場合を除き、フェノール硫酸法で測定された量（測定の性質上、菌体が産生したEPS以外の多糖、例えば培地成分由来の多糖が含まれている可能性がある。）として記載している。

[0093] 組成物は、発酵食品の形態でありうる。発酵食品は、発酵乳、チーズ、植物性原料（豆乳、アーモンドミルク、ココナツミルク等）を使用した発酵物（植物性原料発酵ヨーグルトなど）、漬物、キムチ、醤油、味噌などの発酵食品が挙げられ、好ましくは発酵乳、チーズ、植物性原料を使用した発酵物

が挙げられる。前記ヨーグルトは、例えば、プレーンヨーグルト、ハードヨーグルト、ドリンクヨーグルト、ソフトヨーグルト、又はフローズンヨーグルトであってもよい。発酵物には、上記微生物及び発酵基質に加えて、食品分野で使用される食品原料や食品添加剤、培養のための栄養成分や添加剤などの各種物質が含まれていてもよい。

[発酵乳の製造方法]

本実施形態は、上述したような、誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌、又は培養液中に産生されるEPSの濃度が増すように処理された菌体外多糖生産菌を用いる、EPSを含む発酵乳の製造方法に関する。

[0094] 本実施形態の製造方法は、一態様では、誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌を含む1又は2以上の乳酸産生菌で、原料乳を発酵させ、EPSを含む発酵乳を得る工程を含む。本態様に用いられる誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌は、「誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌、それを含む組成物」の項での、「誘導期を10%以上長くする条件で処理した菌体外多糖生産菌」と同じである。別の一態様では、培養液中に産生されるEPSの濃度が増すように処理された菌体外多糖生産菌を含む1又は2以上の乳酸産生菌で、原料乳を発酵させ、EPSを含む発酵乳を得る工程を含む。本態様でいう誘導期が10%以上長くなるように処理した乳酸菌は、「菌体外多糖の製造方法」の項での、「菌体外多糖生産菌を前処理する工程」で説明した処理と同じである。1又は2以上の乳酸産生菌は、処理した菌体外多糖生産菌以外に、例えばStreptococcus属に属する菌、好ましくはStreptococcus thermophilusに属する菌を含んでいてもよい。

[0095] 本実施形態の製造方法では、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量、又は得られる発酵乳の菌体外多糖の含有量は、下記である。

Lactobacillusに属する菌、好ましくはLactobacillus delbrueckiiに属する菌、より好ましくは、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricusに属する菌、さらに好ましくはLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む1又は2以上の乳酸菌を用いる場合、得られる発酵乳の菌体外多

糖の含有量は300 mg/kg以上、好ましくは304 mg/kg以上、より好ましくは308 mg/kg以上、さらに好ましくは312 mg/kg以上であり；

Lactococcus属に属する菌、好ましくはLactococcus lactis spp. lactisに属する菌、より好ましくはLactococcus lactis spp. lactis OLS3789を含む1又は2以上の乳酸菌を用いる場合、得られる発酵乳の菌体外多糖の含有量は2.2 mg/kg以上、好ましくは5 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、さらに好ましくは15 mg/kg以上であり；

Streptococcus属に属する菌、好ましくはStreptococcus thermophilusに属する菌、より好ましくはStreptococcus thermophilus OLS 3290を含む1又は2以上の乳酸菌を用いる場合、得られる発酵乳の菌体外多糖の含有量は69 mg/kg以上、好ましくは72 mg/kg以上、より好ましくは75 mg/kg以上、さらに好ましくは80 mg/kg以上であり；

Bifidobacterium属に属する菌、好ましくはBifidobacterium breveに属する菌、より好ましくはBifidobacterium breve JCM1192Tを含む1又は2以上の乳酸菌を用いる場合、得られる発酵乳の菌体外多糖の含有量は4.2 mg/kg以上、好ましくは7 mg/kg以上、より好ましくは10 mg/kg以上、より好ましくは14 mg/kg以上である。

[0096] 本実施形態の製造方法は、別の一態様では、誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌によりEPSを得る工程、得られたEPSを発酵乳に添加する工程を含む。さらに別の一態様では、培養液中に産生されるEPSの濃度が増すように処理された菌体外多糖生産菌によりEPSを得る工程、得られたEPSを発酵乳に添加する工程を含む。

[0097] 発酵乳を得るために用いる原料乳は、乳製品を含む。用いることのできる乳製品としては、牛、ヤギ等の獣乳、殺菌乳、脱脂乳、全脂粉乳、脱脂粉乳、全脂濃縮乳、脱脂濃縮乳、クリーム、バター、バターミルク、乳清が挙げられる。乳たんぱく質には、乳たんぱく質濃縮物（MPC）、乳清たんぱく質濃縮物（WPC）、乳清たんぱく質単離物（WPI）、 α -ラクトアルブミン（ α -La）、 β -ラクトグロブリン（ β -Lg）、熱変性ホエイたん

ぱく質及び酵素処理ホエイたんぱく質が含まれる。

[0098] 原料乳は、他の原材料を含んでいてもよい。他の原材料として、砂糖、甘味料、糖類、香料、水等が挙げられる。また、必要に応じて、ゼラチン、寒天、ペクチン、カルボキシメチルセルロース（CMC）、キサントガム、カラギーナン、タマリンドシードガム、グアーガム、アラビアガム、ローカストビーンガム、ジェランガム、大豆多糖類、加工でんぷん、等のゲル化剤、増粘剤、安定剤が挙げられる。

[0099] 一態様では、乳糖のレベルを減じていない原料乳を用いる。培地に用いる原料乳の乳糖のレベルを比較的低くすることでEPSが増産できるが、本実施形態からは乳糖を乳糖分解酵素により予め減じた原料乳を用いる態様を除くことができる。

[0100] 本実施態様の発酵乳の製造方法は、均質化工程、殺菌工程、発酵乳を容器に充填する工程等を含んでいてもよい。

[0101] [菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法]

本実施態様は、誘導期を長くする条件で処理することを含む、乳酸菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法、及び乳酸菌を、熱（高熱）処理、浸透圧（高浸透圧）処理、及びpH（高pH）処理からなる群より選択されるいずれかの処理を行うことを含む、乳酸菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法に関する。

[0102] 本実施態様に適用可能な乳酸菌は、菌体外多糖の製造方法の項で説明した適用可能な乳酸菌を、本実施態様も同様に用いることができる。

[0103] この実施態様は、乳酸菌の培養において、培養前に菌体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件に曝すことにより培養液中に産生されるEPSの濃度が増すこと、及び誘導期の長さと同様に培養液中のEPSの濃度には、正の相関関係がある（図1～6参照）との本発明者らの知見に基づく。

実施例

[0104] [実施例1：熱処理による*L. delbrueckii*の多糖産生量の増加（脱脂粉乳培地）]

OLL1073R-1を含む4株の*L. delbrueckii*について、菌体の熱処理が脱脂粉乳発酵中の多糖産生に与える影響を検証した。

[0105] <方法>

・検討菌株：

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (FERM BP-1074
1)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL205013 (NITE BP-02411
)、

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL1171 (NITE BP-01569)
、

Lactobacillus delbrueckii OLL204989 (NITE BP-02874)

[0106] ・熱処理条件：各菌液250 μ L (菌を、タンパク質成分を含む所定の培地 (脱脂粉乳

、ラクトース水和物、酵母エキス、魚肉エキス、SMO (サンソフトQ17S)、水) で培養した液。菌数約 5.8×10^9 cfu/g。) を1.5 mLチューブに入れ、ヒートブロックで60°C、10分加熱。熱処理した菌液は、必要に応じ、凍結して保存した。

[0107] ・発酵培地：イノシン酸を終濃度1 mMとなるよう添加した10%還元脱脂乳培地 (脱脂粉乳 (脂肪分1質量%、タンパク質3.4質量%、乳糖5.4質量%、灰分8質量%、無脂乳固形分9.6質量%) (株式会社明治製) の10質量%水溶液。培地中、乳糖含量5.4質量%、無脂乳固形分9.6質量%) を95°C 達温殺菌したもの、pH6.5

10%還元脱脂乳培地とは、脱脂乳成分を10% (W/W) で含む培地 (還元脱脂乳) を意味する。

[0108] ・発酵条件：発酵培地に菌液 (凍結菌) を1%接種し、40°Cで発酵、氷上に置くことで24時間後に発酵停止

・多糖濃度の測定法：フェノール硫酸法

[0109] 前処理：

発酵24時間後の発酵物10gに100w/v%トリクロロ酢酸溶液1 mLを添加し、攪拌したのち、13400 g、4℃、10分遠心分離した。上清を分取し、10%w/vトリクロロ酢酸溶液を5 mL添加し、攪拌したのち、13400 g、4℃、10分遠心分離した。上清を分取し、上清の2倍量の100%エタノールを添加し、混合したのち、10℃で一晩静置した。13400 g、4℃、20分遠心分離したのち、上清を捨てて100%エタノールを9 mL添加し、冷蔵庫で20分静置することを2回繰り返した。13400 g、4℃、20分遠心分離して上清を捨て、精製水を10 mL添加し、シェーカーを用いて完全に溶解させた。

[0110] 測定方法：

前処理液500 μ Lを中試験管に移し、5% (w/v) フェノール水溶液を500 μ L添加して5秒間vortexした。濃硫酸2.5 mLを添加し、すぐに10秒間vortexした。室温で20–40分静置したのち、全量をキュベットに移し、OD490 nmを測定した。スタンダードとして測定したD(+)-グルコースの結果を用いて検量線を作成し、検量線から算出した濃度に0.9をかけた値を多糖濃度とした。以下の実験では、特に記載した場合を除き、多糖濃度は、上記の前処理を行った後、この方法で測定した。

[0111] ・pHの測定法：

pHは、pHモニタリング装置（堀場製作所製）にpHセンサー（pH Sencer SE 555、Knick製）を付け、その電極を発酵物に挿した状態で発酵を行うことで、pHを継時的に測定した。以下の実験では、特に記載した場合を除き、pHはこの方法で測定した。

[0112] <結果>

発酵24時間後の各発酵物のEPS含有量を下表及び図1に示す。下表に示す通り、*L. delbrueckii* 4株はいずれも、60℃、10分の熱処理をしてから発酵することで、発酵24時間後の多糖含有量が高まることが明らかとなった。

[0113] また、誘導期の遅延率（培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間（分）、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.5からpH6.3になるまでの時間の遅延率）は、下表に示した通りであった。

[0114] 誘導期の遅延率 = [(処理した乳酸菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間 (分)) - (未処理の乳酸菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間 (分))] / (未処理の乳酸菌が培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間 (分))

[0115] [表1]

乳酸菌スターター	多糖含有量(mg/kg)	
	熱処理なし	熱処理あり
OLL1073R-1	28.3	163.8
OLL205013	2.0	7.8
OLL1171	15.6	30.0
OLL204989	7.3	42.9

乳酸菌スターター	誘導期 (pH6.3以下になるまでに要する時間 (分))		
	熱処理なし	熱処理あり	遅延 (%)
OLL1073R-1	85	925	988
OLL205013	85	135	59
OLL1171	145	1020	603
OLL204989	95	105	11

[0116] [実施例2：熱処理によるL. delbrueckiiの多糖産生量の増加 (合成培地)]

実施例1ではヨーグルト発酵を想定し、脱脂粉乳培地を用いた。実施例2では、乳酸菌が産生した多糖を生成し、素材として各種商品に添加することを想定し、合成培地 (MRS broth) を用いた際の、4株のL. delbrueckiiについて多糖産生量を検証した。

[0117] <方法>

・ 検討菌株：OLL1073R-1、OLL205013、OLL1171、OLL204989

[0118] ・ 熱処理条件：実施例1と同じ

[0119] ・ 発酵培地：MRS broth (Difco)、pH6.1

[0120]

[表2-1]

Approximate Formula Per Liter

Proteose Peptone No. 3	10.0 g
Beef Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Dextrose	20.0 g
Polysorbate 80	1.0 g
Ammonium Citrate	2.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium Phosphate	2.0 g

[0121] ・発酵条件：発酵培地に凍結菌を1%接種し、40℃で発酵、氷上に置くことで24時間後に発酵停止

・多糖濃度の測定法：フェノール硫酸法（実施例1に記載）

[0122] <結果>

発酵24時間後の各発酵物のEPS含有量を下表及び図2に示す。L. delbrueckiiの4株は合成培地においても、60℃、10分の熱処理をしてから発酵することで、発酵24時間後の多糖含有量が高まることが明らかとなった。また、誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.1からpH5.9になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0123]

[表2-2]

乳酸菌スターター	多糖含有量(mg/kg)	
	熱処理なし	熱処理あり
OLL1073R-1	287.0	314.8
OLL205013	242.9	284.9
OLL1171	199.8	308.2
OLL204989	208.2	252.2

乳酸菌スターター	誘導期 (pH5.9以下になるまでに要する時間 (分))		
	熱処理なし	熱処理あり	遅延 (%)
OLL1073R-1	130	835	542
OLL205013	100	185	85
OLL1171	110	285	159
OLL204989	85	95	12

[0124] [実施例3：発酵乳に用いられる乳酸菌種の子糖産生に熱処理が与える影響]

L. delbrueckii 以外で、発酵乳に用いられている菌種であるS. thermophilus及びB. breveについて、菌体の熱処理が発酵中の多糖産生に与える影響を検証した。なお、S. thermophilusは2株 (Streptococcus thermophilus OLS3618 (NITE BP-01815)、Streptococcus thermophilus OLS3290 (FERM BP-19638))、B. breveは基準株1株(JCM1192^T)を用いた。

[0125] <方法>

・賦活培地；S. thermophilusはM17 broth (Gifco)、B. breveはGAM broth (日水製薬株式会社)

[0126]

[表3-1]

M17 Broth

	g(950ml 中)
Pancreatic Digest of Casein	5
Soy Peptone	5
Beef Extract	5
Yeast Extract	2.5
Ascorbic Acid	0.5
Magnesium Sulfate	0.25
Disodium- β -glycerophosphate	19

Add 50mL 10%lactose solution

GAM Broth

	g(1L 中)
ペプトン	10
ダイズペプトン	3
プロテオーゼペプトン	10
消化血濁末	13.5
酵母エキス	5
肉エキス	2.2
肝臓エキス	1.2
ブドウ糖	3
リン酸二水素カリウム	2.5
塩化ナトリウム	3
溶性デンプン	5
L-システイン塩酸塩	0.3
チオグリコール酸ナトリウム	0.3

[0127] ・賦活培養条件：賦活培地に凍結菌を1%添加し、37℃、16時間静置培養したのち、当該賦活液を賦活培地に1%添加し、37℃、16時間静置培養

- ・ 熱処理条件：賦活液250 μLを1.5 mLチューブに入れ、ヒートブロックで60℃、10分加熱
- ・ 発酵培地：10%還元脱脂乳培地（95℃達温殺菌）を調整し、*S. thermophilus*の発酵時はカゼインペプチドCMA500(カゼイン蛋白分解物、商品名：Hyvital Casein CMA 500 Protein Hydrolysate、製造者：FrieslandCampina Domo、標準成分値：タンパク質：86.4%，灰分：6.0%，水分：<5%，脂肪：<0.1%，ラクトース：<0.1%、平均分子量：267ダルトン、分解方法：酵素分解)を終濃度0.1%、*B. breve*の発酵時はイノシン酸を終濃度1 mMとなるよう添加、pH6.5
- ・ 発酵条件：発酵培地に賦活液を1%接種し、40℃で発酵、24時間で発酵停止
- ・ 多糖濃度の測定法：フェノール硫酸法（実施例1に記載）

[0128] <結果>

発酵24時間後の各発酵物のEPS含有量を下表に示す。*S. thermophilus* 2株及び*B. breve*の基準株1株についても、60℃、10分の熱処理をしてから発酵することで、発酵24時間後の多糖含有量が高まることが明らかとなった。また、誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.5からpH6.3になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0129] [表3-2]

乳酸菌種	乳酸菌名	多糖含有量(mg/kg)	
		熱処理なし	熱処理あり
<i>S. thermophilus</i>	OLS3618	4.2	9.4
<i>S. thermophilus</i>	OLS3290	65.9	82.9
<i>B. breve</i>	JCM1192 ^T	4.0	14.7

乳酸菌種	乳酸菌名	誘導期 (pH6.3以下になるまでに要する時間(分))		
		熱処理なし	熱処理あり	遅延 (%)
<i>S. thermophilus</i>	OLS3618	190	230	21
<i>S. thermophilus</i>	OLS3290	55	65	18
<i>B. breve</i>	JCM1192 ^T	405	465	15

[0130] [実施例4：熱処理条件の違いによる*L. delbrueckii*の多糖産生量の増加(

脱脂粉乳培地)]

<方法>

OLL1073R-1を、60℃3分、60℃5分、60℃10分、80℃1分、80℃3分熱処理し、処理後の生菌数を測定した。次いで、95℃達温殺菌した10%脱脂粉乳培地(1mMイノシン酸添加、pH6.5)に、熱処理したOLL1073R-1を1%接種して40℃で発酵した。発酵24時間後にサンプリングし、発酵後の生菌数と、EPS濃度測定(フェノール硫酸法、実施例1に記載)を実施した。

[0131] <結果>

結果を下表及び図3に示す。60℃、3分、または60℃、5分の熱処理をしても、熱処理直後の生菌数は低下したにもかかわらず、発酵24時間後のEPS濃度は熱処理なしよりも向上していた。60℃、10分、又は80℃、1分の熱処理後は大幅な生菌数の低下が確認されたものの、EPS濃度は熱処理なしよりも向上していた。

[0132] 60℃3分、60℃5分、60℃10分、80℃1分の条件において発酵24時間後のlog₁₀(生菌数)あたりの多糖濃度は、熱処理なしよりも向上していた。

[0133] また、多糖濃度の上昇が見られた、60℃3分、60℃5分、60℃10分、80℃1分の条件における誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.5からpH6.3になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0134]

[表4]

加熱条件	加熱処理後生菌数 (cfu/g)	24時間発酵後生菌数 (cfu/g)	log10(24時間発酵後生菌数)	多糖濃度 (mg/kg)	多糖濃度/log10(生菌数)
熱処理なし	1.3.E+07	2.3.E+07	7.4	102.3	13.9
60℃3分	1.3.E+06	6.3.E+07	7.8	153.9	19.7
60℃5分	4.7.E+04	8.1.E+08	8.9	182.3	20.5
60℃10分	<100	6.2.E+08	8.8	169.6	19.3
80℃1分	5.2.E+05	5.0.E+07	7.7	156.7	20.4
80℃3分	<100	<100	—	0.8	—

加熱条件	pH6.3以下になるまでの時間 (分)	遅延 (%)
熱処理なし	120	-
60℃3分	300	150
60℃5分	485	304
60℃10分	850	608
80℃1分	290	142
80℃3分	—	—

[0135] [実施例5：塩（浸透圧）処理による*L. delbrueckii*の多糖産生量の増加（脱脂粉乳培地）]

<方法>

OLL1073R-1を、NaCl終濃度0.8%、5%、10%となるよう凍結菌と混合し、37℃で3時間もしくは6時間静置（高浸透圧処理）した。次いで、95℃達温殺菌した10%脱脂粉乳培地（1 mMイノシン酸添加、pH6.5）に、処理したOLL1073R-1菌液を2%接種して40℃で発酵した。発酵24時間後にサンプリングし、発酵後の生菌数測定、EPS濃度測定（フェノール硫酸法、実施例1に記載）を実施した。

[0136] <結果>

結果を下表及び図4に示す。NaCl処理により、発酵24時間後のEPS濃度

は、NaCl処理濃度が上昇するほど、また、処理時間が長いほど向上する傾向にあった。log10（生菌数）あたりの多糖濃度も同様であった。

[0137] [表5]

ストレス条件	処理後生菌数 (cfu/g)	24時間発酵後生菌数 (cfu/g)	log10(24時間発酵後生菌数)	多糖濃度 (mg/kg)	多糖濃度/log10 (生菌数)
37°C3H NaCl 0.8%	1.7.E+06	3.1.E+08	8.5	105.4	12.4
	2.5.E+06	2.1.E+08	8.3	129.9	15.6
	2.7.E+05	4.6.E+08	8.7	127.4	14.7
37°C6H NaCl 0.8%	8.9.E+05	3.1.E+08	8.5	95.3	11.2
	8.1.E+05	4.3.E+08	8.6	131.4	15.2
	4.1.E+04	1.8.E+08	8.3	157.3	19.1

塩処理条件	pH6.3以下になるまでの時間 (分)
37°C3H NaCl 0.8%	240
	215
	385
37°C6H NaCl 0.8%	255
	280
	490

[0138] [実施例6：塩（浸透圧）処理による*L. delbrueckii*の多糖産生量の増加（脱脂粉乳培地）]

<方法>

OLL1073R-1を、NaCl終濃度0%、0.8%、5%、10%となるよう凍結菌と混合し、37°Cで3時間静置（高浸透圧処理）した。次いで、95°C達温殺菌した10%脱脂粉乳培地（1 mMイノシン酸添加、pH6.5）に、処理したOLL1073R-1菌液を4%接種して（菌としては2%）40°Cで発酵した。発酵24時間後にサンプリングし、発酵後の生菌数測定、EPS濃度測定（フェノール硫酸法、実施例1に記載）を実施した。

[0139] <結果>

下表及び図5に示す通り、NaCl処理をしてから発酵することで、発酵24時

間後の多糖含有量が高まることが明らかとなった。また、誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.5からpH6.3になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0140] [表6]

ストレス条件	処理後生菌数 (cfu/g)	24時間発酵後生菌数 (cfu/g)	log10(24時間発酵後生菌数)	多糖濃度 (mg/kg)	多糖濃度/log10 (生菌数)
処理なし	n.d.	1.5E+07	7.2	125.6	17.5
37°C3H NaCl 0.8%	7.1E+06	2.1E+07	7.3	132.6	18.1
NaCl 5%	8.5E+06	2.0E+06	6.3	136.2	21.6
NaCl 10%	1.5E+06	2.4E+08	8.4	165.0	19.7

ストレス条件	pH6.3以下になるまでの時間	遅延 (%)
処理なし	110	-
37°C3H NaCl 0.8%	170	55
NaCl 5%	160	45
NaCl 10%	310	182

[0141] [実施例7：高pH処理によるL. delbrueckiiの多糖産生量の増加]

<方法>

OLL1073R-1を、下表に記載の培地(オートクレーブ後、フィルター滅菌した2mol/L DL-リンゴ酸を培地に対して0.2%(final 4mM)添加)に0.3%添加して、培養初発pHを、pH6.0(コントロール、pH調整なし)、炭酸カリウムでpH6.7、pH6.9に調整し、37°Cで、炭酸カリウムで中和しながらpH5.4にて、24時間培養した。

[0142]

[表7-1]

	配合率
	%
脱脂粉乳	4
無水結晶ぶどう糖	7
ビール酵母エキス ミースト P2G	0.5
魚肉エキス Bacterio-N-KN	1
乳化剤 サンソフト Q17S	0.05
消泡剤 アワブレーク L-01	0.1
計	100

[0143] 発酵 24時間後にサンプリングし、発酵後の生菌数測定、EPS 濃度測定（フェノール硫酸法、実施例1に記載）を実施した。

[0144] <結果>

図6に示す通り、初発pHが通常より高い場合、発酵24時間後の多糖含有量が高まることが明らかとなった。また、誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分))は、下表に示した通りであった。

[0145] [表7-2]

初発pH	Δ pH=0.2 までの時間(分)	遅延(%)
6.0	90	-
6.7	120	33
6.9	120	33

[0146] [実施例8：熱処理による*Lactococcus lactis* spp. *lactis*の多糖産生量の増加(MRS培地)

<方法>

MRS brothに*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387) の凍結菌を1%添加し、37℃、16時間静置培養したのち、当該賦活液を賦活培地(MRS)に1%添加し、37℃、16時間静置培養した(賦活培養)。

[0147] 賦活培養液を、250 μ Lを1.5 mLチューブに入れ、ヒートブロックで60°C、1分熱処理した。MRS brothにOLS3789の加熱処理菌液を1%接種し、30°Cで発酵し、24時間後に氷上に置くことで発酵停止した。多糖濃度の測定はフェノール硫酸法、実施例1に記載にしたがって実施した。

[0148] <結果>

結果を下表に示す。60°C、1分の加熱処理によって、発酵24時間後多糖濃度の上昇が見られた。また、加熱処理による誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.1からpH5.9になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0149] [表8]

熱ストレス	多糖濃度 (mg/kg)	pH5.9以下 になるま での時間	遅延 (%)
処理なし	31.1	180	-
60°C1分	83.2	200	11

[0150] [実施例9：塩(浸透圧)処理による*Lactococcus lactis* spp. *lactis*の多糖産生量の増加(脱脂粉乳培地)]

<方法>

MRS brothに*Lactococcus lactis* spp. *lactis* OLS3789 (NITE BP-1387)の凍結菌を1%添加し、37°C、16時間静置培養したのち、当該賦活液を賦活培地(MRS)に1%添加し、37°C、16時間静置培養した(賦活培養)。

[0151] 賦活培養液を、NaCl終濃度2%となるよう凍結菌と混合し、37°Cで3時間静置した。その後、10%脱脂粉乳培地に0.1%ミーストP2G(酵母エキス)を添加した培地に、OLS3789の塩処理菌液を2%(菌としては1%)接種し、30°Cで発酵を行い、24時間後に氷上に置くことで発酵停止した。多糖濃度の測定はフェノール硫酸法、実施例1にしたがって実施した。

[0152] <結果>

結果を下表に示す。3時間の塩処理によって、発酵 24 時間後多糖濃度の上昇が見られた。また、加熱処理による誘導期の遅延率(培養初期のpHを0.2変化させるのに要した時間(分)、つまり本実施例においては、発酵培地のpHがpH6.5からpH6.3になるまでの時間の遅延率)は、下表に示した通りであった。

[0153] [表9]

塩	多糖濃度 (mg/kg)	pH6.3 以下になるまで の時間	遅延 (%)
処理なし	2.1	225	-
NaCl 2% 37°C3H	15.8	250	11

[0154] [実施例 10 : 熱処理された *L. delbrueckii* の発酵中のEPS産生 (脱脂粉乳培地)]

L. delbrueckii について、菌体の熱処理が脱脂粉乳発酵中の多糖産生に与える影響を検証した。

[0155] <方法>

・検討菌株 :

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 (FERM BP-1074 1)

[0156] ・熱処理条件 : 各菌液250 μ L (菌を、タンパク質成分を含む所定の培地 (脱脂粉乳、ラクトースー水和物、酵母エキス、魚肉エキス、SMO (サンソフトQ17S)、水) で培養した液。菌数約 5.8×10^9 cfu/g。) を1.5 mLチューブに入れ、ヒートブロックで、60°C、5分加熱、80°C、1分加熱。熱処理した菌液は、必要に応じ、凍結して保存した。

[0157] ・発酵培地 : イノシン酸を終濃度1 mMとなるよう添加した10%還元脱脂乳培地 (脱脂粉乳 (脂肪分1質量%、タンパク質3.4質量%、乳糖5.4質量%、灰

分8質量%、無脂乳固形分9.6質量%) (株式会社明治製) の10質量%水溶液。培地中、乳糖含量5.4質量%、無脂乳固形分9.6質量%) を95℃達温殺菌したもの、pH6.5

10%還元脱脂乳培地とは、脱脂乳成分を10% (W/W) で含む培地 (還元脱脂乳) を意味する。

[0158] ・発酵条件：発酵培地に菌液 (凍結菌) を1%接種し、40℃で発酵、氷上に置くことで24時間後に発酵停止した。また、pH5.2時点、pH4.6時点でサンプリングを行った。

・多糖濃度の測定法：実施例1に記載

・pHの測定法：実施例1に記載

[0159] <結果>

60℃、5分加熱、80℃、1分加熱のいずれも、誘導期の遅延が認められた (図7)。

60℃、5分の熱処理をしても、熱処理直後の生菌数は低下しなかったが (図8)、pH5.2 (熱処理なしの場合は発酵3時間弱時点、60℃、5分加熱の場合は発酵約4時間時点)、pH4.6 (熱処理なしの場合は発酵5時間弱時点、60℃、5分加熱の場合は発酵約6時間時点) 及び発酵24時間時点のEPS濃度は、熱処理なしよりも向上していた (図9)。

このことから、発酵開始4時間後頃には、EPSの増産効果が出始めることが確認された。

[0160] 80℃、1分の熱処理後は大幅な生菌数の低下が確認されたが、発酵24時間時点での生菌数及びEPS濃度は、他の場合と比べて最も高かった (図8、9)。本結果から、乳酸菌体を、誘導期を10%以上長くする条件で処理した後に培養する場合、EPSの増産効果が出始めるのは、対数増殖中期以降であると考えられた。対数増殖期中期をより特定すると、発酵液のpHが5.2となった時点以降又は発酵約2.5時間時点以降であると考えられた。EPSの増産効果がより大きく出始めるのは、対数増殖後期以降から24時間時点までの間であると考えられた。対数増殖期後期をより特定すると、発酵液のpHが4.6となった時点以降

又は発酵約4～5時間時点以降であると考えられた。

[0161] [表10]

接種量	pH	前処理条件	培養時間	EPS濃度 (µg/ml)		菌数 (cfu/mL)
				ave	SD	
1.00%	pH5.2	処理なし	2:54	44.6	1.8	5.8.E+07
		60℃5min	4:12	46.8	0.6	5.4.E+07
		80℃1min	※回収できずデータなし		6乗以下	
	pH4.6	処理なし	4:52	62.9	0.6	5.2.E+07
		60℃5min	5:59	86.2	2.6	6.3.E+07
		80℃1min	※回収できずデータなし		6乗以下	
	-	処理なし	24	83.5	1.2	1.4.E+07
		60℃5min	24	94.9	0.4	1.6.E+07
		80℃1min	24	107.0	4.8	7.9.E+07

[0162] [小括]

このように、様々な菌体外多糖生産菌を培養前に、熱（高熱）、浸透圧（高浸透圧）、pH（高pH）、超音波処理、紫外線照射処理、高圧処理、細胞壁分解酵素処理、抗菌ペプチド処理、凍結融解処理などの誘導期を長くする処理により培養液中に産生されるEPSの濃度が増すこと、及び誘導期の長さと同培養液中のEPSの濃度には、正の相関関係があることが判明した（図1～6参照）。したがって、菌体外多糖生産菌に対し、誘導期を長くする条件で処理した後に、培養を行うことで、菌体外多糖の産生を促進することができる。

[0163] 以上より、様々な菌体外多糖生産菌を、誘導期を長くする、特に誘導期を10%以上長くする条件で処理し、処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる工程を含む、菌体外多糖の製造方法が提供できる。

産業上の利用可能性

[0164] 本発明は、菌体外多糖生産菌由来の菌体外多糖の製造方法、及び菌体外多糖を含む食品の製造方法を提供するものであり、菌体外多糖の機能により改善可能な疾患又は状態を予防又は改善し、未病の人々の健康維持・改善をサポートする。本発明によれば、人々の健康維持・改善する食品組成物と、食品の製造方法を提供することができる。また本発明により、様々な人々の栄養の改善が実現され、健康的な生活が確保され、福祉が促進されうる。

請求の範囲

- [請求項1] 菌体外多糖生産菌を、誘導期を10%以上長くする条件で処理し；
処理した菌体外多糖生産菌を培地で培養し、菌体外多糖を産生させる
工程を含む、菌体外多糖の製造方法。
- [請求項2] 菌体外多糖を産生させる工程が、4～72時間行われる、請求項1
に記載の製造方法。
- [請求項3] 菌体外多糖を産生させる工程が、10%長い誘導期を含む、請求項1
に記載の製造方法。
- [請求項4] 菌体外多糖の濃縮工程、及び精製工程の少なくとも一方を含む、請
求項1に記載の製造方法。
- [請求項5] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス属に属する菌、ラクトコッカ
ス属に属する菌、ストレプトコッカス属に属する菌、ビフィドバクテ
リウム属に属する菌から選択されるいずれかである、請求項1に記載
の製造方法。
- [請求項6] 菌体外多糖生産菌が、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobac
illus delbrueckii*) に属する菌、ラクトコッカス・ラクティス (*Lac
tococcus lactis*) に属する菌、ストレプトコッカス・サーモフィラ
ス (*Streptococcus thermophilus*) に属する菌、及びビフィドバクテ
リウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) に属する菌から選択さ
れるいずれかである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項7] *Lactobacillus delbrueckii*が、ラクトバチルス・デルブルッキー
亜種ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*)
に属する菌である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項8] 誘導期を10%以上長くする条件で処理した、*Lactobacillus*属に属す
る菌、*Lactococcus*属に属する菌、*Streptococcus*属に属する菌、及
び*Bifidobacterium*属に属する菌のいずれかの菌体外多糖生産菌を含
み、機能性関与成分として菌体外多糖を利用するための組成物。

- [請求項9] 菌体外多糖生産菌が、*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、*Lactococcus lactis*に属する菌、*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかである、請求項8に記載の組成物。
- [請求項10] 誘導期が152分以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、誘導期が236分以上である*Lactococcus lactis*に属する菌、誘導期が199分以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び誘導期が425分以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌。
- [請求項11] 菌体外多糖の産生能が30 mg/kg以上である*Lactobacillus delbrueckii*に属する菌、菌体外多糖の産生能が2.2 mg/kg以上である*Lactococcus lactis*に属する菌、菌体外多糖の産生能が69 mg/kg以上である*Streptococcus thermophilus*に属する菌、及び菌体外多糖の産生能が4.2mg/kg以上である*Bifidobacterium breve*に属する菌のいずれかを含む、組成物。
- [請求項12] *Lactobacillus delbrueckii*の培養物であって、300 mg/kg以上の*Lactobacillus delbrueckii*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。
- [請求項13] *Lactococcus lactis*に属する菌の培養物であって、2.2 mg/kg以上の*Lactococcus lactis*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。
- [請求項14] *Streptococcus thermophilus*の培養物であって、69 mg/kg以上の*Streptococcus thermophilus*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。
- [請求項15] *Bifidobacterium breve*の培養物であって、4.2 mg/kg以上の*Bifidobacterium breve*が産生した菌体外多糖を含む培養物、及びそれを含む組成物。
- [請求項16] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌を含む、1又は2以上の乳酸産生菌で原料乳を発酵させ、菌体外多糖を含む

発酵乳を得る工程を含む、発酵乳の製造方法。

[請求項17] 菌体外多糖を産生させる工程が、4～72時間行われる、請求項16に記載の製造方法。

[請求項18] 菌体外多糖を産生させる工程が、10%長い誘導期を含む、請求項16に記載の製造方法。

[請求項19] 誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*L. delbrueckii ssp. bulgaricus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、30 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Lactococcus lactis*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、2.2 mg/kg以上である；

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、69 mg/kg以上である；又は

誘導期が10%以上長くなるように処理した菌体外多糖生産菌が、*Bifidobacterium breve*に属する菌を含み、発酵工程後の発酵乳の菌体外多糖の含有量が、4.2 mg/kg以上である、請求項16に記載の製造方法。

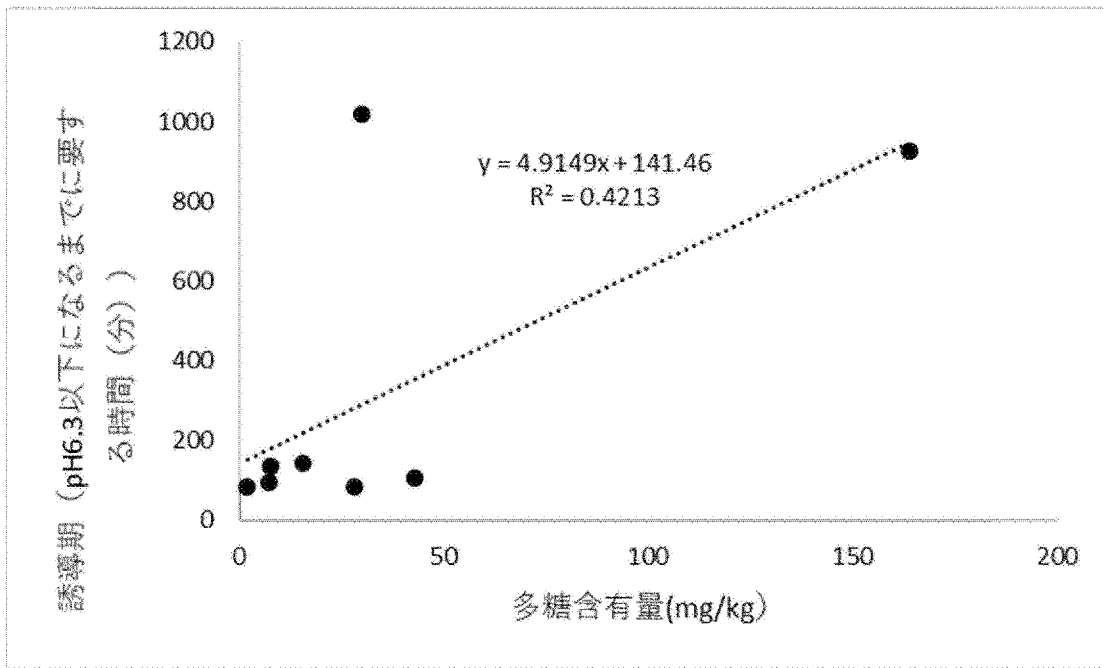
[請求項20] 乳酸産生菌が、*Streptococcus thermophilus*に属する菌をさらに含む、請求項16に記載の製造方法。

[請求項21] 乳酸産生菌が、*L. bulgaricus*に属する菌をさらに含む、請求項16から20のいずれか1項に記載の製造方法。

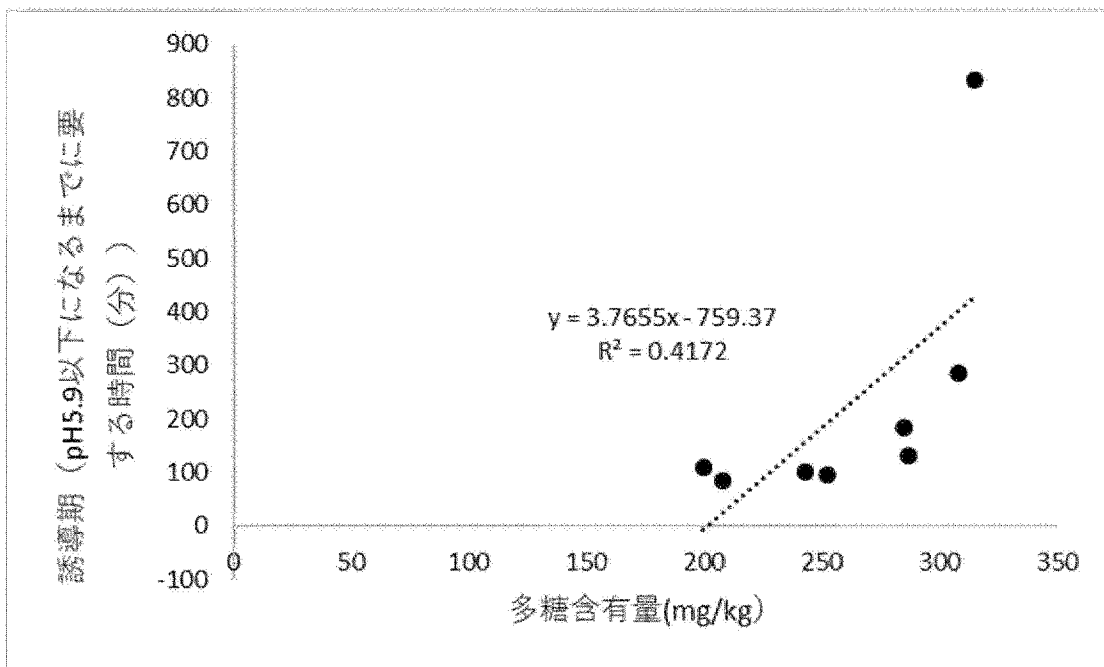
[請求項22] 誘導期を長くする条件で処理することを含む、菌体外多糖生産菌の菌体外多糖の産生能を向上する方法。

[請求項23] 誘導期を長くする条件での処理が、熱処理、浸透圧処理、及びpH処理からなる群より選択されるいずれかの処理を含む、請求項1又は16に記載の製造方法、又は請求項22に記載の方法。

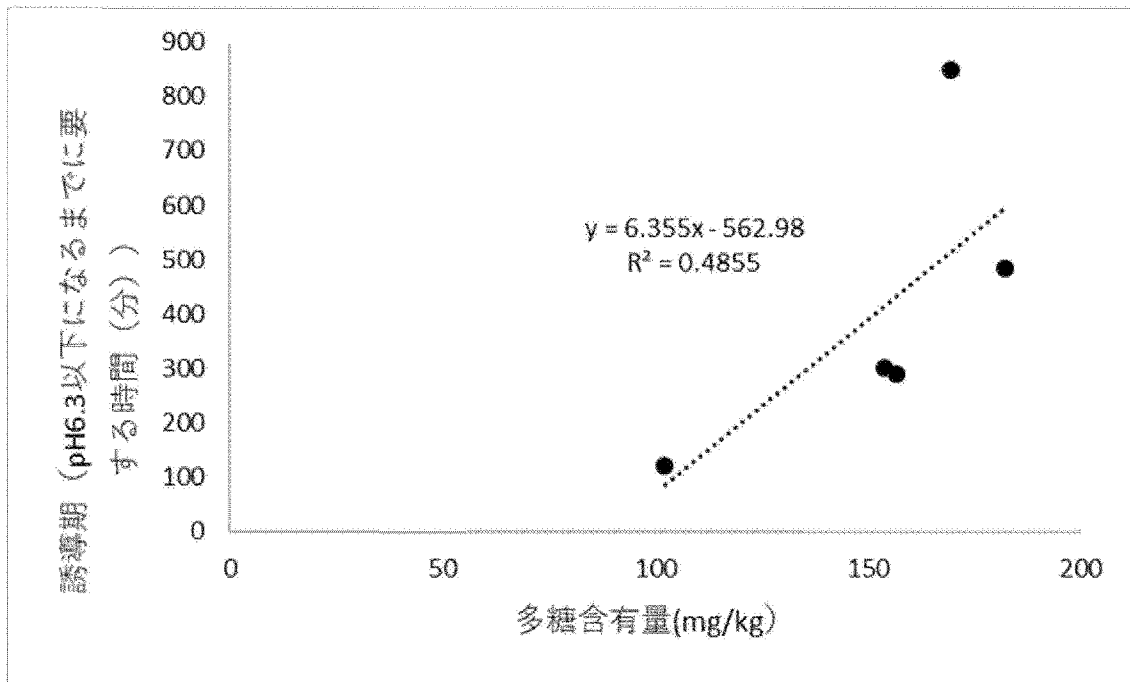
[図1]



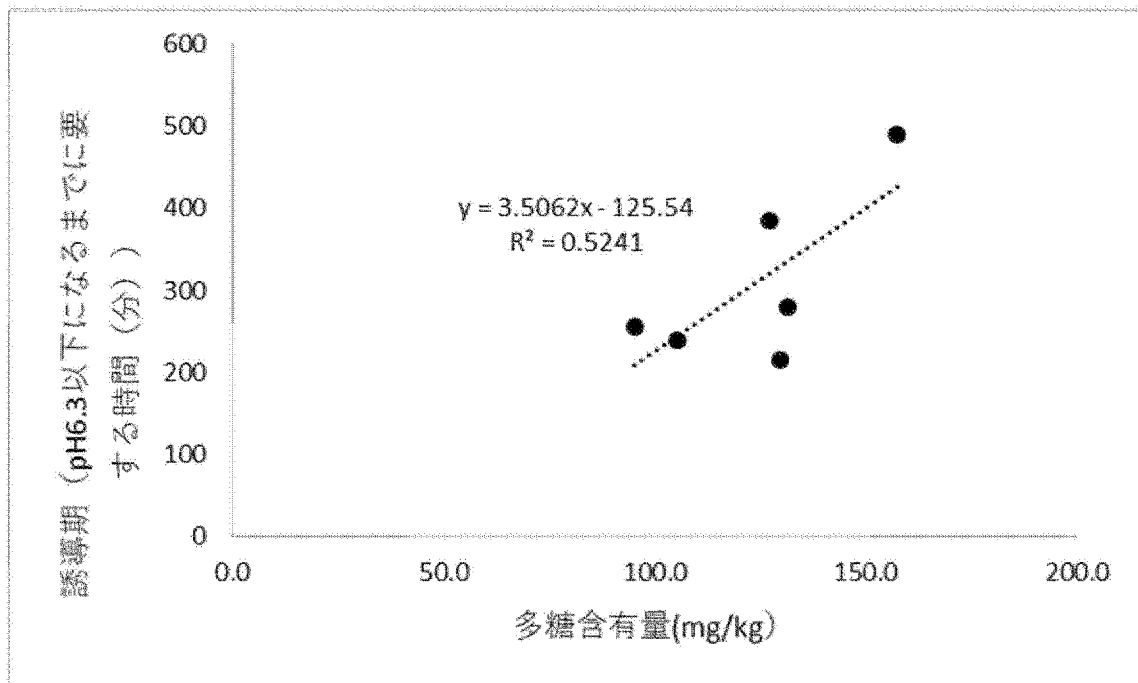
[図2]



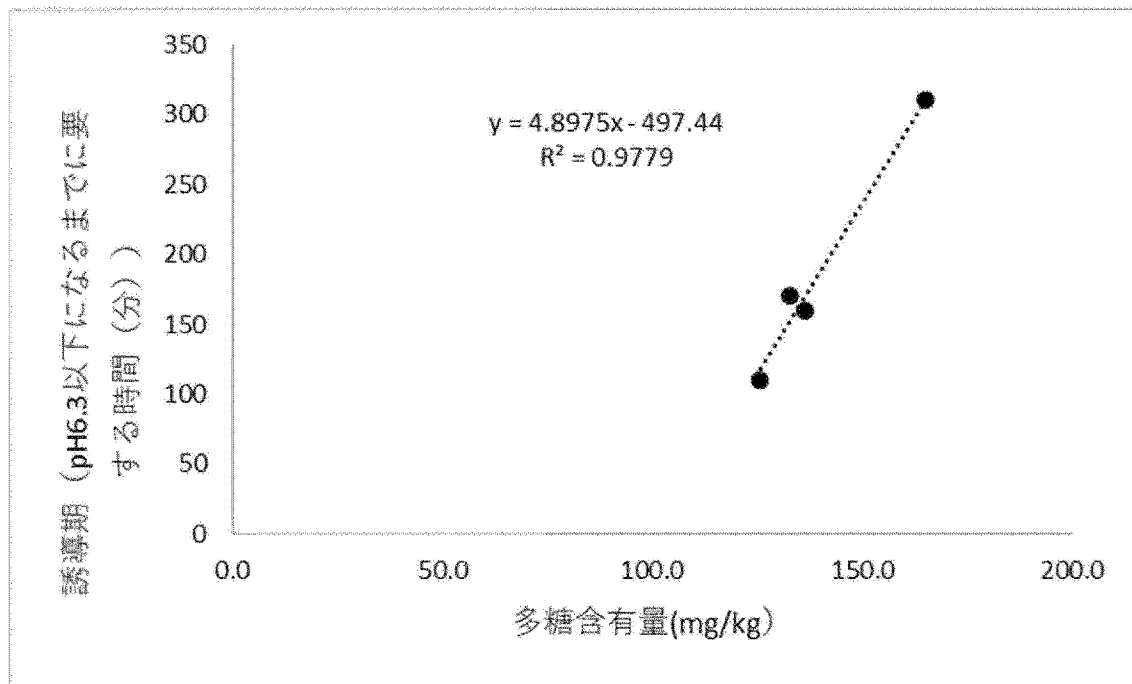
[図3]



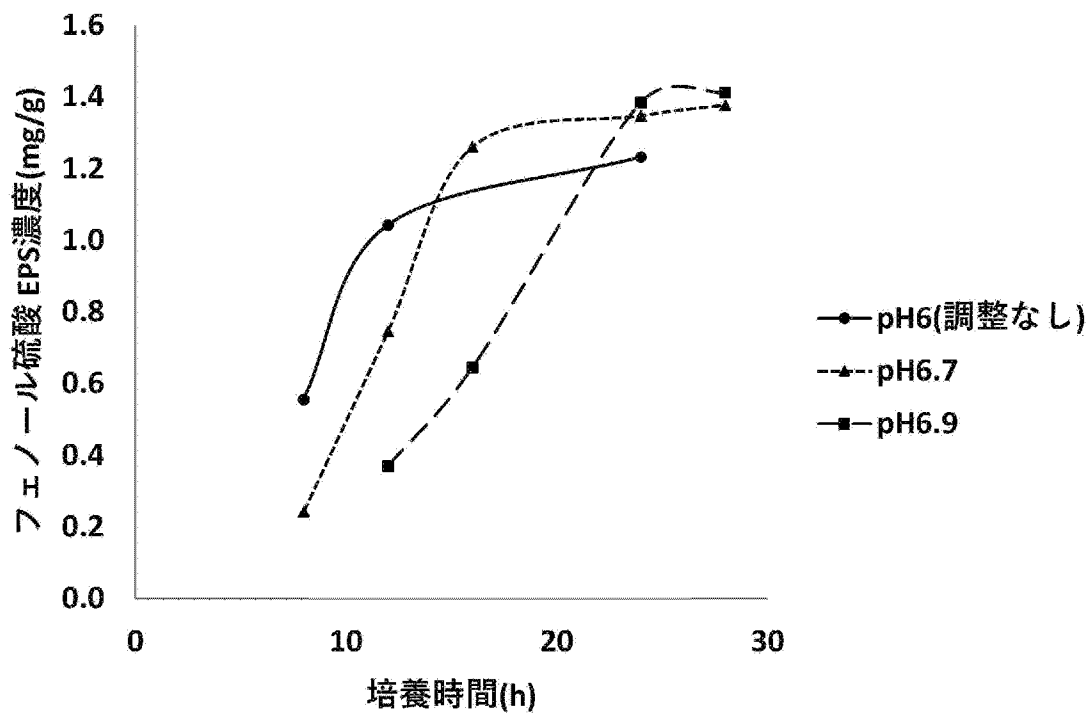
[図4]



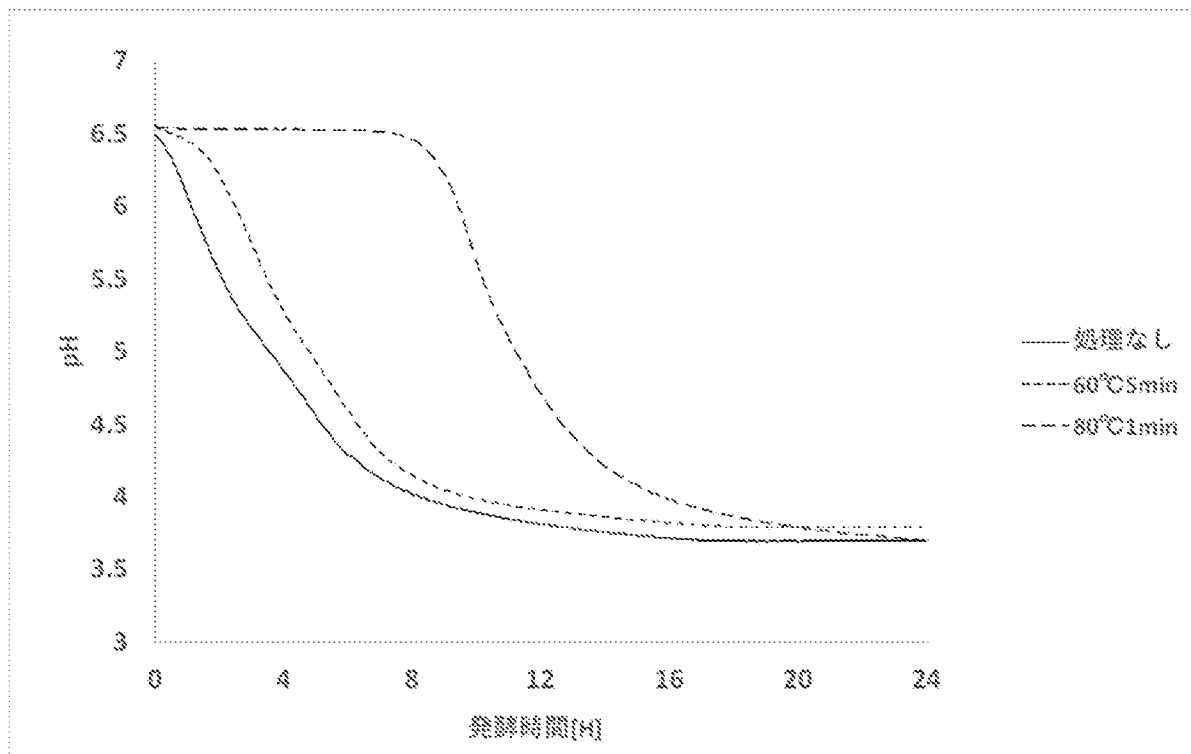
[図5]



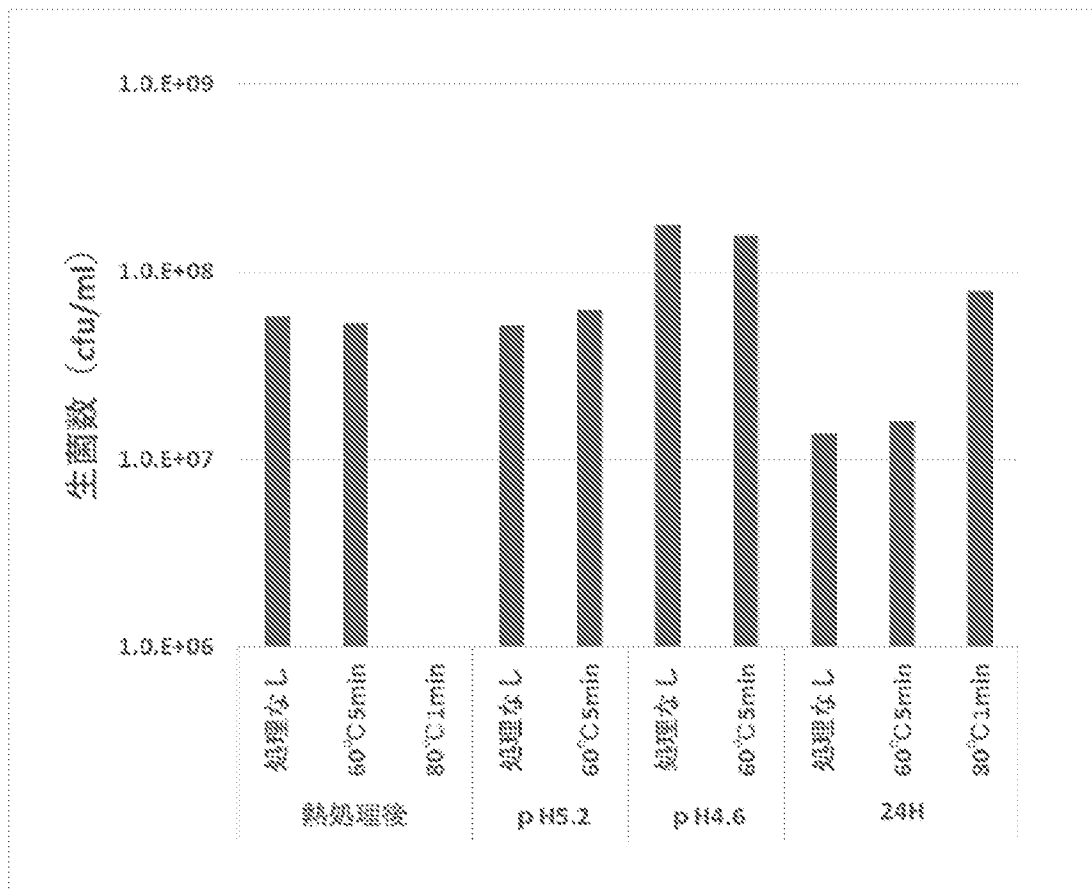
[図6]



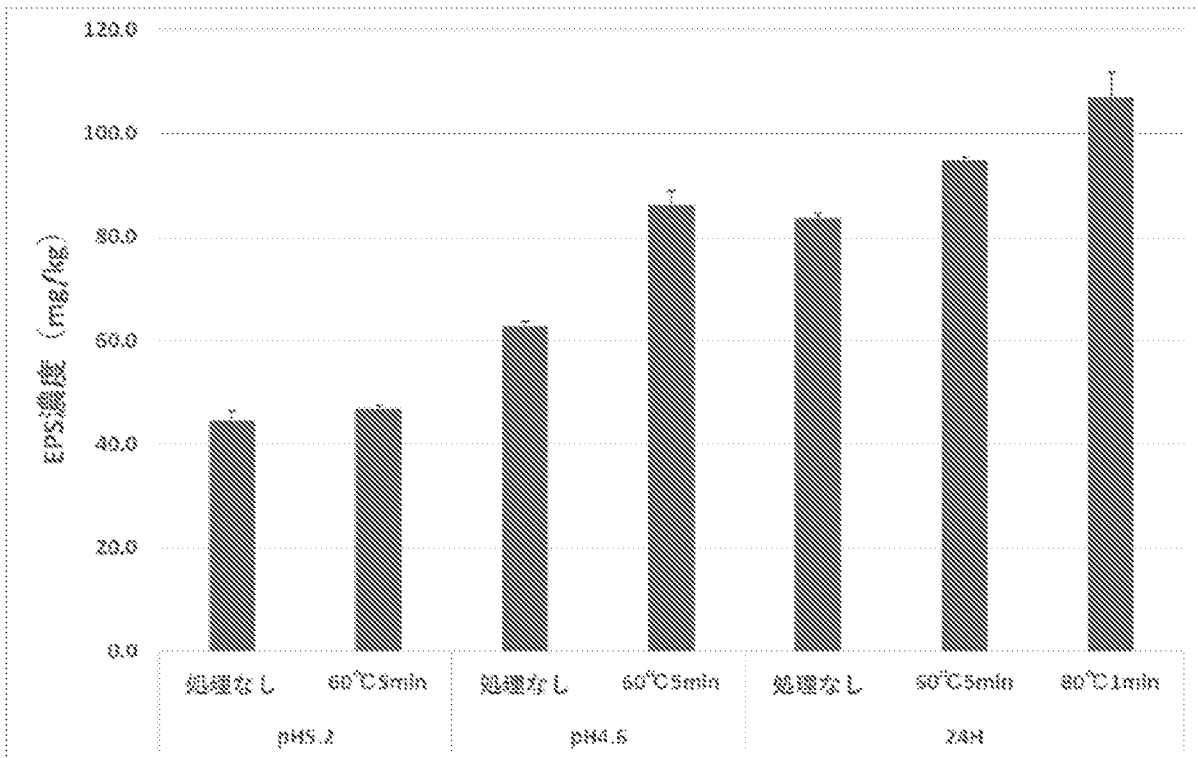
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 19/04</i> (2006.01)i; <i>A23C 9/123</i> (2006.01)i; <i>A23L 29/269</i> (2016.01)i; <i>C12N 1/20</i> (2006.01)i FI: C12P19/04 C; C12N1/20 A; A23C9/123; A23L29/269		
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) C12P19/00-19/64; C12N1/20; A23C9/00-9/20; A23L29/269		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/132418 A1 (MEIJI CO., LTD.) 01 July 2021 (2021-07-01) test example 9, fig. 1, claim 8	1-12, 16-19, 21-23
X	JP 2014-027925 A (MEIJI CO., LTD.) 13 February 2014 (2014-02-13) paragraphs [0013], [0017], [0023]	1-11, 13, 16-19, 21-23
X	NGUYEN, PT., et al., Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications, AIMS MICROBIOLOGY, 17 November 2020, vol. 6, no. 4, pp. 451-469 p. 452, "1. Introduction," first, second paragraphs, p. 454, "3. The role of EPSs for LAB stress resistance," second paragraph, p. 458, first paragraph, p. 458, last paragraph to p. 459, first paragraph, p. 459, "5.3. Co-cultivation," first paragraph, p. 460, first paragraph, fig. 3, 5	1-12, 14, 16-23
X	PRASANNA, P. H. P., et al., Screening human intestinal Bifidobacterium strains for growth, acidification, EPS production and viscosity potential in low-fat milk, INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, 2012, vol. 23, pp. 36-44 table 2, p. 37, "2.2. Preparation of fermented milk"	1-6, 8-11, 15-19, 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 08 August 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020804

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2020-115783 A (MEIJI CO., LTD.) 06 August 2020 (2020-08-06) claim 1, paragraph [0028]	8-12, 14
X	DE VUYST, L., et al., Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis, JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 1998, vol. 84, pp. 1059-1068 particularly tables 2-5	8-11, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/020804

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/132418	A1	01 July 2021	EP 4083187 A1 test example 9, fig. 1, claim 8	
				US 2023/0052298 A1	
				CN 115135748 A	
JP	2014-027925	A	13 February 2014	(Family: none)	
JP	2020-115783	A	06 August 2020	CN 111466439 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 19/04(2006.01)i; A23C 9/123(2006.01)i; A23L 29/269(2016.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: C12P19/04 C; C12N1/20 A; A23C9/123; A23L29/269		
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（IPC）） C12P19/00-19/64; C12N1/20; A23C9/00-9/20; A23L29/269 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024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） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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	WO 2021/132418 A1 (株式会社明治) 01.07.2021 (2021-07-01) 試験例9, 図1, 請求項8	1-12, 16-19, 21-23
X	JP 2014-027925 A (株式会社明治) 13.02.2014 (2014-02-13) [0013], [0017], [0023]	1-11, 13, 16-19, 21-23
X	NGUYEN Phu-Tho, et al., Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications, AIMS MICROBIOLOGY, 2020.11.17, Vol. 6, No. 4, pp. 451-469 p. 452 「1. Introduction」 第1及び第2段落, p. 454 「3.The role of EPSs for LAB stress resistance」 第2段落, p. 458 第1段落, p. 458 最終段落 - p. 459 第1段落, p. 459 「5.3. Co-cultivation」 第1段落, p. 460 第1段落, Figs. 3及び5	1-12, 14, 16-23
X	PRASANNA P.H.P., et al., Screening human intestinal Bifidobacterium strains for growth, acidification, EPS production and viscosity potential in low-fat milk, INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, 2012, Vol. 23, pp. 36-44 Table 2, p. 37 「2.2. Preparation of fermented milk」	1-6, 8-11, 15-19, 22
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵触するものではなく、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	08.08.2024	国際調査報告の発送日 20.08.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 鈴木 崇之 4N 4152 電話番号 03-3581-1101 内線 3891	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	JP 2020-115783 A (株式会社明治) 06.08.2020 (2020 - 08 - 06) 請求項1, [0028]	8-12, 14
X	VUYST L. De, et al., Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis, JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 1998, Vol. 84, pp. 1059-1068 特にTables 2-5	8-11, 14

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/020804

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/132418 A1	01.07.2021	EP 4083187 A1 Test Example 9, Fig. 1, Claim 8 US 2023/0052298 A1 CN 115135748 A	
JP 2014-027925 A	13.02.2014	(ファミリーなし)	
JP 2020-115783 A	06.08.2020	CN 111466439 A	