

明 細 書

発明の名称： 乳酸菌生菌含有酸性乳飲料

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌の生残性が改善された乳酸菌生菌含有酸性乳飲料に関する。

背景技術

[0002] 乳酸菌は、腸内フローラの改善、便性の改善、腸管機能の改善、感染防御、免疫賦活、ガン予防等種々の効果を有するため、医薬品としての乳酸菌製剤の製造や発酵乳、乳酸菌飲料、チーズ等の飲食品に利用されている。これらに利用される際、乳酸菌の培養は、獣乳を培地として行われる場合が最も多い。しかしながら、一般に乳酸菌は、その種類によって栄養の要求性が異なるため、獣乳のみからなる培地ではあまり増殖せず、比較的増殖活性に優れた菌株であっても、獣乳のみからなる培地では、発酵乳や乳酸菌飲料等の製造に当たって十分な酸度の発酵物を得るために、数日間の培養を行わなければならないとされている。

[0003] このような、長時間にわたる乳酸菌の培養は、生菌数の低下を招く原因となることから、種々の生理効果を期待する生菌数を重視した乳酸菌飲料や発酵乳等の製造のための培養としては必ずしも好ましい方法とはいえなかった。また、乳酸菌を培養して得られる発酵物の風味を問題とする各種飲食品の製造のためには、増殖性の観点のみから使用菌株を選定することはできないため、増殖性が悪くても風味の良い発酵物を与える乳酸菌を選択し、使用する場合もある。

[0004] そこで、乳酸菌の培養においては、培養効率を向上させる目的で種々の増殖促進物質を培地に添加しておくことが常法である。一般に、増殖促進物質として有効とされているものを例示すれば、クロレラエキス、鉄塩、ビタミン類、アミノ酸やペプチドを含有するタンパク分解物、酵母エキス等を挙げることができる。本出願人も、乳酸菌の培養において増殖性や生残性を高め

るために甜茶の抽出物やその処理物を添加する技術を報告している（特許文献1～3）。

- [0005] ところで、上記のような乳酸菌の培養物を利用した酸性乳飲料には、大豆多糖類が増粘剤（安定剤）として使用されている。しかし、近年では種々の飲食品においてもアレルギーフリーが浸透してきていて、酸性乳飲料についても例外ではない。そのため酸性乳飲料についても、大豆のアレルギーフリー化をするために大豆由来のものを使用しないことが望まれている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特許第4 7 3 9 3 3 5号公報
特許文献2：特許第5 9 2 3 3 6 0号公報
特許文献3：特許第6 6 3 3 8 3 3号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 従って、本発明は乳酸菌生菌含有酸性乳飲料であって、大豆のアレルギーフリーかつ乳酸菌の生残性が改善された乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料にエンドウ多糖類の特定の処理物を使用することにより、大豆のアレルギーフリー化だけでなく、乳酸菌の生残性が改善されることを見出し、本発明を完成させた。
- [0009] すなわち、本発明は、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有することを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳飲料である。
- [0010] また、本発明は、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を有効成分とすることを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳

飲料における乳酸菌生菌の生残性改善剤である。

- [0011] 更に、本発明は、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料に、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有させることを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳飲料における乳酸菌生菌の生残性改善方法である。

発明の効果

- [0012] 本発明の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料は、大豆のアレルゲンフリー化だけでなく、乳酸菌の生残性が改善されたものであるから、日常的に安心して飲用することができるため、乳酸菌の種々の効能を得ることができる。

発明を実施するための形態

- [0013] 本発明の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料（以下、単に「本発明飲料」という）は、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有するものである。なお、本発明飲料は、乳酸菌を生菌状態で含有する酸性乳飲料（いわゆる生菌タイプの酸性乳飲料）であり、殺菌等の処理により、乳酸菌を死菌状態のみで含有する酸性乳飲料（いわゆる死菌タイプの酸性乳飲料）ではない。
- [0014] 上記で使用されるエンドウ多糖類は、エンドウ（エンドウ豆）に含まれる蛋白質画分並びに澱粉画分を除去した繊維画分を原料として抽出するのが好ましい。抽出時のpHはpH3未満の酸性条件下では多糖類の加水分解が促進され、pH12よりアルカリ側では多糖類の脱離分解が促進されるため、pH3からpH12が適切であり、pH4からpH10が好ましい。原料に加水したのち、酸或いはアルカリを添加してpH3からpH12の範囲に調整後、好ましくは60℃以上150℃以下、更に好ましくは80℃以上130℃以下の温度でエンドウ多糖類を抽出する。60℃未満の温度では、エンドウ多糖類の抽出効率が悪く現実性が低い。150℃を超える温度では、抽出の過程でエンドウ多糖類が加水分解してしまう場合がある。抽出時間は概ね0.5～3時間であるが、原料の状態や温度等により、任意に調整することができる。使用する酸とアルカリに特に制限は無い。塩酸、硫酸、磷酸、

クエン酸、酒石酸、酢酸、蟻酸等の酸、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、アンモニア等のアルカリを使用することが出来る。また、エンドウ多糖類が加水分解されない高純度のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼを単独乃至併用して抽出しても構わない。

[0015] 抽出したエンドウ多糖類は、不溶性繊維分を分離した後、後述のエステル分解処理を施す。そのまま乾燥することもできるが、より機能を発揮させるために蛋白質の除去、脱塩、色素成分除去等の精製を行なうことが望ましい。蛋白質の除去方法としては、pH調整により蛋白質を凝集させ、圧濾分離、遠心分離、膜分離等の物理的分離手段により除去することが出来る。また、任意の蛋白質分解酵素を用いて蛋白質を分解し、分解物を透析膜、活性炭、イオン交換や疎水性樹脂を用いて吸着除去することが出来る。脱塩の方法としては、電気透析やイオン交換樹脂など、これらを除去する方法であれば何れの方法も利用できる。色素成分の除去方法としては、オゾン処理やUV照射などの色素成分を分解する方法など何れの方法も利用できる。これら1法又は2法以上を組み合わせる用いることが好ましい。精製処理を施したエンドウ多糖類は、任意の殺菌処理を施し、凍結乾燥、噴霧乾燥、エタノール沈殿物の熱風乾燥などの方法にて乾燥物を得る。後述する限外濾過膜処理またはエタノール沈殿処理を行う際は、精製処理の後に各処理を行ってから上述の方法で乾燥物を得ても良い。

[0016] エンドウ多糖類の原料に澱粉が含まれている場合、そのままの状態でもエンドウ多糖類を得ることは可能であるが、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料に使用した場合、澱粉が原因となり沈殿を生じる場合がある。従って、原料の段階、原料から分離した繊維質の段階、エンドウ多糖類を抽出する段階、乃至抽出した後の段階で澱粉を除去することが好ましい。澱粉は、アミラーゼによる分解、冷却沈殿、乳化剤との凝集沈殿の方法を1種若しくは2種以上を組み合わせる除去することができる。原料の段階であれば乾式分画も可能であるが湿式分画が好適であり、破碎した原料に加水し、澱粉が糊化しない温度

まで加温、遠心濾過により澱粉粒として分離することが出来る。また、加水した原料を澱粉が糊化する温度以上に加熱し、アミラーゼで処理することにより分解除去することも出来る。エンドウ多糖類の原料から分離した繊維質の段階であれば、繊維質を水に分散し、澱粉が糊化する温度まで加温、アミラーゼで処理することにより、分解除去することができる。エンドウ多糖類を抽出する過程、乃至抽出した後に除澱粉する方法としては、抽出前の加水原料にアミラーゼを添加する方法、抽出し固液分離する前のスラリーにアミラーゼを添加する方法、固液分離後の濾液にアミラーゼを添加する方法が例示できる。

[0017] アミラーゼは澱粉を加水分解する酵素の総称であり、 β -アミラーゼ、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラナーゼが例示される。本目的ではこれら高純度のアミラーゼでも構わないが、これらが1種或いは2種以上が混在する市販のアミラーゼ製剤で構わない。尚、澱粉は酸加水分解などの化学的手法により原料、繊維質、或いはエンドウ多糖類抽出前後で分解除去することも可能であるが、同時にこのエンドウ多糖類が分解されるため、酵素処理による除澱粉処理が好ましい。

[0018] 上記したエンドウ多糖類は、メチルエステル化度を好ましくは45%以下、より好ましくは30%以下にする工程を経ることで、蛋白質を分散する機能がより良好となる。メチルエステルの除去方法は、エンドウ多糖類の糖鎖分解が抑えられエステルを分解できる方法であれば何れの方法でも構わない。抽出後のエンドウ多糖類に対して処理をする場合は、1質量%~5質量%エンドウ多糖水溶液に任意のアルカリを添加して好ましくはpH8以上、より好ましくはpH12以上に調整することでエステル分解が可能である。加熱条件としては好ましくは20℃以上、より好ましくは40℃以上であり、加熱時間は好ましくは10分間以上、より好ましくは30分間以上であり、且つ4時間以下が好ましい。抽出時pHをアルカリ側とすることで、抽出とエステル分解を同時に行うこともできる。また、市販のペクチンメチルエステラーゼや当該酵素を含む市販酵素製剤を用いてエステル分解をすることも

できる。尚、エステル分解は、エンドウ多糖類を調製する何れの段階でも処理することが可能である。抽出前の原料、抽出後のスラリー、固液分離したエンドウ多糖類溶液、精製処理液、乾燥後の粉末へのアンモニア処理などが例示できる。尚、アルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、アンモニア等の何れのものも使用可能である。また、メチルエステル化度は、D o e s b u r g 滴定法にてガラクトツロン酸量とメチルエステル化ガラクトツロン酸を定量して算出する。

[0019] [数1]

メチルエステル化度＝メチルエステル化ガラクトツロン酸÷全ガラクトツロン酸×100(%)

[0020] 上記したエンドウ多糖類は、構成するガラクトツロン酸のメチルエステル化度が好ましくは45%以下、より好ましくは30%以下である。

[0021] 上記したエンドウ多糖類に限外濾過膜処理を行い限外濾過膜処理物を得る。この限外濾過膜処理は、特に限定されないが、例えば、分画分子量が1～150kDa、好ましくは3～100kDaの限外濾過膜を用いて行えばよい。

[0022] また、上記したエンドウ多糖類にエタノール沈殿処理を行いエタノール沈殿処理物を得る。エタノール沈殿処理は、特に限定されないが、例えば、50～100質量%、好ましくは60～100質量%のエタノール水溶液を、エンドウ多糖類に対して、40～95質量%、好ましくは50～95質量%で添加して、0～100℃、好ましくは10～80℃で、1分～3時間で沈殿させ、その後濾過、遠心分離等を行えば良い。

[0023] 本発明飲料に使用される好ましいエンドウ多糖類の限外濾過膜処理またはエタノール沈殿物としては、特許第6131853号公報に記載のエンドウの種子または、該エンドウ種子に含まれる蛋白質画分並びに澱粉画分を除去した繊維画分を原料に、pH3からpH12の水系で構成糖としてアラビノース、ガラクトース、グルコース、ラムノース、キシロース、フコース、及びガラクトツロン酸を含み、更にメチルエステル化度を好ましくは45%以下になるように分解されたものである。これらは当該特許公報に記載のエンド

ウペクチン A、G、H、J、K に該当する。

[0024] 本発明飲料においては、限外濾過膜処理物およびエタノール沈殿処理物のうち、限外濾過膜処理物を使用することが安全性等の点から好ましい。

[0025] 本発明飲料における、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物の含有量は特に限定されないが、例えば、0.05～2.0質量%、好ましくは0.1～1.0質量%、より好ましくは0.25～0.50質量%である。

[0026] 本発明飲料は、乳酸菌を培地で培養して得られる乳酸菌の生菌を含有する酸性乳飲料である。乳酸菌の生菌数は特に限定されないが、例えば、 1.0×10^7 cfu/ml 以上、好ましくは 1.0×10^8 cfu/ml 以上である。本発明飲料は、特に乳酸菌の生菌数が 1.0×10^9 cfu/ml 以上であるいわゆる高菌数タイプのものに好適である。

[0027] 乳酸菌を培養する培地としては、特に限定されないが、例えば、牛乳、山羊乳、馬乳、羊乳等の生乳や、脱脂粉乳、全粉乳、生クリーム等の乳製品等からなる獣乳培地や、植物由来の液状乳、各種合成培地を挙げることができる。そして、この培地は、通常の乳酸菌を培養する培地に使用される成分を添加したものであってもよい。このような成分としては、例えば、ビタミン A、ビタミン B 類、ビタミン C、ビタミン E 等のビタミン類や、各種ペプチド、アミノ酸類、カルシウム、マグネシウム等の塩類が挙げられる。

[0028] また、上記培地には、特許文献 1～3 に記載の甜茶抽出物やその処理物等の公知の培養助剤を含有させてもよい。

[0029] 乳酸菌としては、上記培地で培養できるものであれば特に限定されないが、例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ (*Lactocaseibacillus paracasei*)、ラクチカゼイバチルス・カゼイ (*Lactocaseibacillus casei*) 等のラクチカゼイバチルス属細菌、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・デルブルッキアー サブスピーシーズ、ブルガリカス (*Lactobacillus*

delbrueckii subsp. bulgaricus)、ラクトバチルス・デルブルッキイー サブスピーシーズ、デルブルッキイー (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. delbrueckii)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、等のラクトバチルス属細菌、リジラクトバチルス・サリバリウス (*Ligilactobacillus salivarius*) 等のリジラクトバチルス属細菌、リモシラクトバチルス・ファーマンタム (*Limosilactobacillus fermentum*) 等のリモシラクトバチルス属細菌、リコリラクトバチルス・マリ (*Liquorilactobacillus mali*) 等のリコリラクトバチルス属細菌、ラクチプランチバチルス・プランタルム (*Lactiplantibacillus plantarum*) 等のラクチプランチバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. lactis)、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. cremoris)、ラクトコッカス・プランタルム (*Lactococcus plantarum*)、ラクトコッカス・ラフィノラクチス (*Lactococcus raffinolactis*)、ラクトコッカス・クレモリス (*Lactococcus cremoris*) 等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 等のエンテロコッカス属細菌を挙げることができ、これらの乳酸菌を1種または2種以上用いることができる。これらの中でもラクチカゼイバチルス属細菌が好ましく、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイがより好ましく、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT 9029 (FERM BP-1366) が特に好ましい。

[0030] 本発明において、培養に用いられる乳酸菌としては、上記のように一般的に乳酸菌と呼ばれるものの他に、嫌気性菌であるビフィドバクテリウム属に属する細菌も含まれる。このようなビフィドバクテリウム属に属する細菌としては、特に限定されず、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) 等が好ましい。

acterium bifidum)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・カテヌラータム (*Bifidobacterium catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・アングラータム (*Bifidobacterium angulatum*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・ラクチス (*Bifidobacterium lactis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*) 等を挙げることができる。これらの中でもビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ等が好ましく、特にビフィドバクテリウム・ビフィダムがより好ましい。ビフィドバクテリウム・ビフィダムとしては、例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダム Y I T 1 0 3 4 7 (FERM B P - 1 0 6 1 3、寄託日：2 0 0 5 年 6 月 2 3 日) 等が例示される。

[0031] なお、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ Y I T 9 0 2 9 は以前の分類ではラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) とされていたが、近年ラクトバチルス属の再分類がなされ、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイに分類された (Zheng et al., 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020 Apr; 70(4):2782-2858 DOI 10.1099/ijsem.0.004107)。このラクトバチルス・カゼイ Y I T 9 0 2 9 は、ラクトバチルス・カゼイ Y I T 9 0 2 9 (FERM B P - 1 3 6 6、受託日：昭和 5 6 年 5 月 1 日) として、ブダペスト条約の国際寄託当局である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（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 1 2 0 号室）に国際寄託されている。

[0032] 乳酸菌を培地で培養する条件は、特に限定されないが、例えば、培地に乳酸菌を、培地中の菌数が $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^9$ c f u / m l 程度とな

るように接種し、これを30～40℃程度の温度で1～7日間程度培養する条件が挙げられる。また、このときの培養条件としては、静置、攪拌、振盪、通気等から用いる乳酸菌の培養に適した方法を適宜選択して行えばよい。

[0033] 本発明飲料のpHは特に限定されないが、酸性乳飲料としての風味や安定性の点からpHを4.2以下に調整することがより好ましく、3.0～4.0に調整することが特に好ましい。このpHの調整には、一般に食品に用いられる有機酸を用いればよい。このような有機酸としては、例えば、リンゴ酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。これら有機酸は1種または2種以上を用いることができるが、リンゴ酸、クエン酸または酒石酸から選ばれる1種または2種以上を用いることが好ましい。

[0034] 本発明飲料の無脂乳固形分は特に限定されないが、酸性乳飲料としての風味や安定性の点から無脂乳固形分を4.0質量%以下、3.0～4.0質量%にすることが好ましい。無脂乳固形分の調整は脱脂粉乳の使用量を調節して行うことができる。

[0035] 本発明飲料には、更に、ショ糖、ブドウ糖、果糖、高甘味度甘味料等の糖類、香料、乳化剤、ビタミン類等を含有させてもよい。

[0036] また、本発明飲料には、本発明の効果を損なわない限り、更に、ペクチン、スクシノグリカン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ジェランガム等の増粘剤（安定剤）を含有させてもよい。なお、当然ながら大豆を原料とする増粘剤（安定剤）は含有させない。

[0037] 本発明飲料は、乳酸菌を培地で培養して得られる乳酸菌の生菌を含有する酸性乳飲料にエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有させることにより製造することができる。エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物の添加時期は特に限定されず、公知の増粘剤（安定剤）と同様の添加時期でよいが、例えば、乳酸菌を培地で培養した後に、糖類、香料、乳化剤、ビタミン類等と共に添加することが好ましい。

[0038] 斯くして得られる本発明飲料は、大豆のアレルゲンフリーの酸性乳飲料で

あって、乳酸菌の生残性が改善されたものとなる。ここで乳酸菌の生残性が改善されたとは、長期間（28日以上）保存時における生残率が、同等の安定性が得られる大豆多糖類を安定剤として使用した場合の生残率と比較して90%以上であることをいう。なお、乳酸菌の菌数を測定する際に、測定上の誤差等や初発の菌数によっては、保存前よりも保存後の方が増殖する場合があるが、その場合でも本発明では前記と同様に、同等の安定性を得るために大豆多糖類を安定剤として使用した場合の生残率と比較することで、生残性の改善を確認することとする。このようにエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物は、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料における乳酸菌の生残性を改善することができる。

実施例

[0039] 以下、本発明の実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

[0040] 製 造 例 1

エンドウ多糖類（未処理物）の調製：

エンドウの種子（Yellow Peas）50kgを脱皮した後、5倍量の水を加えて24時間浸漬した。ホモミキサー（5,000rpm、30分間）にて種子を砕き、蛋白質と澱粉を抽出した。遠心濾過機を用いて1,500×g、20分間で水に分散している蛋白質や澱粉などの成分を除去し、繊維質を回収した。更に、繊維質に5倍量の水を加えてホモミキサー（3,000rpm、30分間）で攪拌し、遠心濾過（1,500×g、20分間）により繊維質を回収した。この操作を2回繰り返し、凍結乾燥して10kgのエンドウ繊維を得た。エンドウ繊維80部を920部の水に分散し、塩酸を用いてpHを5に調整した後、120℃にて90分間加熱してエンドウ多糖類を抽出した。不溶性繊維を遠心分離（5,000rpm、30分間）にて除去して上清を回収した。この上清を40℃に加温し、アルカリにてpH12に調製し、60分間保持して脱メチルエステル処理を施した。塩酸を加えてpH7に調整し、60℃に加温した後、固形分の0.1重量%に相

当するアミラーゼ（BAN480L ノボザイム）を添加して1時間澱粉を分解した。澱粉を分解した液に塩酸を加えてpH5に調整し、遠心分離（5,000rpm、30分間）にて不溶性成分を除去して上清を回収し、脱塩処理した後、凍結乾燥してエンドウ多糖類（未処理物）（水分：2.4質量%、粗タンパク質：3.5質量%、炭水化物：88.4質量%、灰分：5.7質量%、メチルエステル化度：15.0%）を得た。

[0041] このエンドウ多糖類の分子量1万以上の高分子成分の絶対分子量を静的光散乱（HPLC-MALLS）にて測定した。HPLCのゲル濾過クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

[0042] エンドウ多糖類の1重量%水溶液（50mM酢酸ナトリウム水溶液、pH5.0）を調製し、0.8 μ mのフィルターにて濾過した濾液を分析に供した。予め、50mM酢酸ナトリウム水溶液、pH5.0、40℃で平衡化したTSK-gel G-6000PWXLカラム（東ソー； ϕ 7.8mm $\times$ 300mm）に20 μ L添加し、流速：1.0mL/minで分離した。分離した多糖類は、示差屈折検出器（RI検出器）にて検出し、分子量は標準プルランP-82（昭和電工）より算出した。その結果、平均絶対分子量が85万であった。

[0043] 製造例 2

エンドウ多糖類（未処理物）の調製：

製造例1と同様の方法で、エンドウ多糖類（未処理物）（水分：1.8質量%、粗タンパク質：6.2質量%、炭水化物：88.5質量%、灰分：3.5質量%、メチルエステル化度：14.8%）を得た。

[0044] 製造例 3

エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）の調製：

製造例1と同様にアミラーゼで澱粉を分解後、塩酸にてpH5に調整し、遠心分離（5,000rpm、30分間）にて不溶性成分を除去して上清を回収し、分画分子量が30kDaの限外濾過膜で処理し、凍結乾燥してエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）（水分：3.2質量%、粗

タンパク質：3.9質量%、炭水化物：87.3質量%、灰分：5.6質量%、メチルエステル化度：15.0%）を得た。

[0045] 製造例 4

エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）の調製：

製造例3と同様の方法でエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）（水分：4.8質量%、粗タンパク質：5.1質量%、炭水化物：81.1質量%、灰分：9.0質量%、メチルエステル化度：14.8%）を得た。

[0046] 製造例 5

エンドウ多糖類のエタノール沈殿処理物の調製：

製造例1と同様にアミラーゼで澱粉を分解後、塩酸にてpH5に調整し、遠心分離して不溶性の成分を除去した上清を、エタノール濃度が60重量%になるように90重量%のエタノールを加えてエンドウ多糖類を沈殿させ、90重量%の含水エタノールで洗浄し、得られた沈殿を風乾してエンドウ多糖類のエタノール沈殿処理物（水分：8.1質量%、粗タンパク質：6.6質量%、炭水化物：80.7質量%、灰分：4.6質量%、メチルエステル化度：14.8%）を得た。

[0047] 実施例 1

乳酸菌生菌含有酸性乳飲料（高菌数タイプ）の調製： 15質量%脱脂粉乳培地（1.8質量%のグルコースおよび3.0質量%のフルクトースを含む）に、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（YIT 9029株）のスターターを0.5%（生菌数： 5.0×10^6 c f u / m l）接種し、37℃でpHが3.6となるまで培養を行い酸性原料乳を得た。次いで、製造例1で調製したエンドウ多糖類（未処理物）または製造例3で調製したエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）をそれぞれ含有するシロップ（12質量%の砂糖を含む）を別途調製した。酸性原料乳24重量部とシロップ76重量部を混合した混合物を15MPaで均質化処理し、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。これらの酸性乳飲料の無脂乳固形分は3.7質量%であ

り、製造直後（保存0日目）のpHおよび多糖類の含有量は表1に記載の通りである。また、比較として従来大豆多糖類（三栄源エフエフアイ製）を用いて同様の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。

[0048] なお、上記で使用したラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（YIT 9029株）は、以前の分類ではラクトバチルス・カゼイ（YIT 9029株）である。

[0049] これらの乳酸菌生菌含有酸性乳飲料について、10℃で30日まで保存後、ホエイオフの量（飲料上部に生じる透明な層の高さ（mm））および沈殿量（容器底部の沈殿の重量÷内容物全体の重量×100（%））を測定した。ホエイオフの量は、容器に入った状態で直接測定した。また、沈殿量を目視で以下の基準により判定した。更に、生菌数、pH、滴定酸度を公知の方法で測定した。また更に、生残率を以下のようにして算出した。これらの結果を表1に示した。

[0050] <沈殿量評価基準>

（評価） （内容）

- ＋ ： 容器底部の全面に沈殿あり
- ± ： 容器底部のまわりに沈殿あり
- － ： 容器底部に沈殿なし

<生残率>

測定した生菌数から下記式により生残率を求めた。

[数2]

$$\text{生残率} = \left(\frac{\text{10℃における保存最終日の生菌数}}{\text{製造直後（保存0日目）の生菌数}} \right) \times 100 \text{（\%）}$$

[0051]

[表1]

安定剤		大豆多糖類	エンドウ多糖類	
			未処理物 (製造例1)	UF膜処理物 (製造例3)
水分		—	2.4%	3.2%
粗タンパク質		—	3.5%	3.9%
炭水化物(含む繊維)		—	88.4%	87.3%
灰分		—	5.7%	5.6%
飲料中の添加量(w/v)		0.30%	0.375%	
ホエイオフ(mm)	14日目	6.0	6.0	6.0
	21日目	8.0	9.0	8.0
	30日目	9.0	11.0	9.0
沈殿量	14日目	0.80%	1.00%	0.90%
	21日目	0.90%	1.20%	0.80%
	30日目	1.00%	1.30%	1.10%
沈殿量(目視)	14日目	±	±	±
	21日目	±	±	±
	30日目	±	±	±
生菌数(cfu/ml)	0日目	1.9E+09	1.8E+09	1.8E+09
	14日目	1.9E+09	1.9E+09	1.9E+09
	21日目	1.9E+09	1.7E+09	1.9E+09
	30日目	1.6E+09	1.3E+09	1.5E+09
生残率※	30日目/0日目	82%	72%	83%
		(100%)	(88%)	(101%)
pH	0日目	3.71	3.69	3.71
	14日目	3.62	3.62	3.63
	21日目	3.54	3.53	3.54
	30日目	3.50	3.51	3.52
滴定酸度(ml/9g)	0日目	6.10	6.20	6.10
	14日目	7.10	7.10	7.00
	21日目	7.60	7.50	7.40
	30日目	7.97	7.81	7.78

※()内は大豆多糖類の生残率を100%とした場合の生残率の割合
生残率以外の%は質量%

[0052] この結果より、UF膜処理物を使用した場合は、大豆多糖類を使用した場合と同等の物性安定性、生菌の生残性が確認できた。また、UF膜処理物を使用した場合は未処理物を使用した場合よりも生菌の生残性が顕著に改善できた。

[0053] 実施例 2

乳酸菌生菌含有酸性乳飲料（高菌数タイプ）の調製：

15質量%脱脂粉乳培地（1.8質量%のグルコースおよび3.0質量%のフルクトースを含む）に、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（YIT

9029株)のスターターを0.5質量%(生菌数: 5.0×10^6 cfu/ml)接種し、37℃でpHが3.6となるまで培養を行い酸性原料乳を得た。次いで、製造例2で調製したエンドウ多糖類(未処理物)または製造例5で調製したエンドウ多糖類のエタノール沈殿処理物をそれぞれ含有するシロップ(12質量%の砂糖を含む)を別途調製した。酸性原料乳24重量部とシロップ76重量部を混合した混合物を15MPaで均質化处理し、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。これらの酸性乳飲料の無脂乳固形分は3.7質量%であり、製造直後(保存0日目)のpHおよび多糖類の含有量は表2に記載の通りである。また、比較として従来大豆多糖類(三栄源エフエフアイ製)を用いて同様の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。

[0054] これらの乳酸菌生菌含有酸性乳飲料について、10℃で30日まで保存後、ホエイオフの量(飲料上部に生じる透明な層の高さ(mm))および沈殿量(容器底部の沈殿の重量÷内容物全体の重量×100(%))を測定した。ホエイオフの量は、容器に入った状態で直接測定した。また、沈殿量を目視で実施例1と同様の基準により判定した。更に、生菌数、pH、滴定酸度を公知の方法で測定した。また更に、生残率を実施例1と同様にして算出した。これらの結果を表2に示した。

[0055]

[表2]

安定剤	大豆多糖類	エンドウ多糖類	
		未処理物 (製造例2)	エタノール沈殿 処理物 (製造例5)
水分	—	1.8%	8.1%
粗タンパク質	—	6.2%	6.6%
炭水化物(含む繊維)	—	88.5%	80.7%
灰分	—	3.5%	4.6%
飲料中の添加量(w/v)		0.30%	0.375%
ホエイオフ(mm)	10日目	6.0	6.0
	17日目	10.0	11.0
	21日目	16.0	15.0
	25日目	15.0	15.0
	30日目	15.0	15.0
沈殿量	10日目	0.73%	0.59%
	17日目	0.93%	0.77%
	21日目	0.99%	1.04%
	25日目	1.11%	1.02%
	30日目	0.95%	0.89%
沈殿量(目視)	10日目	—	—
	17日目	±	±
	21日目	±	±
	25日目	±	±
	30日目	±	±
生菌数(cfu/ml)	0日目	1.6E+09	1.7E+09
	10日目	1.6E+09	1.7E+09
	17日目	1.6E+09	1.7E+09
	21日目	1.6E+09	1.4E+09
	25日目	1.4E+09	1.1E+09
	30日目	1.2E+09	1.1E+09
生残率※	30日目/0日目	75%	65%
		(100%)	(86%)
pH	0日目	3.69	3.67
	10日目	3.62	3.61
	17日目	3.59	3.58
	21日目	3.57	3.57
	25日目	3.56	3.56
	30日目	3.54	3.54
滴定酸度(ml/9g)	0日目	6.18	6.16
	10日目	6.83	6.82
	17日目	7.25	7.22
	21日目	7.36	7.29
	25日目	7.51	7.39
	30日目	7.60	7.47

※()内は大豆多糖類の生残率を100%とした場合の生残率の割合
生残率以外の%は質量%

[0056] この結果より、エタノール沈殿処理物を使用した場合は、大豆多糖類を使用した場合と同等の物性安定性、生菌の生残性が確認できた。また、エタノ

ール沈殿処理物を使用した場合は未処理物を使用した場合よりも生菌の生残性が顕著に改善できた。

[0057] 実施例 3

乳酸菌生菌含有酸性乳飲料の調製：

15質量%脱脂粉乳培地（3.5質量%のグルコースを含む）を132℃で3秒間殺菌し、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（YIT 9029株）のスターターを0.5質量%（生菌数： 5.0×10^6 cfu/ml）接種し、37℃でpHが3.6となるまで培養を行い酸性原料乳を得た。次いで、製造例4で調製したエンドウ多糖類の限外濾過膜処理物（UF膜処理物）を含有するシロップ（5質量%のぶどう糖果糖液糖を含む）を別途調製した。酸性原料乳24重量部とシロップ76重量部を混合した混合物を15MPaで均質化処理し、乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。これらの酸性乳飲料の無脂乳固形分は3.3質量%であり、製造直後（保存0日目）のpHおよび多糖類の含有量は表3に記載の通りである。また、比較として従来大豆多糖類（三栄源エフエフアイ製）を用いて同様の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料を得た。

[0058] これらの乳酸菌生菌含有酸性乳飲料について、10℃で28日まで保存後、ホエイオフの量（飲料上部に生じる透明な層の高さ（mm））および沈殿量（容器底部の沈殿の重量÷内容物全体の重量×100（%））を測定した。ホエイオフの量は、容器に入った状態で直接測定した。また、沈殿量を目視で実施例1と同様の基準により判定した。更に、生菌数、pH、滴定酸度を公知の方法で測定した。また更に、生残率を実施例1と同様にして算出した。これらの結果を表3に示した。

[0059]

[表3]

安定剤		大豆多糖類	エンドウ多糖類	
			UF膜処理物 (製造例4)	
水分		—	4.8%	
粗タンパク質		—	5.1%	
炭水化物(含む繊維)		—	81.1%	
灰分		—	9.0%	
飲料中の添加量(w/v)		0.30%	0.40%	0.20%
ホエイオフ(mm)	7日目	5.0	5.0	7.0
	14日目	10.0	10.0	14.0
	21日目	15.0	15.0	20.0
	28日目	16.0	16.0	32.0
沈殿量	7日目	0.69%	0.63%	0.70%
	14日目	0.57%	0.56%	0.57%
	21日目	1.49%	1.22%	1.31%
	28日目	1.59%	1.26%	1.55%
沈殿量(目視)	7日目	±	±	±
	14日目	+	+	+
	21日目	+	+	+
	28日目	+	+	+
生菌数(cfu/ml)	0日目	7.0E+08	7.5E+08	7.6E+08
	7日目	—	—	—
	14日目	—	—	—
	21日目	—	—	—
	28日目	8.1E+08	8.2E+08	7.9E+08
生残率※	28日目/0日目	116%	109%	104%
		(100%)	(94%)	(90%)
pH	0日目	3.72	3.73	3.70
	7日目	3.65	3.65	3.63
	14日目	3.60	3.60	3.58
	21日目	3.54	3.54	3.52
	28日目	3.48	3.48	3.46
滴定酸度(ml/9g)	0日目	5.41	5.33	5.34
	7日目	5.80	5.81	5.81
	14日目	6.35	6.39	6.37
	21日目	6.86	6.81	6.80
	28日目	7.22	7.24	7.32

※()内は大豆多糖類の生残率を100%とした場合の生残率の割合
生残率以外の%は質量%

[0060] この結果より、UF膜処理物を0.40%使用した場合、大豆多糖類を使用した場合と同等の物性安定性、生菌の生残性が確認できた。また、UF膜処理物を0.20%使用した場合、ホエイオフの値がやや上昇したが、安定性としては問題なく、生菌の生残性は大豆多糖類を使用した場合と同等の結果が確認できた。

産業上の利用可能性

[0061] 本発明の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料は、健康の増進に利用することができる。

[0062]

0-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	JP0-PAS i480
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	PF-230003-W0

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0031
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独)製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (NITE-IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室
1-3-3	寄託の日付	1981年 05月 01日 (01.05.1981)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-1366
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0030
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独)製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (NITE-IPOD)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室
2-3-3	寄託の日付	2005年 06月 23日 (23.06.2005)
2-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-10613
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	平川 優香

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

差替え用紙(規則26)

請求の範囲

- [請求項1] エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有することを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳飲料。
- [請求項2] pHが4.2以下である請求項1記載の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料。
- [請求項3] 無脂乳固形分が4.0質量％以下である請求項1または2記載の乳酸菌生菌含有酸性乳飲料。
- [請求項4] エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を有効成分とすることを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳飲料における乳酸菌生菌の生残性改善剤。
- [請求項5] 乳酸菌生菌含有酸性乳飲料に、エンドウ多糖類の限外濾過膜処理物および／またはエタノール沈殿処理物を含有させることを特徴とする乳酸菌生菌含有酸性乳飲料における乳酸菌生菌の生残性改善方法。