

明 細 書

発明の名称： 乳酸菌の培養方法および発酵乳の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、バクテリオシンを生産する乳酸菌の培養方法、およびバクテリオシンを生産する乳酸菌を含む発酵乳の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ヨーグルトなどの発酵乳は、生乳、脱脂粉乳、ホエイ（乳清）タンパク質などが混合された原料乳（ヨーグルトミックス）にスターターを添加し、ヨーグルトミックスを発酵させることにより製造される。スターターには、ブルガリア菌およびサーモフィラス菌などの乳酸菌が用いられる。

[0003] ヨーグルトミックスは、製造後に0～10℃の温度に冷却され、冷蔵された状態で出荷される。冷蔵中のヨーグルトには乳酸菌が生きた状態で存在しているため、ヨーグルトは、流通過程および家庭などでの保存期間に、少しずつ発酵して酸度が上昇する。この結果、ヨーグルトの風味が、賞味期間内であっても変化するという問題がある。

[0004] また、一部の乳酸菌が、バクテリオシンと呼ばれる抗菌性のタンパク質またはペプチドを生産することが知られている。下記特許文献1～3に示すように、バクテリオシンを生産する乳酸菌を利用して、食品の保存性を向上させることができる。

[0005] 特許文献1に係る発明では、バクテリオシンを生産するラクティス菌をヨーグルトのスターターとして利用する。ヨーグルトミックスの発酵に伴って、ラクティス菌がバクテリオシンを生産する。ラクティス菌により生産されたバクテリオシンは、ヨーグルトの酸度上昇を抑制するため、ヨーグルトの保存性を向上させることができる。

[0006] 特許文献2では、乳および乳成分を主成分とする液体培地を用いてビフィズス菌とラクティス菌とを共生培養している。共生培養後の培養液を食品の保存剤として、食品（食パン、うどんなど）に添加することにより、食品の

保存性を向上させるとともに、食品に良好な風味を付与することができる。

[0007] 特許文献3には、酵母エキスなどが添加されたホエイ培地を用いて、ラクティス菌を培養し、培養後のホエイ培地からラクティス菌を除去した風味改良剤が記載されている。この風味改良剤を用いることにより、魚介類の生臭さを消したり、食品に旨味などを付与したりすることができる。

[0008] 特許文献1：特開平4-211360号公報

特許文献2：特開平8-187071号公報

特許文献3：特開2004-283109号公報

[0009] 上述したように、特許文献1に係る発明は、バクテリオシンを生産するラクティス菌をスターターとして使用する。このため、ラクティス菌をスターターとして使用しないヨーグルトの酸度の上昇を抑えることが困難である。

[0010] また、流通時および保存時のヨーグルトの酸度の上昇を抑えることを目的として、特許文献2に係る食品保存剤、または特許文献3に係る風味改良剤を添加剤としてヨーグルトミックスに添加することが考えられる。しかし、添加剤が一定の割合でヨーグルトミックスに添加された場合、添加剤の原料である酵母エキスなどにより、ヨーグルト本来の風味が損なわれるおそれがある。したがって、バクテリオシンを生産する乳酸菌の培養物をヨーグルトミックスに添加する場合、培養物の添加量を極力少なくすることが望ましい。

発明の開示

[0011] 本発明の乳酸菌の培養方法は、タンパク質分解酵素により分解された乳清を含む培養液を調製する培養液調製工程と、バクテリオシンを生産する乳酸菌を前記培養液に接種し、前記乳酸菌が接種された培養液のpHを5以上6以下に維持しながら前記乳酸菌を培養する培養工程と、を備える。

[0012] 本発明の乳酸菌の培養方法は、従来の培養方法により得られた培養液と比べて数十倍程度の高い抗菌活性を示す培養液を得ることができる。つまり、本発明の乳酸菌の培養方法は、バクテリオシンを効率よく生産することができる。

[0013] 本発明の発酵乳の製造方法は、ヨーグルトミックスを生成する原料乳生成工程と、バクテリオシンを生産する乳酸菌であるバクテリオシン生産菌を培養し、前記バクテリオシン生産菌が濃縮された濃縮菌液を生成する濃縮菌液生成工程と、前記ヨーグルトミックスの総重量を基準として0.01重量%以上0.1重量%以下の前記濃縮菌液を、前記ヨーグルトミックスに添加する添加工程と、前記濃縮菌液が添加されたヨーグルトミックスを発酵させる発酵工程と、を備え、前記濃縮菌液生成工程は、タンパク質分解酵素により分解された乳清を含む培養液を調製する培養液調製工程と、前記バクテリオシン生産菌を前記培養液に接種し、前記バクテリオシン生産菌が接種された培養液のpHを5以上6以下に維持しながら、前記バクテリオシン生産菌を培養する培養工程と、前記バクテリオシン生産菌が培養された培養液から前記濃縮菌液を分離する分離工程と、を含む。

[0014] 本発明に係る発酵乳の製造方法は、添加剤としてヨーグルトミックスに添加される濃縮菌液の添加量を削減することができる。このため、ヨーグルト本来の風味を損なうことなく、ヨーグルトの酸度の上昇を防ぐことができる。

[0015] それゆえに、この発明の目的は、乳酸菌がバクテリオシンを効率よく生産することができる乳酸菌の培養方法と、発酵乳の酸度の上昇を抑えることができる発酵乳の製造方法を提供することである。

[0016] この発明の目的、特徴、局面、および利点は、以下の詳細な説明と添付図面によって、明白となる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]実施例1で用いるホエイ分解培地の組成を示す図である。

[図2]実施例1におけるガセリ菌の培養結果を示す図である。

[図3]実施例2で用いるホエイ分解培地の組成を示す図である。

[図4]実施例2におけるガセリ菌の培養結果を示す図である。

[図5]遠心分離時の重力加速度と濃縮菌液の抗菌活性との対応関係を示すグラフである。

[図6]実施例4で用いるヨーグルトミックスの組成を示す図である。

[図7]実施例4に係るヨーグルトを5℃で保存したときの酸度の経時変化を示すグラフである。

[図8]実施例4に係るヨーグルトを10℃で保存したときの酸度の経時変化を示すグラフである。

[図9]実施例5で用いるヨーグルトミックスの組成を示す図である。

[図10]実施例5に係るヨーグルトを5℃で保存したときの酸度の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の実施の形態について説明する。本実施の形態における乳酸菌の培養方法は、培地のpHが一定の範囲（pHが5以上6以下）内となるように、アルカリ溶液を培地に加えながら乳酸菌を培養する。これにより、生菌数あたりの抗菌活性が非常に高い乳酸菌の培養物を得ることができる。

[0019] 本実施の形態に係る乳酸菌の培養方法において、培養の対象となる乳酸菌は、バクテリオシンを生産することができる乳酸菌（以下、「バクテリオシン生産菌」と呼ぶ）である。ガセリ菌などのラクトバチルス（*Lactobacillus*）属に属する乳酸菌、ラクティス菌などのラクトコッカス（*Lactococcus*）属に属する乳酸菌などを、本実施の形態に係る乳酸菌の培養方法を用いて培養することができる。具体的には、ガセリ菌OLL2959（*Lactobacillus gasseri* OLL2959, NITE BP-224, 特許微生物寄託センター）、ラクティス菌OLS3311（*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OLS3311, FERM BP-10966, 特許生物寄託センター）、クレモリス菌OLS3312（*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* OLS3312, FERM BP-10967, 特許生物寄託センター）などを例示できる。

[0020] 本実施の形態に係る乳酸菌の培養方法について具体的に説明する。まず、ホエイ（乳清）を含むホエイ水溶液に、プロテアーゼなどのタンパク質分解酵素を添加して、ホエイ水溶液中のホエイタンパク質を分解させる。タンパ

ク質分解酵素の添加前に、ホエイタンパク質濃縮物（WPC）、ホエイタンパク質単離物（WPI）などのホエイタンパク質をホエイ水溶液に添加してもよい。

[0021] 次に、ビール酵母エキスなどの酵母エキスをホエイ水溶液に添加して、バクテリオシン生産菌の培養に用いるホエイ分解培地を調製する。ホエイ分解培地に、窒素源として、ホエイタンパク質の他に、肉エキス、魚肉エキスなどを添加してもよい。また、ホエイ分解培地に、硫酸鉄、硫酸マグネシウムなどの無機栄養物、およびモノオレイン酸デカグリセリン、モノオレイン酸ソルビタンなどの乳化剤を添加してもよい。ホエイ分解培地に、アスコルビン酸ナトリウムなどを添加してもよい。

[0022] ホエイ分解培地にバクテリオシン生産菌を接種し、バクテリオシン生産菌を培養する。好ましくは、ホエイ分解培地のpHが6以下になるまでバクテリオシン生産菌を培養させた後に、バクテリオシン生産菌を培養中のホエイ分解培地のpHを5以上6以下の範囲に調整しながら、バクテリオシン生産菌を培養する。より好ましくは、ホエイ分解培地のpHが5.8以下になるまでバクテリオシン生産菌を培養させた後に、ホエイ分解培地のpHを5.2以上5.8以下の範囲に調整しながら、バクテリオシン生産菌を培養する。さらに好ましくは、ホエイ分解培地のpHを5.5以上5.8以下の範囲に調整しながら、バクテリオシン生産菌を培養する。pHの調整は、ホエイ分解培地にアルカリ溶液を添加することにより行うことができる。アルカリ溶液として、炭酸カリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液などを用いることができる。

[0023] バクテリオシン生産菌の培養後に、バクテリオシン生産菌を培養したホエイ分解培地（培養液）からバクテリオシン生産菌が濃縮された濃縮菌液を分離する。濃縮菌液の分離には、遠心分離または膜分離を用いることができる。遠心分離により濃縮菌液を分離する場合、重力加速度は6000（G）以上であることが好ましい。

[0024] このようにして得られたバクテリオシン生産菌の濃縮菌液は、培養中にホ

エイ分解培地のpHが調整されることなく培養されたバクテリオシン生産菌の濃縮菌液に比べ、数十倍以上の高い抗菌活性を有する。すなわち、ホエイ分解培地のpHを5～6に維持しながらバクテリオシン生産菌を培養することにより、濃縮菌液の抗菌活性を制御しながら、抗菌活性の高い濃縮菌液を効率よく得ることができる。

[0025] また、本実施の形態に係る濃縮菌液を食品用保存剤として食品に添加する場合、本実施の形態に係る濃縮菌液の食品への添加量を従来の食品用保存剤に比べて少なくすることができる。つまり、本実施の形態に係る濃縮菌液は、食品用保存剤として食品に添加されることにより、食品本来の風味が変化することを抑制しつつ、食品の保存性を向上させることができる。

[0026] 次に、本実施の形態に係る発酵乳（ヨーグルト）の製造方法について具体的に説明する。まず、原料乳であるヨーグルトミックスを調製する。ヨーグルトミックスは、たとえば、生乳に脱脂粉乳、ホエイタンパク質、および水などを混合することにより調製される。なお、ヨーグルトミックスに砂糖、果肉、果汁などを添加してもよい。

[0027] ヨーグルトミックスを従来と同様に均質化および殺菌した後で、ヨーグルトミックスに、スターターと、上記乳酸菌の培養方法で得たバクテリオシン生産菌やその濃縮菌液とを接種する。バクテリオシン生産菌の濃縮菌液の接種量は、好ましくは、ヨーグルトミックスの総重量を基準として、0.01重量%以上0.1重量%以下である。さらに好ましくは、バクテリオシン生産菌の濃縮菌液の接種量は、0.01重量%以上0.05重量%以下である。

[0028] なお、スターターとして用いられる乳酸菌は、バクテリオシン生産菌と同一の乳酸菌であってもよいし、異なる乳酸菌であってもよい。また、ヨーグルトミックスを均質化する工程や殺菌工程の前に、濃縮菌液をヨーグルトミックスに添加してもよい。

[0029] バクテリオシン生産菌やその濃縮菌液が接種されたヨーグルトミックスを発酵させることにより、ヨーグルトが製造される。発酵条件は、従来と同じ

条件でよい。本実施の形態で説明した方法により製造されたヨーグルトは、濃縮菌液が添加されないヨーグルトと比べて、製造直後からの酸度の上昇が抑制される。これは、濃縮菌液に含まれる高濃度のバクテリオシンが、ヨーグルト中のブルガリア菌の活動を抑制するためである。このように、本実施の形態で説明した方法により製造されたヨーグルトは、製造直後の良好な風味を従来と比べて賞味期限（2週間程度）内にわたって安定的に維持できる。

- [0030] また、本実施の形態に係る発酵乳の製造方法では、食品用保存剤として用いられる濃縮菌液の使用量を、従来の食品用保存剤の使用量の10分の1程度に抑えることができる。したがって、ヨーグルト本来の風味が、濃縮菌液の添加により損なわれることを防止できる。

実施例

- [0031] 以下、図面を参照しつつ、本発明に係る乳酸菌の培養方法の実施例について説明する。

- [0032] {実施例1}

図1は、実施例1で使用するホエイ分解培地の組成を示す図である。まず、実施例1で使用するホエイ分解培地を調製した。具体的には、ホエイ分解培地の総重量を基準として、8.70重量%のホエイパウダー（明治乳業社製）と、1.50重量%のホエイタンパク質濃縮物（WPC80、NZMP社製）と、88.80重量%の水とを混合して、ホエイ水溶液を調製する。0.10重量%のタンパク質分解酵素（プロテアーゼA「アマノ」G、天野エンザイム社製）をホエイ水溶液に添加して、ホエイ水溶液中のホエイタンパク質を分解させた。

- [0033] ホエイタンパク質が分解されたホエイ水溶液に、0.20重量%のビール酵母エキス（アサヒビール社製）と、0.50重量%の魚肉エキス（マルハニチロ食品社製）と、0.10重量%のアスコルビン酸ナトリウムと、0.05重量%の硫酸鉄（ FeSO_4 ）と、0.05重量%の乳化剤（サンソフトQ-17S（モノオレイン酸デカグリセリン）、太陽化学社製）とを添加し

て、ホエイ分解培地を調製した。

[0034] 次に、生菌数が $2 \sim 4 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ となるように、ガセリ菌 OLL 2959 (*Lactobacillus gasserii* OLL2959, NITE BP-224, 特許微生物寄託センター) をホエイ分解培地に接種した。ホエイ分解培地の pH が 5.5 になるまでガセリ菌 OLL 2959 を培養させた後で、ガセリ菌 OLL 2959 を中和培養した。具体的には、ホエイ分解培地の pH が常に 5.5 以上となるように炭酸カリウム水溶液 (40 重量%) をホエイ分解培地に添加し、攪拌しながら、ガセリ菌 OLL 2959 を 34°C 、22 時間の条件で培養した (中和培養)。なお、中和培養は、炭酸ガスを吹き込んだ嫌気条件の下で行われている。中和培養の後に、ホエイ分解培地 (培養液) 中のガセリ菌 OLL 2959 の生菌数を、BCP 培地を用いた混釈培養法により測定した。ガセリ菌 OLL 2959 の生菌数は、 $1.81 \times 10^{10} \text{ cfu/ml}$ であった。

[0035] 中和培養後のホエイ分解培地 (培養液) を遠心分離 (重力加速度: 6000 G) することにより、実施例 1 に係るガセリ菌 OLL 2959 の濃縮菌液を得た。実施例 1 に係る濃縮菌液の抗菌活性を、後述する方法を用いて測定した。この結果、実施例 1 に係る濃縮菌液の 1 ml あたりの抗菌活性は、72400 AU (Arbitrary Unit) であった。実施例 1 に係る濃縮菌液の $1 \times 10^9 \text{ cfu}$ あたりの抗菌活性は、約 4000 AU であった。

[0036] なお、実施例 1 に係るホエイ分解培地を用いて、pH の条件を変更しながらガセリ菌 OLL 2959 を中和培養した。この結果、pH が 5.2 ~ 5.8 の条件で中和培養して得られた濃縮菌液の抗菌活性が、実施例 1 に係る濃縮菌液の抗菌活性と同様の値となった。また、pH が 5 ~ 6 の条件で中和培養して得られた濃縮菌液の抗菌活性は、実施例 1 に係る濃縮菌液の抗菌活性よりもやや低い値となった。

[0037] 中和培養の効果を確認するために、実施例 1 と同様の手順でガセリ菌 OLL 2959 を接種したホエイ分解培地を、 37°C 、20 時間の条件で静置して、ガセリ菌 OLL 2959 を静置培養した (比較例 1)。静置培養したホ

エイ分解培地（培養液）を遠心分離（重力加速度：6000G）して、比較例1に係る濃縮菌液を得た。

[0038] 静置培養後のホエイ分解培地（培養液）において、ガセリ菌OLL2959の生菌数は、 2.63×10^9 cfu/mlであった。また、比較例1に係る濃縮菌液の1mlあたりの抗菌活性は、100AU未満であった。比較例1に係る濃縮菌液の 1×10^9 cfuあたりの抗菌活性は、約40AU未満であった。

[0039] 図2に、実施例1および比較例1における、培養後のガセリ菌OLL2959の生菌数および濃縮菌液の抗菌活性の測定結果を示す。上述したように、 1×10^9 cfuあたりの抗菌活性は、実施例1に係る濃縮菌液で4000AUであった。比較例1に係る濃縮菌液で約40AU未満であった。すなわち、中和培養により得られた濃縮菌液（実施例1）の生菌数あたりの抗菌活性は、静置培養により得られた濃縮菌液（比較例1）の生菌数あたりの抗菌活性の100倍程度となった。

[0040] また、中和培養後のホエイ分解培地（培養液）中のガセリ菌OLL2959の生菌数は、静置培養後のホエイ分解培地（培養液）中の生菌数より一桁程度で大きい。このことから、中和培養時において、ホエイ分解培地のpHを5.5以上に維持することにより、ガセリ菌OLL2959の活動が活発となったため、バクテリオシンが効率よく生産されたと推測される。

[0041] このように、ホエイ分解培地の培養中のpHを5～6の範囲に調整しながら、バクテリオシン生産菌を中和培養することにより、濃縮菌液の抗菌活性を非常に高い状態に制御することができた。

[0042] {実施例2}

図3は、実施例2で使用するホエイ分解培地の組成を示す図である。実施例2で使用するホエイ分解培地を調製するために、実施例1と同様の手順で、ホエイタンパク質が分解されたホエイ水溶液を調製した。

[0043] ホエイタンパク質が分解されたホエイ水溶液に、0.20重量%のビール酵母エキス（アサヒビール社製）と、0.50重量%の魚肉エキス（マルハ

ニチロ食品社製）と、0.10重量%のアスコルビン酸ナトリウムと、0.05重量%の硫酸鉄（ FeSO_4 ）と、0.05重量%の乳化剤（サンソフト81S（モノオレイン酸ソルビタン）、太陽化学社製）とを添加して、ホエイ分解培地を調製した。実施例2では、使用する乳化剤が実施例1のものと異なる。

[0044] 次に、生菌数が $2 \sim 4 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ となるように、ガセリ菌OLL2959をホエイ分解培地に接種した。実施例1と同様に、ホエイ分解培地のpHが5.5になるまでガセリ菌OLL2959を培養させた後で、ガセリ菌OLL2959を中和培養した。具体的には、ホエイ分解培地のpHが常に5.5以上となるように、炭酸カリウム水溶液（40重量%）を添加しながら、ガセリ菌OLL2959を 34°C 、22時間の条件で中和培養した。その後、ホエイ分解培地（培養液）中のガセリ菌OLL2959の生菌数を、実施例1と同一の方法を用いて測定した。ガセリ菌OLL2959の生菌数は、 $1.84 \times 10^{10} \text{ cfu/ml}$ であった。

[0045] 中和培養後のホエイ分解培地（培養液）を遠心分離（重力加速度： 6000G ）して、実施例2に係る濃縮菌液を分離した。実施例2に係る濃縮菌液の 1ml あたりの抗菌活性は、 51200AU であった。実施例2に係る濃縮菌液の $1 \times 10^9 \text{ cfu}$ あたりの抗菌活性は、約 2800AU であった。抗菌活性の測定には、実施例1と同一の方法（後述）を使用した。

[0046] なお、実施例2に係るホエイ分解培地を用いて、pHの条件を変更しながらガセリ菌OLL2959を中和培養した。この結果、pHが5.2～5.8の条件で中和培養して得られた濃縮菌液の抗菌活性が、実施例2に係る濃縮菌液の抗菌活性と同様の値となった。また、pHが5～6の条件で中和培養して得られた濃縮菌液の抗菌活性は、実施例2に係る濃縮菌液の抗菌活性よりも、やや低い値となった。

[0047] 中和培養の効果を確認するために、実施例2と同様の手順でガセリ菌OLL2959を接種したホエイ分解培地を、 37°C 、20時間の条件で静置培養した（比較例2）。静置培養したホエイ分解培地（培養液）を遠心分離（

重力加速度：6000G）して、比較例2に係る濃縮菌液を分離した。

[0048] 静置培養後のホエイ分解培地（培養液）において、ガセリ菌OLL2959の生菌数は、 2.63×10^9 cfu/mlであった。また、比較例2に係る濃縮菌液の1mlあたりの抗菌活性は、100AU未満であり、 1×10^9 cfuあたりの抗菌活性は、約40AU未満であった。

[0049] 図4に、実施例2および比較例2における、培養後のガセリ菌OLL2959の生菌数、および濃縮菌液の抗菌活性の測定結果を示す。上述したように、 1×10^9 cfuあたりの抗菌活性は、実施例2に係る濃縮菌液で2800AUであった。比較例2に係る濃縮菌液で約40AU未満であった。すなわち、中和培養により得られた濃縮菌液（実施例2）の生菌数あたりの抗菌活性は、静置培養により得られた濃縮菌液（比較例2）の生菌数あたりの抗菌活性の70倍以上となった。

[0050] また、中和培養後のガセリ菌OLL2959の生菌数は、静置培養後のガセリ菌OLL2959の生菌数より一桁程度で大きい。実施例2においても、ガセリ菌OLL2959の活動が活発となり、バクテリオシンが効率よく生産されたと推測される。

[0051] このように、実施例2の条件でガセリ菌OLL2959を中和培養することにより、濃縮菌液の抗菌活性を非常に高い状態に制御することができた。また、実施例1、2に係る濃縮菌液の抗菌活性は、比較例1、2に係る濃縮菌液の抗菌活性の数十倍～数百倍となっているため、ホエイ分解培地に使用できる乳化剤は、特に限定されることがわかる。

[0052] {抗菌活性の測定方法}

次に、ガセリ菌OLL2959の濃縮菌液の抗菌活性の測定方法について、実施例1に係る濃縮菌液を例にして説明する。実施例2、および比較例1、2に係る濃縮菌液の抗菌活性も、同じ方法により測定している。

[0053] 市販のMRS培地（ベクトン・ディッキンソン社製）に、MRS培地を基準として0.1%（v/v）の指標菌を添加することにより、試験培地を調製した。指標菌には、ブルガリア菌（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. bu

lgaricus) ATCC 11842 (基準株) を用いた。

[0054] 凍結保存された実施例 1 に係る濃縮菌液を熱水浴中に 5 分間保持した上で、実施例 1 に係る濃縮菌液の 1% (v/v) 水溶液を調製した。濃縮菌液の水溶液を 2 倍ずつ段階的に希釈して、希釈率の段数の異なる複数の濃縮菌液の希釈液を得た。希釈率の段数は、8 ~ 12 段である。これにより、濃縮菌液の水溶液が $2^8 \sim 2^{12}$ 倍に希釈された希釈液を調製した。各段数の希釈液を試験培地にそれぞれ添加し、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学社製) を用いて、各段数の希釈液が添加された試験培地を 37℃、24 時間の条件で嫌気培養した。

[0055] 嫌気培養の後に、指標菌が生育しない希釈率の最高段数 (n) を確認した。そして、希釈率の最高段数 (n) と濃縮菌液の水溶液の濃度 (0.01 : 1%) とに基づいて、実施例 1 に係る濃縮菌液の抗菌活性 (AU) を求めた。抗菌活性は、以下の式に基づいて求めることができる。

$$\text{抗菌活性 (AU)} = \text{希釈率の最高段数 (n)} / \text{濃縮菌液の水溶液の濃度 (0.01)}$$

[0056] {実施例 3}

実施例 3 では、中和培養されたガセリ菌の濃縮菌液の遠心分離条件を検討した。重力加速度を様々な値に設定して、実施例 1 に係る中和培養後のホエイ分解培地 (培養液) を遠心分離した。そして、遠心分離の条件が異なる各濃縮菌液の抗菌活性を求めた。

[0057] 図 5 は、重力加速度と濃縮菌液の抗菌活性との関係を示すグラフである。図 5 に示すように、遠心分離時の重力加速度の増加とともに、濃縮菌液の抗菌活性が増加している。そして、遠心分離時の重力加速度が 6000 G 以上のときに、抗菌活性が一定 (約 72400 AU) となった。このことから、6000 G 以上の重力加速度で濃縮菌液を遠心分離することにより、抗菌活性の高い濃縮菌液を効率的に得られることが明らかになった。

[0058] 以下、本発明に係る発酵乳の製造方法の実施例として、実施例 1 に係る濃縮菌液を用いたヨーグルトの製造について説明する。

[0059] {実施例 4}

図 6 は、実施例 3 で使用した 3 種類のヨーグルトミックスの組成を示す図である。まず、ヨーグルトミックスの総重量を基準として、83.90 重量%の牛乳および 1.51 重量%の脱脂粉乳（ともに明治乳業社製）と、0.80 重量%のホエイタンパク質濃縮物（WPC34、ドモ社製）と、水とを混合して、配合 A～C のヨーグルトミックスを調製した。水の配合比は、図 6 に示すように、配合 A～C でそれぞれ異なる。

[0060] 配合 A～C のヨーグルトミックスの均質化および殺菌を従来と同様に行い、配合 A～C のヨーグルトミックスを約 40℃ に冷却した。冷却後、2.00 重量%の乳酸菌スターターを配合 A～C のヨーグルトミックスに接種した。乳酸菌スターターには、明治ブルガリアヨーグルト（明治乳業社製）から分離した乳酸菌を用いた。

[0061] 配合 B のヨーグルトミックスに、0.05 重量%の実施例 1 に係る濃縮菌液を接種した。配合 C のヨーグルトミックスに、0.10 重量%の実施例 1 に係る濃縮菌液を接種した。配合 A のヨーグルトミックスには、実施例 1 に係る濃縮菌液を接種しなかった。

[0062] 乳酸濃度が約 0.75% になるまで、配合 A～C のヨーグルトミックスを 40℃ の温度で発酵させて、ヨーグルトを製造した。そして、配合 A～C のヨーグルトを 5℃ および 10℃ の温度でそれぞれ冷蔵保存し、ヨーグルトの標準的な賞味期限（製造日から 2 週間程度）内にわたって、配合 A～C のヨーグルト中の乳酸濃度を測定した。

[0063] 図 7 は、配合 A～C のヨーグルトを 5℃ で保存したときの乳酸濃度の経時変化を示す図である。図 8 は、配合 A～C のヨーグルトを 10℃ で保存したときの乳酸濃度の経時変化を示す図である。

[0064] 図 7 および図 8 に示すように、保存温度に関係なく、配合 B、C のヨーグルトの乳酸濃度が、配合 A の乳酸濃度より低くなっている。つまり、配合 B、C のヨーグルトは、実施例 1 に係る濃縮菌液が接種されることにより、冷蔵状態での発酵が抑制され、ヨーグルト本来の風味および品質を維持できて

いることが明らかになった。

[0065] 配合Cのヨーグルトの乳酸濃度が配合Bのヨーグルトの乳酸濃度よりもやや低いことから、濃縮菌液の接種量が多いほど、乳酸濃度の上昇が抑制される傾向にあることがわかる。しかし、濃縮菌液の接種量を増加させるほど、ヨーグルト本来の風味が損なわれるおそれがある。配合B、Cのヨーグルトの乳酸濃度の差はわずかであるため、ヨーグルトの乳酸濃度の上昇を抑えるのであれば、濃縮菌液の接種量は0.01～0.05重量%でよい。

[0066] なお、配合B、Cのヨーグルトミックスにおいて、実施例1に係る濃縮菌液の接種をヨーグルトミックスの均質化および殺菌の前に行っても、ヨーグルトの乳酸濃度の上昇を抑制する効果に違いはなかった。このことから、濃縮菌液とともに接種されるバクテリオシン生産菌は、死菌でも生菌でもよく、濃縮菌液の抗菌活性に影響を与えないことが明らかとなった。

[0067] {実施例5}

図9は、実施例5で使用した2種類のヨーグルトミックスの組成を示す図である。実施例5に係るヨーグルトミックスには、ホエイタンパク質濃縮物(WPC)に代えて、ホエイタンパク質単離物(WPI)が添加され、砂糖が新たに添加されている。

[0068] まず、ヨーグルトミックスの総重量を基準として、84.20重量%の牛乳および1.76重量%の脱脂粉乳(ともに明治乳業社製)と、0.20重量%のホエイタンパク質単離物(WPI、ニュージーランド・ミルク・プロダクツ社製)と、4.50重量%の砂糖と、水とを混合して、配合D、Eのヨーグルトミックスを調製した。水の配合比は、図9に示すように、配合D、Eで異なる。

[0069] 配合D、Eのヨーグルトミックスの均質化および殺菌を従来と同様に行い、配合D、Eのヨーグルトミックスを約40℃に冷却した。冷却後、3.00重量%の乳酸菌スターターを、配合D、Eのヨーグルトミックスに接種した。乳酸菌スターターとして、明治十勝ヨーグルト(明治乳業社製)から分離した乳酸菌を用いた。さらに、配合Eのヨーグルトミックスに、0.05

重量%の実施例 1 に係る濃縮菌液を接種した。配合 D のヨーグルトミックスには、実施例 1 に係る濃縮菌液を接種しなかった。

[0070] なお、実施例 5 では、0.10 重量%の濃縮菌液が接種されたヨーグルトミックスを用いなかった。これは、上記実施例 4 で、濃縮菌液の接種量が 0.05 重量%であっても、十分な酸度抑制効果が得られることが明らかになったためである。

[0071] 乳酸濃度が約 0.75 %になるまで、配合 D、E のヨーグルトミックスを 40℃の温度で発酵させて、ヨーグルトを製造した。配合 D、E のヨーグルトを、5℃の温度で冷蔵保存し、配合 D、E のヨーグルトの乳酸濃度をヨーグルトの標準的な賞味期限（製造日から約 2 週間）内にわたって測定した。

[0072] 図 10 は、配合 D、E のヨーグルトの乳酸濃度の経時変化を示す図である。図 10 に示すように、配合 E のヨーグルトの乳酸濃度が、配合 D のヨーグルトの乳酸濃度より低くなっている。このことから、実施例 1 に係る濃縮菌液を加糖ヨーグルトの製造に用いても、加糖ヨーグルトの乳酸濃度の上昇を抑制できることが明らかになった。

[0073] なお、配合 E のヨーグルトミックスにおいて、実施例 1 に係る濃縮菌液の接種をヨーグルトミックスの均質化および殺菌の前に行っても、ヨーグルトの乳酸濃度の上昇を抑制する効果に違いはなかった。

[0074] 実施例 4、5 において、実施例 1 に係る濃縮菌液の食品用保存剤としての接種量は、従来の 10 分の 1 以下である。つまり、実施例 4、5 で説明した発酵乳の製造方法は、実施例 1 に係る濃縮菌液の接種に伴うヨーグルト本来の風味の変化を抑えるとともに、ヨーグルト本来の風味を賞味期限内にわたって維持することができる。また、実施例 2 に係る濃縮菌液を用いて実施例 4、5 と同様の試験を行った。この結果、実施例 2 に係る濃縮菌液を用いたヨーグルトについても、実施例 1 に係る濃縮菌液と同様に、ヨーグルトの酸度の変化を抑制することができた。

[0075] この発明を添付図面に示す実施態様について説明したが、この発明は、その詳細な説明の記載をもって制約しようとするものではなく、特許請求の範

囲に記載する範囲において広く構成される。

請求の範囲

- [請求項1] 乳酸菌の培養方法であって、
タンパク質分解酵素により分解された乳清を含む培養液を調製する培養液調製工程と、
バクテリオシンを生産する乳酸菌を前記培養液に接種し、前記乳酸菌が接種された培養液のpHを5以上6以下に維持しながら前記乳酸菌を培養する培養工程と、
を備える。
- [請求項2] 請求項1に記載の乳酸菌の培養方法において、さらに、
前記乳酸菌が培養された培養液から前記乳酸菌が濃縮された濃縮菌液を分離する分離工程、
を備える。
- [請求項3] 請求項1に記載の乳酸菌の培養方法において、
前記培養工程は、前記乳酸菌が接種された培養液のpHを、5.2以上5.8以下に維持する。
- [請求項4] 請求項1に記載の乳酸菌の培養方法において、
前記培養工程は、前記乳酸菌が接種された培養液にアルカリ溶液を加えることにより、前記乳酸菌が接種された培養液のpHを調節する。
- [請求項5] 請求項2に記載の乳酸菌の培養方法において、
前記分離工程は、6000G以上の重力加速度で前記乳酸菌が培養された培養液から前記濃縮菌液を遠心分離する。
- [請求項6] 発酵乳の製造方法であって、
ヨーグルトミックスを生成する原料乳生成工程と、
バクテリオシンを生産する乳酸菌であるバクテリオシン生産菌を培養し、前記バクテリオシン生産菌が濃縮された濃縮菌液を生成する濃縮菌液生成工程と、
前記ヨーグルトミックスの総重量を基準として0.01重量%以上

0.1重量%以下の前記濃縮菌液を、前記ヨーグルトミックスに添加する添加工程と、

前記濃縮菌液が添加されたヨーグルトミックスを発酵させる発酵工程と、

を備え、

前記濃縮菌液生成工程は、

タンパク質分解酵素により分解された乳清を含む培養液を調製する培養液調製工程と、

前記バクテリオシン生産菌を前記培養液に接種し、前記バクテリオシン生産菌が接種された培養液のpHを5以上6以下に維持しながら、前記バクテリオシン生産菌を培養する培養工程と、

前記バクテリオシン生産菌が培養された培養液から前記濃縮菌液を分離する分離工程と、

を含む。

[請求項7] 請求項6に記載の発酵乳の製造方法において、

前記ヨーグルトミックスに添加される前記濃縮菌液の量は、前記ヨーグルトミックスの総重量を基準として0.01重量%以上0.05重量%以下である。

[請求項8] 請求項6に記載の発酵乳の製造方法において、

前記培養工程は、前記バクテリオシン生産菌が接種された培養液のpHを、5.2以上5.8以下に維持する。

[請求項9] 請求項6に記載の発酵乳の製造方法において、

前記培養工程は、前記バクテリオシン生産菌が接種された培養液にアルカリ溶液を加えることにより、前記バクテリオシン生産菌が接種された培養液のpHを調節する。

[請求項10] 請求項6に記載の発酵乳の製造方法において、

前記分離工程は、6000G以上の重力加速度で前記バクテリオシン生産菌が培養された培養液から前記濃縮菌液を遠心分離する。