

[生物工学会誌 第85巻 第3号 109-114, 2007]

漬物から γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離とその応用

上野 義栄^{1,2}・平賀 和三¹・森 義治³・小田 耕平^{1*}

(2006年10月30日受付 2006年12月21日受理)

Isolation and Utilization of a Lactic Acid Bacterium, Producing a High Level of γ -Aminobutyric Acid (GABA)

Yoshie Ueno^{1,2}, Kazumi Hiraga¹, Yoshiharu Mori³, and Kohei Oda¹ (*Department of Applied Biology, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Goshokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585*¹; *Kyoto Prefectural Technology Center for Small and Medium Enterprise, 134 Chudoji, Minamimachi, Shimogyo-ku, Kyoto 600-8813*²; *Mori, Inc., 17 Uzumasa, Katsuragaharamachi, Ukyo-ku, Kyoto 616-8165*³) *Seibutsu-kogaku* **85**: 109-114, 2007.

A lactic acid bacterium, producing a high level of γ -aminobutyric acid (GABA) was isolated from *Senmaizuke*, a traditional Kyoto pickle produced through a special fermentation method. This lactic acid bacterium was identified and named *Lactobacillus* sp. L13. The strain L13 required glutamic acid for its growth, and produced large amounts of GABA in high concentrations of sodium glutamate. When the pH level of the medium was at 5.0 in its cultivation, a maximum of 650 mM (6.7%) GABA was produced from 800 mM sodium glutamate. By using this strain as a starter, *Senmaizuke* with a superior flavor having 0.1% of GABA, was successfully produced in a shorter period of time compared to the traditional pickling method.

[**Key words:** γ -aminobutyric acid, GABA, *Lactobacillus* sp., pickle, *Senmaizuke*]

乳酸菌は、古来より醸造食品や漬物中に含まれ、乳酸発酵により食品に風味を付与してきた。特に京都では、酒、味噌、醤油などの醸造食品や、すぐきなどの乳酸発酵による漬物など多くの伝統発酵食品があり、それらの伝統発酵食品に乳酸菌が関与している¹⁾。

筆者らは、生理活性物質の一つである γ -アミノ酪酸 (GABA)、およびGABA生産微生物に注目し、GABA高生産乳酸菌の検索を行ってきた^{2,3)}。GABAは、生物界に広く分布している非タンパク性アミノ酸で、生体内では抑制性の神経伝達物質であり、血圧降下作用や利尿作用、ストレス低減作用などがある⁴⁾。近年、GABAを含む食品としてギャバロン茶^{5,6)}、玄米⁷⁻¹⁰⁾、大豆¹¹⁾、カボチャ^{12,13)}、パッションフルーツ¹⁴⁾、キノコ^{15,16)}、酵母エキス¹⁷⁾などが注目され、実際にこれら食品の摂取による血圧降下作用などが報告されている。

また、*Aspergillus oryzae*¹⁸⁾、*Lactobacillus brevis*¹⁹⁾、*Lacto-*

*bacillus plantarum*²⁰⁾、*Lactobacillus parabrevis*²¹⁾などの微生物を利用したGABA生産が報告されている。さらに、*Monascus pilosus*を使用した紅麹^{22,23)}、*Rhizopus microsporus*を使用したテンペ^{24,25)}、*Lactococcus lactis*を利用したチーズ^{26,27)}および乳酸菌飲料²⁸⁾でのGABA生産が報告されている。

今回、京都の伝統的発酵漬物、特に千枚漬けにGABAを多く含有するものを見いだした。本研究では、これら発酵漬物よりGABA高生産能を有する乳酸菌の分離とその生産条件の確立を目的に検討した。さらに、千枚漬け製造の際、GABA生産菌をスターター菌として利用して、GABAを含む千枚漬けを安定して製造する方法についても検討を加えた。

実験方法

培地および培養方法 GABA生産基準株として用

*連絡先 ¹京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門 (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町), TEL. 075-724-7763 FAX. 075-724-7760 E-mail: bika@kit.ac.jp

²京都府中小企業技術センター (〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町134)

³株式会社もり (〒616-8165 京都市右京区太秦桂ヶ原町17)

いた *Lactobacillus brevis* IFO 12005 の培養は、GYP 液体培地（1% glucose, 1% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.2% Na-acetate・3H₂O, 20 ppm MgSO₄・7H₂O, 1 ppm MnSO₄・4H₂O, 1 ppm FeSO₄・7H₂O, 1 ppm NaCl, 50 ppm Tween 80, pH 6.8）を用い、30°C で静置培養した。

分離菌株 *Lactobacillus* sp. L13 は、必要に応じて GYP 液体培地にグルタミン酸ナトリウムを添加し、30°C で静置培養を行った。また、*Lactobacillus* sp. L13 の生菌数測定は 5% グルタミン酸ナトリウムを含む GYP 寒天培地を用い、希釈平板培養法により行った。なお、千枚漬け中の *Lactobacillus* sp. L13 の生菌数測定では、コロニーの形態により他の菌との判別を行った。

GABA 生産乳酸菌の分離 伝統的製法を用いて 7 日間の発酵期間を経て製造された千枚漬けのほか、すぐきなどの漬物を試料として、5% グルタミン酸ナトリウムを含む GYP 寒天培地に塗布し、30°C、5 日間の培養後、単一コロニーを得た。それぞれを GYP 液体培地に植菌し、30°C、2 日間静置培養を行った。得られた培養上清中の GABA を薄層クロマトグラフで検出し、GABA を多く生産する乳酸菌を選抜した。

乳酸菌の同定 グラム染色、カタラーゼ試験、芽胞の形成試験、生育温度、発酵型、乳酸旋光性、および糖の資化性試験は、乳酸菌実験マニュアル²⁹⁾により行った。糖の資化性試験には、API 50 CH および CHL（バイオメリュー社製）を使用した。D, L-乳酸は、F-kit（ロッシュ製）により分別定量した。

分離乳酸菌 L13 株をスターター菌として用いた千枚漬けの製造法 聖護院かぶら 7 kg を 0.2% 酢酸溶液に漬けて洗浄後、皮を剥き、2 mm 厚さにスライスした。このかぶらを食塩 5 kg を添加しながら 6 l 樽に積み重ね、4°C で一晩塩漬けた。溶出した塩水を廃棄し、塩漬け後のかぶらと 10 cm 角に切断した利尻昆布を重ね、乳酸菌（*Lactobacillus* sp. L13）を加えた漬け込み液 500 ml（シヨ糖、グルタミン酸ナトリウム、昆布エキス、酢酸、乳酸菌 1×10^8 cells/ml）を添加しながら、新しい樽（6 l）に漬け替え（本漬け）、10°C で 6 日間発酵させた。

千枚漬けの官能試験法 千枚漬けの香り、および味覚を、漬物の製造と官能試験に精通した 4 人で評価した。

GABA 測定法 GABA の定性分析には、薄層プレート（シリカゲル 60 F254, Merck 社製）、および展開溶媒（1-ブタノール：酢酸：水 = 3:2:1 (v/v/v)）を用い、ニンヒドリンにより GABA を検出した。

GABA の定量分析には、HPLC によるアミノ酸分析を行った。すなわち HPLC（島津製作所製、Prominence）にアミノ酸分析用カラム（強酸性陽イオン交換樹脂カラム Shim-pack Amino-Na 型）を用い、*o*-フタルアルデヒ

ドを反応試薬として、蛍光波長（Ex = 348 nm, Em = 450 nm）によりアミノ酸分析を行った。

結 果

GABA 生産菌の分離 GABA が検出された千枚漬けや、すぐきなどの漬物から約 100 株の乳酸菌を分離した。乳酸菌より、GABA 生産能の最も高かった L13 株を選抜し、以後の実験に使用した。この L13 株は、千枚漬け（京都産）より分離された。

分離乳酸菌の同定 L13 株は短桿菌（Fig. 1）であり、生化学的性質は Table 1 のとおりである。

グラム陽性桿菌、芽胞を形成せず、カタラーゼ反応陰性を示したが、2 日間の培養ではグルコースから酸を生成しなかった。これらの性質は *Lactobacillus* の性質と類似するが、グルコースの資化性で異なった。そのため、グルコースの資化能を再検討したところ、培養期間を一週間にするとうグルコースより酸を生成することが判明した。また、培地にグルタミン酸ナトリウムを添加することにより活発に増殖し、グルコースより L-乳酸とエタノールを生成することより、ヘテロ型であった。また、16S rRNA（データ省略）の塩基配列を DDBJ（DNA data bank of Japan）データベースに対して検索した結果、*Lactobacillus hammesii* と *Lactobacillus parabrevis* の 16S rRNA の塩基配列と 98% の同一性を示した。しかし、両菌株とは生化学的な性質が異なり、新種である可能性が示唆された。これらの結果より、本菌株を *Lactobacillus* sp. L13 と命名した。

GABA 生産性の比較 *L. brevis* IFO 12005 と *Lactobacillus* sp. L13 との GABA 生産性を比較した。*L. brevis* IFO 12005 の GABA 生産量は、グルタミン酸ナトリウム濃度に関係なく、70 ~ 100 mM の GABA を生産した（Fig. 2A）。一方、*Lactobacillus* sp. L13 株は、培地中のグルタミン酸ナトリウム濃度に依存して GABA を生産し、340 mM のグルタミン酸ナトリウムの添加では、290 mM

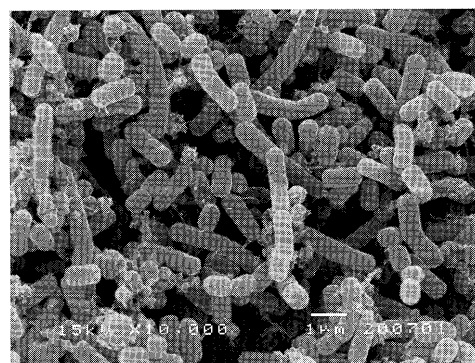


Fig. 1. Scanned electron micrograph of strain L13.

Table 1. Phenotypic characteristics of L13.

Characteristics	L13
Cell form	Short Rod ($0.5 - 0.8 \times 1.0 - 5.0 \mu\text{m}$)
Gram staining	+
Catalase reaction	-
Spore formation	-
Growth at 15/45°C	+ / -
Fermentation type	Hetero
Optical form of lactic acid	L (+)
Acid production from:	
D-Xylose	+
D-Galactose	w
N-Acetylglucosamine	w
Gluconate	w
2-Keto gluconate	w
D-Glucose	w
D-Fructose	w
D-Ribose	+

The L13 did not produce any acid from glycerol, erythritol, arabinose, L-xylose, adonitol, β -methyl-D-xyloside, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, sorbitol, α -methyl-D-mannoside, α -methyl-D-glucoside, D-amylgdalin, arbutin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, melezitose, raffinose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, arabinol, and 5-keto gluconate. w, weak.

の GABA を生産した (Fig. 2B). なお, この生産性の検討は, 培地の初発 pH 6.8 で行った.

培地の初発 pH の影響 グルタミン酸ナトリウム濃度を 270 mM に固定して, GABA 生産性に及ぼす初発 pH の影響を検討した結果, 初発 pH 5 にすると最も多くの GABA を生産した (Fig. 3). 次に, 初発 pH 5 として, グルタミン酸濃度を変えて培養を行ったところ, 800 mM のグルタミン酸ナトリウムから 550 mM の GABA を生産することができた (Fig. 4).

培地の pH 調整と GABA 生産 微生物が GABA を生成する生理学的意味の一つは, 培地酸性化に対する防御である³⁰⁾. 実際に, 培地中のグルタミン酸が GABA に変換されると, 本菌株においても培地の pH が上昇した (Fig. 4). この点に着目し, 培養中の培地 pH を酸性 (pH 5) に維持すれば, L13 株がさらに多くの GABA を生産するのではないかと考え, これを検討した. その結果, 培地 pH を, 乳酸で pH 5 に調整しながら培養することにより, 800 mM のグルタミン酸ナトリウムより 81% の変換率で, 最大 650 mM の GABA を生産することができた

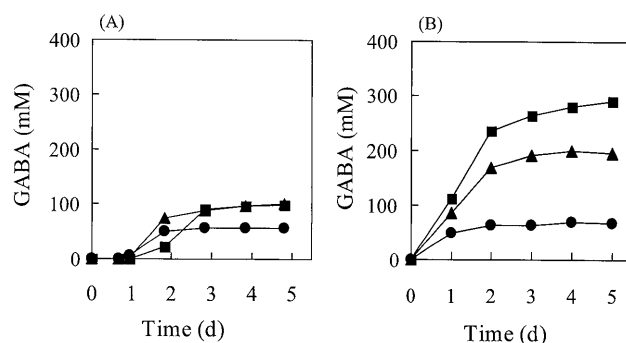


Fig. 2. Time course of GABA production by *L. brevis* IFO 12005 (A) and *Lactobacillus* sp. L13 (B). The strains were cultivated in GYP medium (pH 6.8) in multiple concentrations of sodium glutamate (●, 70 mM; ▲, 200 mM; ■, 340 mM) for 5 d at 30°C.

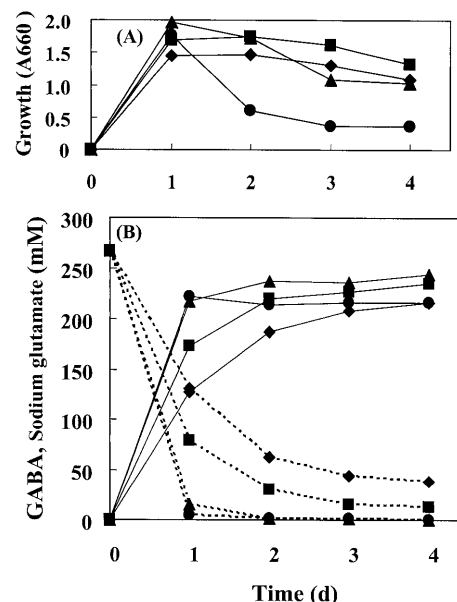


Fig. 3. Effect of initial pH of medium on production of GABA by *Lactobacillus* sp. L13. *Lactobacillus* sp. L13 was cultivated in different initial pHs (●, pH 4.0; ▲, pH 5.0; ■, pH 6.0; ◆, pH 7.0) of GYP medium all containing 270 mM sodium glutamate for 4 d at 30°C. (A) The cell growth monitored at A₆₆₀. (B) GABA (—) and sodium glutamate (·····) contents in the culture sup.

(Fig. 5). この際, 培地中のグルタミン酸ナトリウムは5日間の培養で完全に消失した.

千枚漬けの試作 *Lactobacillus* sp. L13 をスターター菌として, 千枚漬けの製造を試みた.

L13 株を接種しない千枚漬け (コントロール) では, GABA はほとんど生成されなかった (データ省略). しかし, L13 を接種した千枚漬けでは, 発酵3日目, かぶら重量に対し 0.1%, 5日目, 0.4% の GABA が生成された (Fig. 6). 官能検査の結果, 香りは1日目から5日目まで一貫してフルーティでフレッシュな香りがあった. 味覚

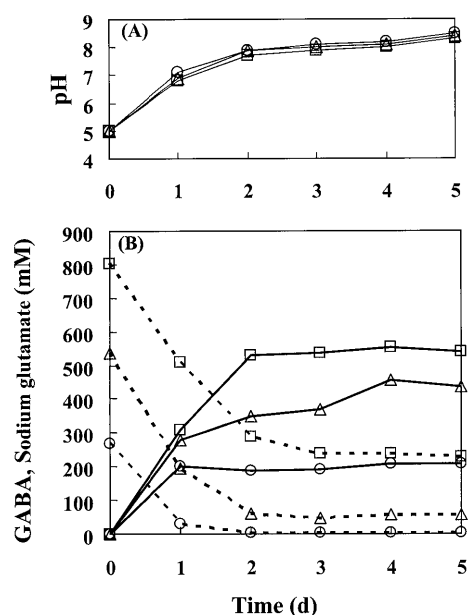


Fig. 4. Effect of sodium glutamate in the medium on production of GABA by *Lactobacillus* sp. L13. *Lactobacillus* sp. L13 was cultivated in GYP medium (pH 5.0) containing several different concentration levels of sodium glutamate (○, 270 mM; △, 530 mM; □, 800 mM) for 5 d at 30°C. (A) pH change during cultivation. (B) GABA (—) and sodium glutamate (-----) concentrations.

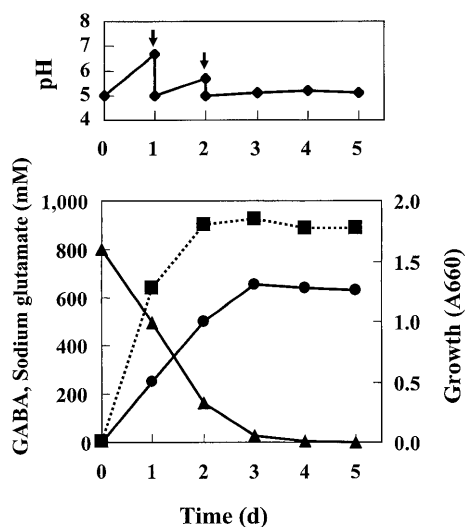


Fig. 5. Effect of pH regulation in a medium on *Lactobacillus* sp. L13 GABA production. *Lactobacillus* sp. L13 was cultivated for 5 d at 30°C in GYP medium (pH 5.0) containing 800 mM sodium glutamate. The pH level of the medium (◆) was adjusted to pH 5.0 every 24 h (shown by arrows) by adding lactic acid. GABA (●) and sodium glutamate (▲) contents in the culture sup., and cell growth monitored at A₆₆₀ (■) are shown.

は1日目の千枚漬けで爽やかなスッキリとした味, 2日目および3日目で甘みがあり後味を引かないスッキリとした味が感じられた。4日目の千枚漬けでは甘みはあるが旨味に欠ける味, 5日目で酸味が感じられ, 4日目以降,

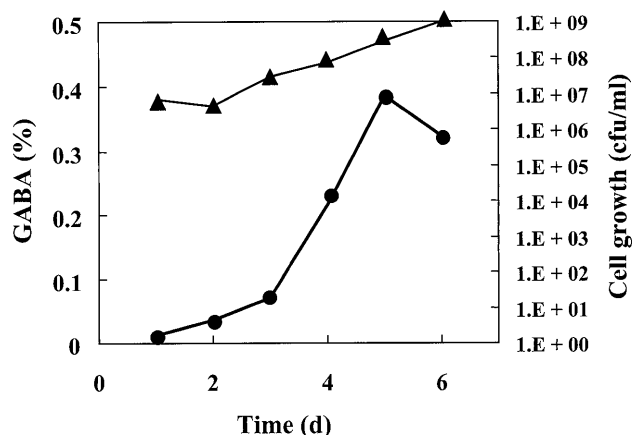


Fig. 6. Time course of GABA production and viable cells of *Lactobacillus* sp. L13 during fermentation of *Senmaizuke*. *Senmaizuke* was produced by fermentation using *Lactobacillus* sp. L13 as a starter for 6 d at 10°C. The GABA content (●) and viable cells of *Lactobacillus* sp. L13 (▲) are shown.

味覚の悪化が認められた。以上, 3日間発酵した千枚漬けはGABAを0.1%含み, かつコントロールにはない独特のすぐれた性質を有していた。また, 3日間の発酵工程が安定していることを, 複数回の試作で確認した(データ省略)。

考 察

発酵食品に含まれるさまざまな機能性物質が注目され, 乳酸菌, 麹菌および酵母など日本古来の発酵食品に使用されていた微生物の働きが見直されている。

血圧降下作用やストレス低減作用が報告されているGABAは, 食品への利用が検討され, 乳酸菌, 麹菌などを利用した機能性食品が開発されている。

一方, 発酵食品のひとつである漬物製造についてみると, 近年の漬物製造は, 食品衛生上の問題と, 製造期間短縮, 製品品質の均一化などのために, 非発酵的に短期間で製造されるものが多い。そのため, 現在では伝統的な発酵法による日本の漬物製造は激減し, 調味漬けと呼ばれる漬物が市場の主流となっている。

このような中, 筆者らは京都を代表する伝統的漬物の千枚漬けより, GABA高生産乳酸菌 *Lactobacillus* sp. L13 を分離することに成功した。 *Lactobacillus* sp. L13 は, 増殖にグルタミン酸を必要とし, 培地にグルタミン酸ナトリウムを添加することにより活発に増殖した。

GABAを含有した食品にはさまざまあるが, 緑茶^{5,6)}やテンペ²⁴⁾では嫌気処理によりGABAが増加し, 玄米⁷⁻⁹⁾では発芽させることによりGABAが増加する。また, 玄米⁹⁾や *A. oryzae*¹⁸⁾は, グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の補酵素であるピリドキサルリン酸 (PLP) の添加によりGABAが増加する。また, 最近 *L. paracasei* NFRI 7415²¹⁾

については、培地 pH を pH 5 に調整し、さらに PLP を添加することにより 300 mM の GABA 生産が報告されている。このように、GABA を増加させるためにさまざまな手法が取られてきた。

今回筆者らは、新たに取得した L13 株を使用し、PLP を培地へ添加せず、培地を pH 5 に調整してこれを培養することで、800 mM のグルタミン酸ナトリウムより 81% の変換率で最大 650 mM (6.7%) の GABA を生産することに成功した。この GABA 生産量は *L. paracasei* NFRI 7415²¹⁾ (300 mM, 3.1%)、*Rhizopus microsporus* IFO 32002²⁴⁾ (170 mM, 1.7%) などの微生物で報告されている GABA 生産量に対して、2 倍以上の生産量である。

今回、*Lactobacillus* sp. L13 による GABA 生産性の向上には、培地の pH 調整が有効であった。培養中は、グルタミン酸が脱炭酸反応により GABA に変換することに伴い、培地 pH が上昇する。そのため、実際に初発 pH 5 で培養しても培地 pH は培養に伴って上昇した。このような pH 上昇は菌体の増殖や GABA の生産量に影響し、GABA の高生産には好ましくない条件であると推察された。そのため、培養中の培地を pH 5 にコントロールすることで、GABA 生産量が増加したものと思われる。また、その他の要因として本菌が高濃度のグルタミン酸ナトリウム存在下 (～15%) でも増殖が可能である点が挙げられる。調べた限りでは、*L. brevis* IFO12005 を始めとする他の GABA 生産菌は 15% のグルタミン酸ナトリウム存在下では増殖がきわめて悪くなったが、L13 株だけは十分に増殖可能であった。

GABA 高生産菌として分離した *Lactobacillus* sp. L13 は、伝統的な発酵法 (製造 8 日間) により製造された千枚漬けより分離することができた。しかし、千枚漬けの製造においても、最近 は 促醸法 (製造 3 日間) と呼ばれる十分な発酵時間を伴わずに製造されるものが多い。このような促醸法で製造された千枚漬けには、GABA を多く含むものは見られない。また、たとえ伝統的な発酵法で作られた千枚漬けでも、GABA 含有量を一定に制御できない。

著者らは、このような背景のもと *Lactobacillus* sp. L13 を千枚漬けのスターター菌として用いることを考え、検討を加えた。その結果、従来法 (伝統的な発酵法) では 8 日間を要していた製造期間を、新製法で 4 日間 (塩漬け 1 日、発酵 3 日) に短縮することができた。また、3 日間の発酵では、工程が安定していることを複数回の試作で確認した (データ省略)。

3 日間を超えて発酵を継続すると、GABA 含量上昇が持続するため好ましいと思われたが、雑菌汚染による官能の悪化が認められた。通常の千枚漬けの製造では、発

酵時の pH が 4.5～5.0 であり、雑菌の増殖が抑制されているが、*Lactobacillus* sp. L13 を使用した千枚漬けの製造では、グルタミン酸が脱炭酸反応により GABA に変換することに伴い pH が上昇する。そのため、L13 接種後 5 日目で pH 6.4 となり、GABA 非生産菌である雑菌が増殖した。

以上、試作の段階ではあるが、著者らは千枚漬け中に GABA を安定的に生産することに成功した。また、製造した千枚漬けの官能評価も良く、従来の千枚漬けよりも味、香り共にすぐれたものが製造できた。今後は、長期間発酵における雑菌汚染対策を行い、さらに GABA 含量を増加させた千枚漬けの製造が期待される。

また、*Lactobacillus* sp. L13 は、千枚漬けの製造だけではなく、その他の漬物製造へ利用できる可能性がある。また、本菌が漬物製造時にも漬物臭を生成しないことより、漬物以外のさまざまな食品への利用の他、グルタミン酸から GABA の工業生産など、広い応用が期待される。

要 約

古来の発酵法を用いて製造した京漬物、千枚漬けより γ -アミノ酪酸 (GABA) を高生産する乳酸菌が分離され、*Lactobacillus* sp. L13 と同定、命名した。本菌は、増殖にグルタミン酸を要求し、高濃度のグルタミン酸存在下で GABA を高生産した。培養液の pH を酸性 (pH 5) に維持すると、800 mM のグルタミン酸ナトリウムより 81% の変換率で、最大 650 mM (6.7%) の GABA を生産した。この乳酸菌をスターター菌として使用し、GABA を 0.1% 含有した千枚漬けを試作した。官能評価の結果、従来の製品よりも風味のすぐれた千枚漬けの製造が可能であることが示された。

文 献

- 1) 早川邦彦：食品工業, **31**, 59–64 (1988).
- 2) 早川 潔, 上野義栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平：生物工学, **75**, 239–244 (1997).
- 3) Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1168–1171 (1997).
- 4) Stanton, H. C.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **143**, 195–204 (1963).
- 5) 林 智, 斉藤ひろみ, 大森正司, 猪俣智夫, 加藤みゆき, 澤井祐典, 深津修一, 袴田勝弘：家政誌, **51**, 265–271 (2000).
- 6) Tsushida, T. and Murai, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2865–2871 (1987).
- 7) Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2291–2292 (1994).
- 8) Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122–1125 (1994).
- 9) 大久長範, 菅原真理, 阿部雪子, 熊谷昌則, 高橋砂織：食科工, **47**, 452–454 (2000).

- 10) Sasagawa, A., Naiki, Y., Nagashima, S., Yamakura, M., Yamazaki, A., and Yamada, A.: *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 27–33 (2006).
- 11) Oh, S.-H. and Choi, W.-G.: *J. Plant Res.*, **114**, 309–313 (2001).
- 12) 鵜澤昌好, 奥山知子, 村田真由美, 佐藤良二, 大森正司: 食科工, **49**, 573–582 (2002).
- 13) 奥山知子, 塚田陽康, 鵜澤昌好, 山田健二: 食科工, **51**, 703–707 (2004).
- 14) Ichimura, T., Yamanaka, A., Ichiba, T., Toyokawa, T., Komada, Y., Tamamura, T., and Maruyama, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 718–721 (2006).
- 15) 桐渕壽子: 家政誌, **43**, 165–168 (1992).
- 16) 渡辺敏郎, 山田貴子, 田中仁子, 姜 聖花, Mazumder, T. K., 永井史郎, 辻 啓介: 食科工, **49**, 166–173 (2002).
- 17) 風見大司, 小倉長雄, 辻 啓介, 穴澤麻梨, 前田浩明: 食科工, **50**, 138–140 (2003).
- 18) 土谷紀美, 西村賢了, 岩原正宣: 醸協, **97**, 878–882 (2002).
- 19) Yokoyama, S., Hiramatsu, J., and Hayakawa, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 95–97 (2002).
- 20) 井上美保, 石原伸治, 渡辺敏郎, 永井史郎, 辻 啓介: 醸協, **100**, 581–587 (2005).
- 21) Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T.: *Food Microbiology*, **22**, 497–504 (2003).
- 22) 辻 啓介, 市川富夫, 田中伸和, 阿部士朗, 樽井庄一, 中川靖枝: 農化, **66**, 1241–1246 (1992).
- 23) Kono, I. and Himeno, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 617–619 (2000).
- 24) Aoki A., Uda I., Tagami K., Furuya Y., Endo Y and Fujimoto K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 1018–1023 (2003).
- 25) Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y., and Fujimoto, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 1806–1808 (2003).
- 26) Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki I.: *J. Dairy Sci.*, **81**, 1846–1891 (1998).
- 27) Nomura, M., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki, I.: *Anim. Sci. J.*, **70**, J397–J402 (1999).
- 28) Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., and Yamori, Y.: *British Journal of Nutrition*, **92**, 411–417 (2004).
- 29) 小崎道雄, 内村 泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店, 東京 (1992).
- 30) Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G., and Kok, J.: *Mol. Microbiol.*, **27**, 299–310 (1998).