

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008 年 5 月 2 日 (02.05.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/050899 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/14 (2006.01) A61K 36/00 (2006.01)
A23L 1/202 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) C12G 3/02 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)

奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
内 Kanagawa (JP). 岡邊有紀 (OKABE, Yuki) [JP/JP]; 〒
2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素
株式会社内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/071173

(22) 国際出願日:

2007 年 10 月 24 日 (24.10.2007)

(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 2006-290685
2006 年 10 月 26 日 (26.10.2006) JP
特願 2007-110402 2007 年 4 月 19 日 (19.04.2007) JP

(74) 代理人: 高橋文子 (TAKAHASHI, Fumiko); 〒2108681
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
知的財産部内 Kanagawa (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株
式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315
東京都中央区京橋一丁目 1 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 桜井通成 (SAKU-
RAI, Michinari) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川
崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 藤
田要 (FUJITA, Kaname) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川
崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内 Kanagawa
(JP). 菱谷尚子 (HISHIYA, Naoko) [JP/JP]; 〒2108681 神

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: LIQUID KOJI AND QUICK-FERMENTED MISO TYPE FOOD MATERIAL

(54) 発明の名称: 液体麹及び速醸型味噌様食材

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing a salt-free *miso* type food material which has a strong taste of body with fullness and richness. To achieve this object, a liquid *koji* is prepared by culturing a *koji* mold in a definite amount of a liquid culture medium (or the supernatant thereof) of a lactic acid bacterium. The liquid *koji* thus obtained is added to a food material and *koji*-making is conducted in a closed *koji*-making machine while continuously or intermittently supplying sterilized air thereinto. Next, the obtained *koji* is blended with a liquid culture medium (or the supernatant thereof) of a lactic acid bacterium and, if necessary, an additional food material is further blended. The obtained mixture is processed into a *moromi* either as such or as a paste. Then, this *moromi* is hydrolyzed in the absence of sodium chloride.

(57) 要約: うま味、コクが強く、濃厚感がある無塩味噌様食材の製造方法を提供する。解決手段は、麹菌を所定量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して液体麹を調製する。このようにして得られた液体麹を食品素材に添加し、除菌された空気を連続的又は間欠供給しながら、密閉された状態の製麹機内で製麹する。次に、得られた麹に、乳酸菌培養液又はその上清を混合して、さらに必要により食品素材を混合し、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成し、該諸味を食塩非存在下で加水分解する。

WO 2008/050899 A1

明 細 書

液体麴及び速醸型味噌様食材

5 技術分野

本発明は雑菌の増殖を抑制しながら製造する液体麴と、それを使用して短時間で安定的に製麴を行い、うま味、コクが強く、濃厚感がある無塩味噌様食材、及び骨代謝改善組成物に関するものである。

10 背景技術

味噌等の伝統的な醸造発酵食品は、製造期間が長いことが知られている。近年、労働時間の短縮や休日の増加などが進んでおり、生産現場においては効率的な製造方法の開発が望まれている。設備投資等をせずに、効率的な製造開発を行う上で、最も大きなボトルネックとなるのは製麴工程であり、製麴工程の時間短縮が製造期間の短縮という点で全工程に与える効果は多大なものがある。

さて、製麴時間を短縮する方法として製麴温度を上昇させる方法がある。しかし、効果は高いが、原料や設備由来の汚染微生物、特にバチルス属細菌が増殖しやすい環境となり、結果として麴の品質低下を招くこととなる。この麴の品質低下は、最終製品の品質低下を招くことになり好ましくない。

20 また、伝統的な醸造発酵食品は仕込みの際に食塩を添加することにより、汚染微生物の増殖を阻止しているが、各種調味料やドレッシング類などに使用した場合に、内在していた汚染微生物がその製品中で増殖し、製品の変敗を招くこともある。

更に、近年、醸造発酵食品の有する健康機能について各種報告されており、中でも味噌は大豆イソフラボンが多く含まれていることや、抗癌作用に関する報告もあることから健康食品としての需要が期待される。しかしながら、味噌は著量の塩分を含むことから、味噌の多用は塩分の取りすぎにつながるという懸念が強く、需要は伸び悩んでいるのが現実である。

製麴時間が短縮され、かつ、低塩又は無塩の味噌又は味噌用食材の提供が長年望まれていた。製麴時間の短縮についてはいくつか報告があるが、短時間での製麴（一日～二日麴）では安定した品質の麴を得ることは難しいといわれている（非特許文献1）。例えば、製麴前に種麴の発芽を促進させて製麴を実施する方法が開示されているが（特許文献1）、実際の製麴時間の短縮については言及されていない。

5 また、製麴時間を短縮した麴と通常の製麴の麴を混合して使用する方法（非特許文献2）、製麴助剤の使用、酵素製剤の添加などによる品質改良方法（非特許文献3）が報告されているが何れも工業化されていない。

低塩味噌や無塩味噌の製法に関する従来技術として、希釈及び透析を行った低塩

10 味噌を使用して高蛋白含有食品を製造する方法（特許文献2）、味噌を水で希釈して脱塩味噌を製造する方法（特許文献3）、仕込み時にエタノールを加えて発酵させる方法（非特許文献4）などが報告されている。さらに、バクテリオシンの1種であるナisinを生産する乳酸菌を接種して乳酸発酵することにより、実験室規模において無塩味噌を調製する方法が報告されており、この方法ではバチルス及びそ

15 の他の汚染細菌は検出されなかったとされている（非特許文献5）。

しかしながら、実際の工業的規模での味噌の製造においては、ナisin生産乳酸菌を加えるだけでは、外気より混入する様々な微生物、特にペディオコッカス属細菌、エンテロコッカス属細菌などの乳酸菌が熟成中に著しく増殖し、それらの乳酸菌が産する乳酸によりpHが低下し、いわゆる酸敗が生じる。また、大腸菌群などが

20 属するグラム陰性菌に対しては、ナisinの抗菌効果は無いことから（非特許文献6）、ナisinだけではそれらの菌による変敗を有効に防ぐことはできない。すなわち、実験室規模での無塩味噌の調製は微生物制御の点で比較的容易であるが、工業規模の製造においては雑菌の制御は非常に困難であることから、工業規模での無塩味噌の製造は不可能に近いと考えられている。

25 非特許文献1には無塩味噌の工業生産について検討中との記載があるが、具体的な製造条件は開示されていない。勿論、本願発明の特徴の一つである製麴を密閉状態で行うことについて全く言及されていない。

また、特許文献4には回転加圧缶を用いて、麴原料（麴に添加される大豆等の食品素材）の原料処理すなわち散水、蒸煮、冷却及び製麴を同一装置で麴を製造する方法が開示され、その方法では出麴について雑菌が検出されなかったという報告がされている。しかしながら、実際に製造で使用する粉状種麴には汚染菌が 10^{3-5} cfu/gのレベルで混入していることが多く、工業的に安定して無菌性を保つのは困難なように思われる。更に特許文献4は麴の培養方法及び装置に関するものであり、食塩非存在下での諸味の分解すなわち無塩味噌の製造に関しては全く言及されていない。

一方、味噌の健康機能成分の一つであるイソフラボンは、大豆や通常の大豆食品中では糖のついた配糖体として存在し、摂取後、腸内細菌によって糖が外されたアグリコンとなって初めて体内へ吸収される（非特許文献7）。故に、もともと糖が外れているアグリコンとしてイソフラボンを摂取することが出来れば、腸内細菌に因らないイソフラボン機能の高発現が期待できる。

味噌などの大豆発酵食品においては、発酵中に麴菌の β グルコシダーゼによりイソフラボンのアグリコン化が起こる。しかし、通常、比較的高塩条件で製造される為、アグリコン化は短期間で進みにくいことが知られている。一般的な味噌のアグリコン化率は、米味噌で約65%、白味噌で約21%、あわせ味噌で約58%、麦味噌で約48%程度であり（非特許文献8）、高アグリコン化率の大豆発酵食品の開発が課題であった。

尚、大豆を麴原料とする豆味噌のアグリコン化率は約90%（非特許文献8）であるが、長期間（約2年）の熟成が必要と考えられ（非特許文献9）、短期間の熟成で高アグリコン化率が達成するという報告は存在しない。

特許文献1

特開2005-210903号公報

特許文献2

特開昭58-175463号公報

特許文献3

特開昭63-214154号公報

特許文献 4

特開平7-107966号公報

非特許文献 1

5 鵜木隆文 鹿児島県工業技術センター研究報告 No. 16 (2002)

非特許文献 2

早出昭雄 信州味噌研報告 43 p58-60 (1993)

非特許文献 3

秋本隆史 味噌の科学と技術 39 p. 355-363 (1991)

10 非特許文献 4

渡辺聡 北陸農業研究成果情報15 p. 169-170 (1999)

非特許文献 5

加藤丈雄 日本醸造協会誌 97 p. 615-623 (2002)

非特許文献 6

15 松田敏生 食品の非加熱殺菌応用ハンドブック p. 187

非特許文献 7

Setchell KD et al Am. J. Clin. Nutr. 76 2 p. 447-453 (2002)

非特許文献 8

戸田登志也ら FFI journal 172 p. 83-89 (1997)

20 非特許文献 9

木原ら 日本醤油研究所雑誌 17 1 p. 1-4 (1991)

発明の開示

本発明の目的は、1) 雑菌の増殖が抑制された液体麴、2) 当該液体麴を使用し
25 て得られる、うま味、こくが強く、濃厚感がある低塩又は無塩の速醸型味噌様食材
、及び3) 骨代謝改善作用を持つ組成物の提供である。

本発明者は、前記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、麴菌を5～500

倍量の乳酸菌培養液にて培養する方法を見出した。また、得られた麴菌培養液を食品素材に添加し、除菌された空気を連続的又は間欠供給しながら、密閉された状態の製麴機内で16～40時間製麴し、次に、得られた麴に、乳酸菌培養液若しくはその上清を混合して、さらに必要により麴重量の0.01～50倍量の1種類以上の食品素材を混合し、該混合物をそのまま若しくはペースト状にして諸味を形成することにより、うま味、コク、濃厚感が強い、新規無塩味噌様食材が得られることを見出した。更に、大豆を麴原料として製造された新規無塩味噌様食材には骨代謝改善作用があることを見出した。すなわち、本発明は以下を含む。

(1) 麴菌を5～500倍量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して得られる液体麴。

(2) 麴菌の培養条件が、培養温度が20～45℃、培養時間が6～30時間、であることを特徴とする(1)記載の液体麴。

(3) 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする(1)記載の液体麴。

(4) バクテリオシン産生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌である(3)記載の液体麴。

(5) (1)乃至(4)記載の液体麴を食品素材に添加する工程1と、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉された状態の製麴機内で20～45℃で16～40時間製麴する工程2と、このようにして得られた麴に、乳酸菌培養液又はその上清を混合し、さらに必要により麴重量の0.01～50倍量の1種類以上の食品素材を混合する工程3と、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成する工程4と、該諸味を実質的食塩非存在下で加水分解する工程5、を含むことを特徴とする速醸型味噌様食材。

(6) 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする(5)記載の速醸型味噌様食材。

(7) バクテリオシン産生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌である(6)記載の速醸型味噌様食材。

(8) (5) の工程 1 及び／又は工程 3 で使用される食品素材が米、麦、大豆及び大豆胚芽のいずれか 1 種以上である (5) 記載の速醸型味噌様食材。

(9) (5) の工程 1 で使用される食品素材が大豆であり、工程 3 で使用される食品素材が米である (5) 記載の速醸型味噌様食材。

5 (10) 速醸型味噌様食材に含まれる大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100% である (5) 記載の速醸型味噌様食材。

(11) 大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100% である速醸型味噌様食材を含有してなる骨代謝改善組成物。

(12) アグリコン化率が 80～100% である速醸型味噌様食材が、液体麴を大豆に添加する工程 1 と、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉された状態の製麴機内で 20～45℃ で 16～40 時間製麴する工程 2 と、このようにして得られた麴に、乳酸菌培養液又はその上清を混合し、さらに必要により麴重量の 0.01～50 倍量の 1 種類以上の食品素材を混合する工程 3 と、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成する工程 4 と、該諸味を実質的食塩非
10 存在下で加水分解する工程 5、を含むものである骨代謝改善組成物。

(13) 液体麴が麴菌を 5～500 倍量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して得られるものである (12) 記載の骨代謝改善組成物。

(14) 麴菌の培養条件が、培養温度が 20～45℃、培養時間が 6～30 時間、であることを特徴とする (13) 記載の骨代謝改善組成物。

20 (15) 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする (13) 記載の骨代謝改善組成物。

(16) バクテリオシン産生乳酸菌がナisin産生乳酸菌である (15) 記載の骨代謝改善組成物。

(17) (12) の工程 1 及び／又は工程 3 で使用される食品素材が米、麦、大豆及び大豆胚芽のいずれか 1 種以上である (12) 記載の骨代謝改善組成物。
25

(18) (12) の工程 1 で使用される食品素材が大豆であり、工程 3 で使用される食品素材が米である (12) 記載の骨代謝改善組成物。

(19) 骨代謝改善組成物が飲食品である(11)記載の骨代謝改善組成物。

本発明によると、無塩(又は実質的に食塩非存在下)で製造されるので麴菌のプロテアーゼ、ペプチダーゼなどの酵素活性が食塩で阻害されることが無いため、通常の味噌より極めて短い発酵熟成期間で、うま味、コク、濃厚感の強い、新規無塩味噌様食材を製造することができる。また、新規無塩味噌様食材の内、大豆を麴の原料として得た大豆イソフラボンのアグリコン化率が80~100%の新規無塩味噌様食材は骨代謝改善作用を有するので骨粗鬆症の予防、治療、改善への利用が期待できる。

本発明の味噌様食材は無塩(又は実質的に食塩非存在)であることから、健康感があり、かつ、汚染菌が存在しないことから安心であるというメリットがある。更に、くり返し述べるが、製造期間が大幅に短縮できるというメリットもある。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の組成物(試験サンプル)及び大豆非発酵素材を含む組成物(対照サンプル)をラットに与えた場合の尿中デオキシピリジノリン量を示した図である。

図2は、本発明の組成物(試験サンプル)及び大豆非発酵素材(対照サンプル)を含む組成物をラットに与えた場合の脛骨海綿骨密度を示した図である。

図3は、本発明の組成物(試験サンプル)及び大豆非発酵素材を含む組成物(対照サンプル)をラットに与えた場合の体重あたりの脛骨Ca重量を示した図である。

図4は、本発明の組成物(試験サンプル)及び大豆非発酵素材を含む組成物(対照サンプル)をラットに与えた場合の尿中総イソフラボン量を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、麴菌を培養する乳酸菌培養液としては一般的な乳酸菌であれば良く、例えばラクトバチルス属菌、ラクトコッカス属菌、ワイセラ属菌などの培養液を用いることができる。その中でもバクテリオシンを産生する乳酸菌が好ましい

。

更に、バクテリオシンの中でも、その抗菌スペクトルの広さからナイシンがより望ましいと言えるので、ナイシンを生産する乳酸菌培養液を用いるが最も好ましい。尚、乳酸菌が生産するナイシンの種類はナイシンA、ナイシンZならびにその類縁
5 体のどれでもかまわない。

具体的には、ナイシンZを高生産する*Lactococcus lactis* AJ 110212 (FERM BP-8552) 等を使用することができる。尚、*L. lactis* AJ 110212 株は2003年11月19日に独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番
10 地1 中央第6）にブダペスト条約に基づく国際寄託FERM BP-8552の受託番号で寄託されている。

当然のことながら、微生物の混入、増殖を防ぐには使用する乳酸菌培養液又はその上清中にバクテリオシンが含まれており、しかも、その活性も高い方が望ましい
15 。

ナイシン活性は200 IU/ml 以上であればよく、通常、ナイシン活性が200~2000 IU/ml の培養液又はその上清を、麴菌の5~500倍重量、好ましくは10~200倍重量、より好ましくは20~100倍重量添加すればよい。

5倍重量より少ない場合では、麴菌を乳酸菌培養液中に均一に分散し難くなる為
20 抗菌作用が少なく雑菌の汚染を免れない。また、対麴の500倍重量を超える場合では、水分含量が多くなり、次工程に使用する培養液の麴菌体濃度が低くなり製麴工程の遅延が生じる。

また、使用する麴菌は原料の蛋白質をアミノ酸、ペプチドまで高分解し、得られる新規味噌様食材に強いうま味、コク、濃厚感を与えることができるものが望まし
25 いが、特に制限を設けるものではない。例えば、味噌の製造に用いられる*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus sojae*等のアスペルギルス属麴菌を使用することができる。

麴菌の5～500重量部の乳酸菌培養液又はその上清中で培養して液体麴を調製するが、そのときの培養条件は特に限定させるものではない。即ち、麴菌の培養条件は通常、麴菌を培養する条件をそのまま用いればよい。例えば、培養温度としては20～45℃で培養を行うのが好ましい。20℃以下、又は45℃以上では麴菌の生育が著しく悪化するからである。20～45℃で培養するならば、通常、培養時間は6～30時間でよい。6時間未満では菌の発芽が殆ど見られず、製麴時間を短縮することが出来ない。また、培養時間が30時間以上では菌糸の生育が旺盛で後述する工程1において食品素材に対して培養液を混合するのが困難となるからである。

- 10 さて、麴菌を乳酸培養液又はその上清で培養することで調製した液体麴を麴原料と呼ばれる食品素材に添加、混合する（工程1）。液体麴の添加量は特に限定されるわけではないが、通常、麴原料に対して0.1～10重量%、好ましくは0.5～5重量%添加するのが好ましい。

- 15 次に、この混合物を除菌された空気を供給でき、密閉できる製麴機に盛込む。除菌された空気が供給でき、密閉できる製麴機とは、製麴機内に除菌された空気を供給する機能を持ち、製麴機内部と外気を遮断できる構造を持つものであればよい。例えば、回転ドラム式製麴機が挙げられるが、除菌された空気を製麴機内部に供給する構造を持ち、密閉状態が得られる開閉可能な蓋付の製麴機のほうが、構造がシンプルで安価なため好ましい。

- 20 麴原料としては、通常の味噌を調製する時に用いる食品素材、即ち、大豆、米、麦、大豆胚芽などを用いればよい。また、必要により、これらの原料を水浸漬処理、脱皮処理、細断処理等の前処理、蒸煮処理、焙煎処理等の過熱処理をしたものを用いてもかまわない。

- 25 本発明の特徴の1つは除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉された状態で製麴すること（工程2）である。空気の除菌方法は0.3μm以上の塵を99.97%以上集塵できるフィルター、例えばHEPAフィルターなどを用いることができる。通風の方法は特に限定されるものではなく、内部通風方式、表面通

風方式などを用いることができる。

尚、密閉できない製麴機、例えば円盤回転式製麴機、静置通風式製麴機などは、外気からの微生物の混入を免れず、特にベディオコッカス属細菌、エンテロコッカス属細菌などの乳酸菌が混入し、その結果、熟成中に乳酸を生産して、いわゆる酸敗を招く場合があり、可能なかぎり使用しない方がよい。

麴原料と液体麴（麴菌培養液）の混合物を製麴機内に盛り込んだ後、製麴機内を密閉した状態で、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、25～40℃で16～40時間、好ましくは34～40℃で22～31時間培養し麴を得る（工程2）。尚、製麴温度が40℃を超えると原料蛋白質の分解に必要な酵素活性が低くなり、又、温度が25℃未満になると麴菌の生育が悪くなる。いずれの場合も原料蛋白質の分解に必要な酵素を充分得られず、充分なうま味、コク、濃厚感を持った新規味噌様食材を得ることができない。

また、製麴時間が16時間未満では麴菌を充分生育させることが困難であり、充分なうま味、コク、濃厚感を持った新規味噌様食材を得ることができない。また、製麴時間が40時間を越えると原料蛋白質の分解に必要な酵素活性が低くなり、充分なうま味、コク、濃厚感が得られないばかりか、苦味が付与される。

次に、得られた麴に乳酸菌培養液又はその上清を諸味の水分含量が35～60%、好ましくは40～50%となるように添加する。具体的には、麴重量の0.01～5倍量、好ましくは0.1～1.0倍量添加すればよい。

また、必要により1種類以上の食品素材を麴重量の0.01～50倍量添加し、諸味の形成を行う（工程3）。麴に添加し諸味を形成する食品素材（諸味原料と呼ばれる）も通常の味噌に用いられる大豆、米、麦、大豆胚芽などである。この場合、「必要により」とは、麴の原料を大豆とした豆麴を用いる場合は、諸味の形成において再度大豆は添加しなくてもよい場合があることを意味する。すなわち、麴の原料を大豆とした場合は、大豆、乳酸菌培養液又はその上清、麴菌からなる混合物を製麴した麴に、再び乳酸菌培養液又はその上清を添加し、諸味を形成することになる。

また、麴に食品素材、例えば大豆、米、麦、大豆胚芽などを加えてもよい。その場合、あらかじめ蒸煮、もしくは炒煎したものを用いることもできる。例えば、麴の原料を米や麦とした米麴や麦麴を用いる場合、あらかじめ蒸煮もしくは炒煎した大豆を添加することができる。あるいは、豆麴を用いる場合、あらかじめ蒸煮もしくは炒煎した麦や、米を添加することができる。また、それぞれの植物原料の抽出物、またはその特定成分を加えることもできる。例えば大豆抽出物、米デンプン、小麦ふすまなどが例として挙げられる。

また、この食品素材の種類、及び添加量により、色のほか、呈味、風味などをコントロールすることができるが、例えば米を添加することにより、甘味を付与することができる。特に、麴原料として大豆を用い、また、工程 3 で食品素材として米を添加したものは呈味、風味が優れている。

乳酸菌培養液又はその上清、米や麦等の食品素材を麴へ添加する順序は任意であり、麴へ食品素材を添加するのは、乳酸菌培養液又はその上清を麴に添加する前でも、後でも、また同時でもよい。

15 乳酸菌培養液又はその上清の添加量であるが、上述したように、麴重量の 0.01～5 重量部添加するのが通常である。0.01 倍量未満では、微生物の増殖を抑えきれない。また、5 倍量を超えると、蛋白質の分解が充分でなく、充分なうま味、コク、濃厚感を持った新規味噌様食材を得ることができないからである。

次に、麴、ナイシン乳酸菌培養液若しくはその上清、必要により 1 種類以上の食品素材からなる混合物をチョッパーなどですり潰し、ペースト状にして諸味を形成する（工程 4）。その諸味を無塩下（又は実質的に食塩非存在下）で 20～50℃、好ましくは 20～45℃、より好ましくは 30～40℃に保温し、1～50日間、好ましくは 4～30日間、より好ましくは 7～21日間、さらに好ましくは 10～17日間発酵熟成し、加水分解する（工程 5）。

25 温度が 20℃未満では蛋白質の分解が充分でなく、充分なうま味、コク、濃厚感を持った新規味噌様食材を得ることができない。また、50℃を超える温度では諸味に含まれる糖とアミノ酸が反応して、新規味噌様食材に褐変臭、焦げ臭、苦味が

生じ好ましくない。

熟成の日数についても同様の傾向があり、24時間未満であれば蛋白質の分解が充分でなく、充分なうま味、コク、濃厚感を持った新規味噌様食材を得ることができない。また、50日間以上では諸味に含まれる糖とアミノ酸が反応して、新規味噌様食材に褐変臭、焦げ臭、苦味が生じ好ましくない。また、諸味をラミネートパウチ、プラスチック容器等に充填包装する等、諸味の加水分解は密閉系内で行なうのが雑菌汚染防止の観点でより好ましい。

次に、必要な場合は熟成、加水分解が終了した諸味を、50～130℃で1～150分間加熱する。加熱の目的は、殺菌、及び諸味に含まれるプロテアーゼなどの酵素を失活させ、保存中の品質変化を防ぐことである。加熱の方法は限定されるものではなく、例えば味噌の火入れに使用される二重管式加熱機、多管式加熱機などが使用でき、又、諸味をパウチ等に充填包装した上で湯浴なども使用することができる。50℃未満では殺菌及び酵素の失活が充分でなく、130℃を超えると、褐変臭、焦げ臭、苦味が生じ好ましくない。時間についても同様の傾向があり、1分間未満では殺菌及び酵素の失活が充分でなく、150分を超えると、褐変臭、焦げ臭、苦味がついて好ましくない。

本発明の方法で得られる味噌様食材はペースト状のまま使用することができるが、またスプレードライヤー、ドラムドライヤー、バキュームドラムドライヤー、フリーズドライヤーなどで乾燥させ、粉末として使用することもできる。本発明の方法で得られる新規味噌様食材の使用形態は、各種飲食品の製造又は加工時に配合使用する形態、液状又は顆粒状、粉末状の各種調味料に配合して使用する方法、そのまま喫食する形態等が挙げられる。

本発明の方法で得られる味噌様食材は、無塩（又は実質的に無塩）であり、強いうま味、コク、濃厚感を有し、ムレ臭、収斂味が低減されているので、味噌汁のみならず各種の飲食品に幅広く利用できる。味噌の場合、含まれる塩分により、大量に摂取することはできないが、本味噌様食材は無塩（又は実質的に無塩）であるので大豆に含まれる健康機能成分を多量に摂取することができる。また、大豆を麴原

料として本発明の方法により調製した速醸型味噌様食材はイソフラボンのアグリコン化率 80～100%であるので、イソフラボンが吸収されやすいというメリットがあり、イソフラボン機能の高発現、具体的には骨代謝改善機能の高発現が期待される。

- 5 本発明の骨代謝改善組成物は大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100%である速醸型味噌様食材を含有することが特徴である。大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100%である速醸型味噌様食材であれば、如何なる製法で調製されたものでも、本発明の骨代謝改善組成物として用いることが出来る。

10 しかし、アグリコン化率が 80～100%である速醸型味噌様食材は上述した製造法、即ち、液体麴を大豆に添加する工程 1 と、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉された状態の製麴機内で 20～45℃で 16～40 時間製麴する工程 2 と、このようにして得られた麴に、乳酸菌培養液又はその上清を混合し、さらに必要により麴重量の 0.01～50 倍量の 1 種類以上の食品素材を混合する工程 3 と、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成する工程 4 と
15 、該諸味を実質的食塩非存在下で加水分解する工程 5、を含む製造法で調製されたものが好ましい。

尚、麴菌は 5～500 重量部の乳酸菌培養液又はその上清中で培養して液体麴を調製すること、麴菌の培養条件は培養温度が 20～45℃、培養時間が 6～30 時間が好ましいこと、乳酸菌がバクテリオシン産生菌であること、バクテリオシン産
20 生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌であることが好ましいこと、工程 1 及び／又は工程 3 で使用される食品素材が米、麦、大豆及び大豆胚芽のいずれか 1 種以上であること、更に、工程 1 で使用される食品素材が大豆であり、工程 3 で使用される食品素材が米であることが好ましいことは、上述した通りである。

本発明の骨代謝組成物はそのまま食しても良いが、ジュース、スープ、味噌汁、
25 クッキー、だんご等の各種飲食品の形に加工して食してもよい。

(実施例)

以下、本発明を実施例に従って説明する。勿論、本発明は実施例に限定されるも

のではない。

(実施例 1)

ナイシンZ高生産乳酸菌である *Lactococcus lactis* AJ 1 1 0 2 1 2 (FERM BP-8 5 5 2) の培養液 1 0 0 g に、粉状種麴 (ビオック社製) 2. 5 g を混合し、3 5 °C で 1 8 時間培養して液体麴を調製した。このときのナイシン活性は 1 3 5 0 IU/ml であった。

また、対象区として水 1 0 0 g に粉状種麴 2. 5 g を混合したものを調整し、同様に 3 5 °C で 1 8 時間培養した。

培養終了後の汚染菌数及び発芽率の結果を表 1 に示した。表 1 記載の通り、水で培養した種麴からは、バチルス属細菌等の汚染菌が検出されたが、乳酸菌培養液で培養した種麴からは乳酸菌以外の雑菌は検出されなかった。また、発芽率に関しては、水、乳酸菌培養液どちらを使用した場合にも差が見られなかった。

表 1

種麴培養用液	汚染菌種: 菌数 (cfu/ml)	発芽率
水	バチルス sp.: 1×10^4 スタフィロコッカス sp.: 2×10^6 エンテロバクター sp.: 3×10^4	45. 5%
乳酸菌培養液 (<i>L.lactis</i> AJ110212)	<20	42. 5%

(実施例 2)

実施例 1 と同じナイシンZ高生産乳酸菌である *Lactococcus lactis* AJ 1 1 0 2 1 2 (FERM BP-8 5 5 2) 培養液 4 0 g に、粉状種麴 (ビオック社製) 1 g を混合し、3 5 °C で 1 8 時間培養して液体麴を調製した。尚、ナイシン活性は 1 2 5 0 IU/ml であった。

このとき、種麴由来の汚染菌である、表 2 記載の菌を種麴 1 g あたり 1×10^2

個となるよう添加し強制的に汚染された状態とした。培養終了後の汚染菌数の結果を表 2 に示す。表 2 記載の通り、全ての添加した菌が検出されなかった。

表 2

汚染菌種	18時間培養後菌数(cfu/ml)
バチルス sp.	<20
スタフィロコッカス sp.	<20
エンテロバクター sp.	<20

5

(実施例 3)

実施例 1 と同じナイシン[®]高生産乳酸菌である *Lactococcus lactis* AJ110212 (FERM BP-8552) 培養液 0.2 kg (ナイシン活性 1500 IU/ml) に、粉状種麴 (*Aspergillus oryzae*, ビオック社製) 0.005 kg を混合し、35℃で18時間培養して液体麴を調製した。

一方、大豆 5.0 kg を水に浸漬し、吸水させた後、蒸煮釜にて114℃、30分蒸煮した。この蒸煮大豆に前述の培養液を混合し、密閉できる製麴機に盛込み、35℃、湿度90%で16～31時間密閉された状態の製麴機内で製麴した。製麴中の発酵熱の除熱のためにHEPAフィルターを通して除菌した空気を連続的に通風した。

次に、100℃、50分の蒸煮後、常温まで冷却した米と大豆胚芽を5.4 kg 添加し、同じ乳酸菌 (*Lactococcus lactis* AJ110212、FERM BP-8552) 培養液を1861 g を添加した後、混合物をチョッパーにより粉碎、ペースト状とした。このペーストをラミネートパウチに1袋につき5 kg となるように充填した。このパウチを35℃、14日間保温後、味噌様食材を調製した。

以上の操作によって取得した味噌様食材の微生物分析を行った。また、3名から

なる専門の官能評価パネルによる官能評価を行った。官能評価は10%の水溶液で評価し、官能評点は5点を満点として3点以上を合格とした。評価項目はうま味（濃厚感）、コク、酸味、苦味であり、それらの総合評価を行った。その結果を表3に示す。その結果、製麴時間16時間以上で官能合格となり、22時間以上で官能良好となった。

表3

製麴時間(時間)	16	19	22	25	28	31
官能評点	3.0	3.5	4.0	5.0	5.0	5.0

10 (実施例4)

実施例1と同じナイシンZ高生産乳酸菌である*Lactococcus lactis* AJ110212 (FERM BP-8552) 培養液2kg (ナイシン活性 850 IU/ml) に、粉状種麴 (ビオック社製) 40gを混合し、35℃で18時間培養し液体麴を調製した。一方、大豆40kgを水に浸漬し、吸水させた後、蒸煮釜にて114℃、30分蒸煮した。この蒸煮大豆に前述の培養液を混合し、密閉できるラボ製麴機に盛込み、35℃、湿度90%で25時間密閉された状態の製麴機内で製麴した。製麴中の発酵熱の除熱のため、HEPAフィルターを通して除菌した空気を連続的に通風した。本麴中の汚染菌数を確認した。

次に100℃、50分の蒸煮後、常温まで冷却した米と大豆胚芽を55kg添加し、先程と同じ乳酸菌 (*Lactococcus lactis* AJ110212、FERM BP-8552) 培養液を3kg添加した後、混合物をチョッパーにより粉碎、ペースト状とした。このペーストをラミネートパウチに1袋につき5kgとなるように充填した。このパウチを35℃、14日間保温後、味噌様食材を調製した。

以上の操作によって取得した味噌様食材と、市販の味噌についてイソフラボン量

(配糖体、アグリコン) 分析を行った。また、2名からなる専門の官能評価パネルによる官能評価を行った。官能評価は5%の水溶液として行った。なお、その際の食塩濃度は1%に補正した。その結果を表4に示す。官能評価の基準は実施例3と同じである。

- 5 評価の結果、市販味噌は、うま味、コク、濃厚感も弱かったのに対し、新規味噌様食材はコクがあり濃厚感が強かった。また、イソフラボンについても市販味噌では吸収性の良いとされるイソフラボンアグリコンの比率が35%であったのに対し、新規味噌様食材では99%と高い値を示していた。

10 表4

イソフラボン量		新規味噌様食材	市販米味噌
総イソフラボン	mg/100g	126	73
アグリコン	mg/100g	125	26
配糖体	mg/100g	1	48
アグリコン／総イソフラボン	(%)	99	35
官能評価		新規味噌様食材	市販米味噌
官能評点		5.0	3.5

(実施例5)

- 大豆21kgを水に浸漬し、吸水させた後、蒸煮釜にて114℃、30分蒸煮した。蒸煮大豆を密閉製麹機に投入し、さらにLactococcus lactis AJ110212 (FERM BP-8552) 培養液 (ナイシン活性3000IU/ml) 420g、種麹 (Aspergillus oryzae、ビオック社製) 21gを混合し、30℃、43時間製麹した。

製麹中の発酵熱の除熱にはHEPAフィルターを通して除菌した空気を用いた。

- 得られた麹にLactococcus lactis AJ 110212 (FERM BP-8552) 培養液 (ナイシン活性3000IU/ml) を6.79kg添加し、混合した後、チョッパーにより粉砕、ペースト状とした。このペーストをラミネートパウチに1袋につき1kgとなるように充填した。このパウチを30℃、7日間保温後、80℃、55分間加熱

した。このペースト 32 kg に賦形剤としてデキストリン 8.8 kg 及び適量の水を添加し、斜軸ニーダーにて混合した。得られた調製液をバキュームドラムドライヤーにて乾燥させ、本発明の味噌様食品素材を含有する組成物約 24 kg を作製した。尚、味噌様食品素材は無塩条件下で調製した。

- 5 尚、このように調製した味噌様食品素材のアグリコン化率は 100 % であった。
 (実施例 6)

上記実施例 5 で調製した本発明の組成物を試験サンプルとし、これを配合比 59 % で餌に混ぜて卵巢摘出ラット（閉経後骨粗鬆症モデル）に摂取させ、本発明の組成物の長期摂取が卵巢摘出ラットの骨代謝を改善するか否かを検討した。

- 10 対照として、原料大豆を水で蒸煮し、ペースト状にした大豆非発酵素材を同様に粉末化したものを使用した。すなわち、大豆 28 kg を水に浸漬し、吸水させた後、蒸煮釜にて 114℃、40 分蒸煮し、チョッパーにより粉碎したペースト状にした。得られたペースト 32 kg に賦形剤としてデキストリン 8.8 kg 及び適量の水を添加し、斜軸ニーダーにて混合した。得られた調製液をバキュームドラムドライヤーにて乾燥させ、粉末状大豆非発酵素材を含有する組成物（対照サンプル）約 24 kg（アグリコン化率 5 %）を作製した。

- 以下、試験方法の詳細を示す。8週齢雌性SD系ラットに、卵巢摘出術（OVX）を施した。術後経過の良好なラットを体重に差が出ないように分け、一方には試験区として本発明組成物（試験サンプル）を、もう一方には対照区として大豆非発酵素材を含む組成物（対照サンプル）を、餌に混ぜて8週間摂取させた。

20 また、正常群として偽手術（Sham）を施す群を設定し、大豆非発酵素材を含む組成物（対照サンプル）を餌に混ぜて摂取させた。

- いずれの飼料とも、飼料中のイソフラボン含量が 228 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ （ラットの摂取量に直すと約 120 $\mu\text{mol}/\text{kgBW}$ ：BWとはBody Weight、即ち、体重である）となるよう、本発明組成物（試験サンプル）を 59 %、大豆非発酵素材を含む組成物（対照サンプル）を 61 % 配合とした。このうち、本発明組成物（試験サンプル）のイソフラボン は 100 % アグリコンであり、大豆非発酵素材を含む組成物（対照サ

ンプル) のイソフラボンは5 %がアグリコン、残り95 %が配糖体であることを分析により確認した。

飼料中、脂質11 %、カルシウム0.5 %、リン0.3 %とし、総窒素含量も全群でそろえた。尚、いずれの飼料にもカルシウムの吸収を促進または阻害する物質等の添加は行っていない。

OVXにより骨吸収の過度な亢進が起こることが多く報告されている。そこで、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリンを測定した。

すなわち、本発明組成物(試験サンプル)を配合した飼料をOVXラットに、大豆非発酵素材を含む組成物(対照サンプル)を配合した飼料をOVXラットとShamラットに、3週間摂取させ、3週間後に24時間蓄尿を行った。尚、各区はそれぞれ10匹のラットからなる。

得た尿を用いて、市販のキットであるオステオリンクス(DPD)(住友製薬バイオメディカル(株)製)を用いて、デオキシピリジノリン量を測定した。得られた値は尿中クレアチニン値により補正した。

結果、OVXラットは、Shamラットに比べて、尿中デオキシピリジノリン量が有意に増加した。また、OVXラットにおいては、試験区ラットの方が対照区ラットに比べ、デオキシピリジノリン量の増加が有意に抑制されていた(図1)。より詳細に述べると、OVX処理を行った試験区ラットはShamラットに比較して危険率0.01以下で有意差があった(図1中の(1)に相当)。また、OVX処理を行った対照区ラットはShamラットに比較して危険率0.0001以下で有意差があった(図1中の(2)に相当)。更に、OVX処理を行った試験区ラットはOVX処理を行った対照区ラットに比べて危険率0.01以下で有意差があった(図1中の(3)に相当)。尚、統計値はmeans + SEMである。

これより、本発明の組成物(試験サンプル)は、OVXにより過度に亢進する骨吸収を、対照サンプルである大豆非発酵素材を含む組成物に比べて、有意に抑制することを確認した。

本発明組成物(試験サンプル)を配合した飼料をOVXラットに、大豆非発酵素材

を含む組成物（対照サンプル）を配合した飼料をOVXラットとShamラットに、8週間摂取させた後に、ラットの右脛骨を摘出し、XCT Research SA+（Stratec社製）を用いて、pQCT法により脛骨端部の海綿骨密度を測定した。各区はそれぞれ10匹のラットからなる。

- 5 結果、OVXラットは、Shamラットに比べて、脛骨海綿骨密度が有意に低下したが、OVXラットにおいては、試験区ラットの方が対照区ラットに比べ、骨密度の低下が少ない傾向がみられた（図2）。

より詳細に述べると、OVX処理を行った対照区ラットも、試験区ラットもShamラットに比較して危険率0.0001以下で有意差があった（図2中の（1）に相当）
10 ）。尚、統計値はmeans + SEMである。

本発明組成物（試験サンプル）を配合した飼料をOVXラットに、大豆非発酵素材を含む組成物（対照サンプル）を配合した飼料をOVXラットとShamラットに、8週間摂取させた後に、ラットの左脛骨を摘出し、乾燥（110℃、12時間）、灰化（680℃、24時間）させ、希塩酸に溶解させたサンプルについて、市販のキット
15 であるC-テストワコー（和光純薬工業（株）製）を用いてカルシウム（Ca）重量を測定した。尚、各区のラット数はそれぞれ10匹である。

結果、OVXラットは、Shamラットに比べて、脛骨Ca量が有意に低下したが、OVXラットにおいては、試験区ラットの方が対照区ラットに比べ、脛骨Ca量の低下が有意に抑制されていた（図3）。図中の値は体重あたりの値である。

- 20 より詳細に述べると、OVX処理を行った対照区ラットも、試験区ラットもShamラットに比較して危険率0.0001以下で有意差があった（図3中の（1）に相当）。また、OVX試験区ラットはOVX対照区ラットに比べて、危険率0.05以下で有意差があった（図3中の（2）に相当）。尚、統計値はmeans + SEMである。

以上より、本発明の組成物は、対照サンプルである大豆非発酵素材を含む組成物
25 に比べて、OVXによる過度な骨吸収を抑制し、骨密度及び骨Ca量を改善するなどの骨代謝改善作用を示すことが強く示唆された。

本発明組成物（試験サンプル）を配合した飼料をOVXラットに、大豆非発酵素材

を含む組成物（対照サンプル）を配合した飼料をOVXラットとShamラットに、8週間摂取させた。各区ともラット数はそれぞれ10匹である。摂取8週間後に、採尿し、イソフラボン量を分析した。すなわち、イソフラボンは生体内では主として抱合体として存在しているため、まず β -グルクロニダーゼで加水分解し、酢酸エチルにて抽出した後、カラムスイッチングHPLCを用いて分析を行った。得られた値は尿中クレアチニン値により補正した。

結果、試験区ラットは対照区ラットに比べ、尿中の総イソフラボン量が高い傾向がみられた（図4）。より詳細に述べると、図4中のOVX処理を行った試験区ラットはOVX処理を行った対照区ラットに比較して危険率0.1以下で傾向がみられた。（図4中の（1）に相当）。

これより、本発明の組成物は、対照サンプルである大豆非発酵素材を含む組成物に比べて、イソフラボンの吸収が向上することが示唆された。

以上より、本発明の組成物で示唆された骨代謝改善作用は、イソフラボンの吸収向上に起因することも示唆され、本発明の組成物の有用性を強く確認した。

産業上の利用可能性

本発明の方法を利用することにより、製麹工程の短縮化を行い、生産効率を高めることができる。また、新規味噌様食材は、強いうま味、コク、濃厚感がある。このように、本発明により得られる新規味噌様食材は優れた呈味効果から調味料用途、食材として使用できる。具体的には、つゆ、たれ類などの各種調味料や、スープ類、菓子類を含む加工食品への広範囲の利用が期待できる。従って、本発明は工業上、特に食品分野において極めて有用なものと考えられる。またイソフラボンアグリコン化率80～100%の本発明の味噌様食材を含有する組成物はそのまま又は飲食品として利用すると、骨代謝改善作用を有するので、骨粗鬆症の予防や治療に優れた健康価値を与えるものとして有用であると考えられる。

請 求 の 範 囲

1. 麴菌を5～500倍量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して得られる液体麴。
5
2. 麴菌の培養条件が、培養温度が20～45℃、培養時間が6～30時間、であることを特徴とする請求項1記載の液体麴。
3. 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする請求項1記載の液体麴。
10
4. バクテリオシン産生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌である請求項3記載の液体麴。
15
5. 請求項1乃至4記載の液体麴を食品素材に添加する工程1と、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉された状態の製麴機内で20～45℃で16～40時間製麴する工程2と、このようにして得られた麴に、乳酸菌培養液又はその上清を混合し、さらに必要により麴重量の0.01～50倍量の1種類以上の食品素材を混合する工程3と、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成する工程4と、該諸味を実質的食塩非存在下で加水分解する工程5、を含むことを特徴とする速醸型味噌様食材。
6. 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする請求項5記載の速醸型味噌様食材。
20
7. バクテリオシン産生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌である請求項6記載の速醸型味噌様食材。
8. 請求項5の工程1及び／又は工程3で使用される食品素材が米、麦、大豆及び大豆胚芽のいずれか1種以上である請求項5記載の速醸型味噌様食材。
9. 請求項5の工程1で使用される食品素材が大豆であり、工程3で使用される食品素材が米である請求項5記載の速醸型味噌様食材。
25
10. 速醸型味噌様食材に含まれる大豆イソフラボンのアグリコン化率が80～100%である請求項5記載の速醸型味噌様食材。

- 1 1. 大豆イソフラボンのアグリコン化率が80～100%である速醸型味噌様食材を含有してなる骨代謝改善組成物。
- 1 2. アグリコン化率が80～100%である速醸型味噌様食材が、液体麴を大豆に添加する工程1と、除菌された空気を連続的又は間欠的に供給しながら、密閉さ
- 5 れた状態の製麴機内で20～45℃で16～40時間製麴する工程2と、このようにして得られた麴に、乳酸菌培養液又はその上清を混合し、さらに必要により麴重量の0.01～50倍量の1種類以上の食品素材を混合する工程3と、該混合物をそのまま又はペースト状にして諸味を形成する工程4と、該諸味を実質的食塩非存在下で加水分解する工程5、を含むものである骨代謝改善組成物。
- 10 1 3. 液体麴が麴菌を5～500倍量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して得られるものである請求項12記載の骨代謝改善組成物。
- 1 4. 麴菌の培養条件が、培養温度が20～45℃、培養時間が6～30時間、であることを特徴とする請求項13記載の骨代謝改善組成物。
- 1 5. 乳酸菌がバクテリオシン産生菌であることを特徴とする請求項13記載の骨
- 15 代謝改善組成物。
- 1 6. バクテリオシン産生乳酸菌がナイシン産生乳酸菌である請求項15記載の骨代謝改善組成物。
- 1 7. 請求項12の工程1及び／又は工程3で使用される食品素材が米、麦、大豆及び大豆胚芽のいずれか1種以上である請求項12記載の骨代謝改善組成物。
- 20 1 8. 請求項12の工程1で使用される食品素材が大豆であり、工程3で使用される食品素材が米である請求項12記載の骨代謝改善組成物。
- 1 9. 骨代謝改善組成物が飲食品である請求項11記載の骨代謝改善組成物。

図 1

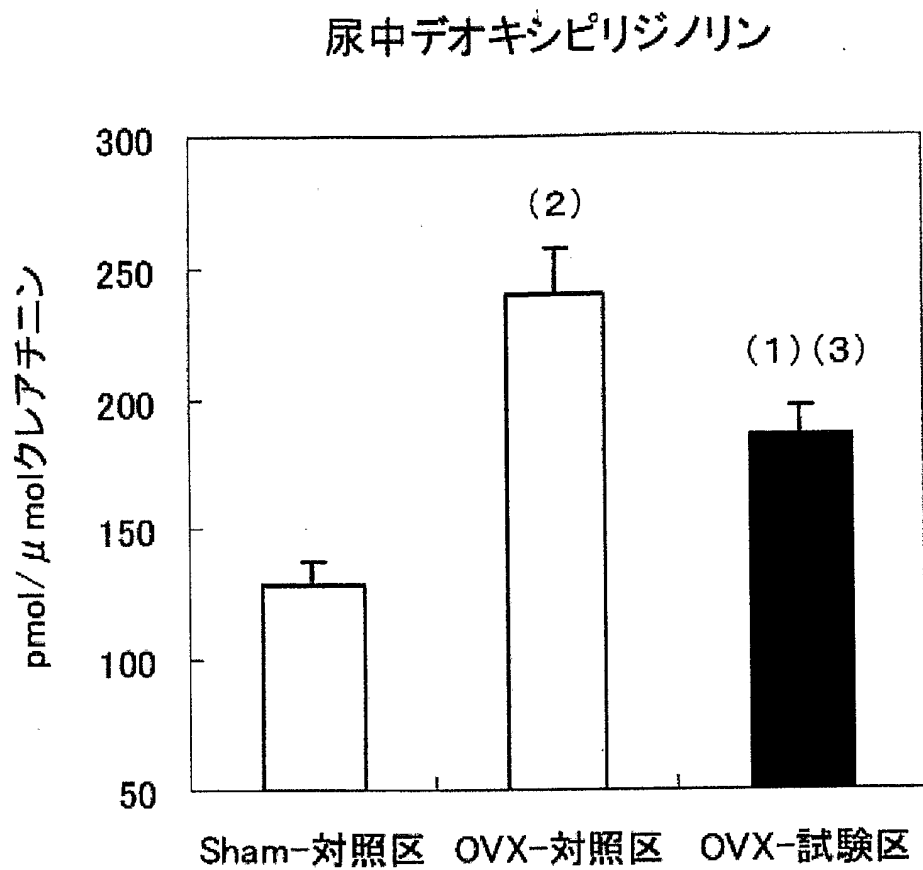


図 2

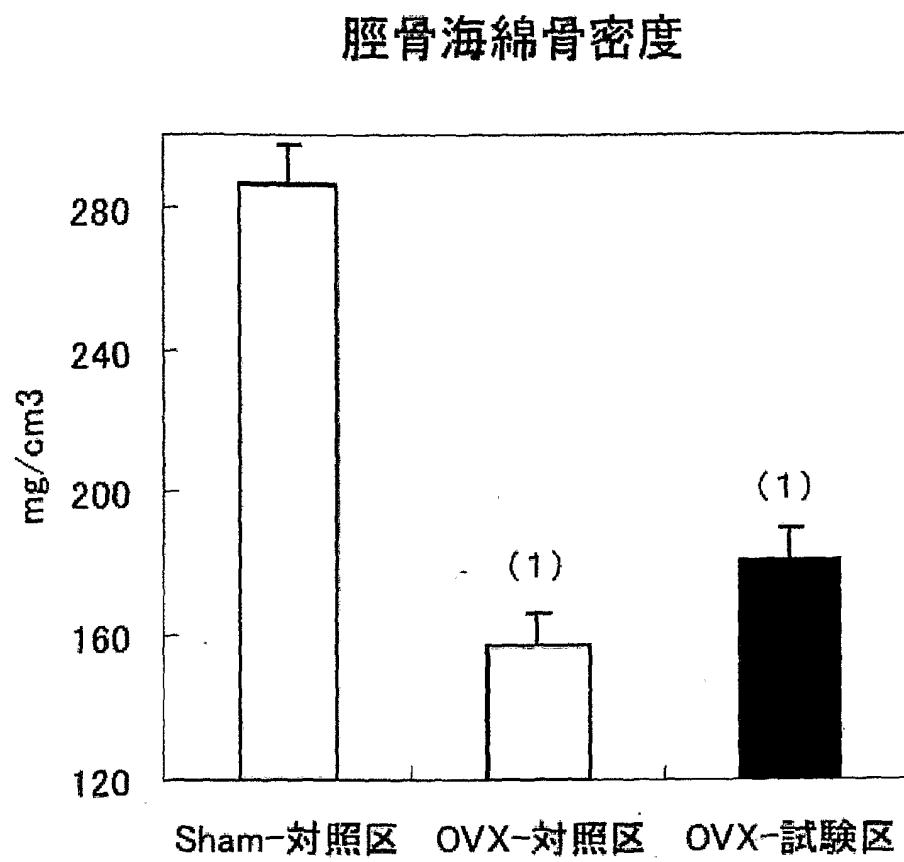


図 3

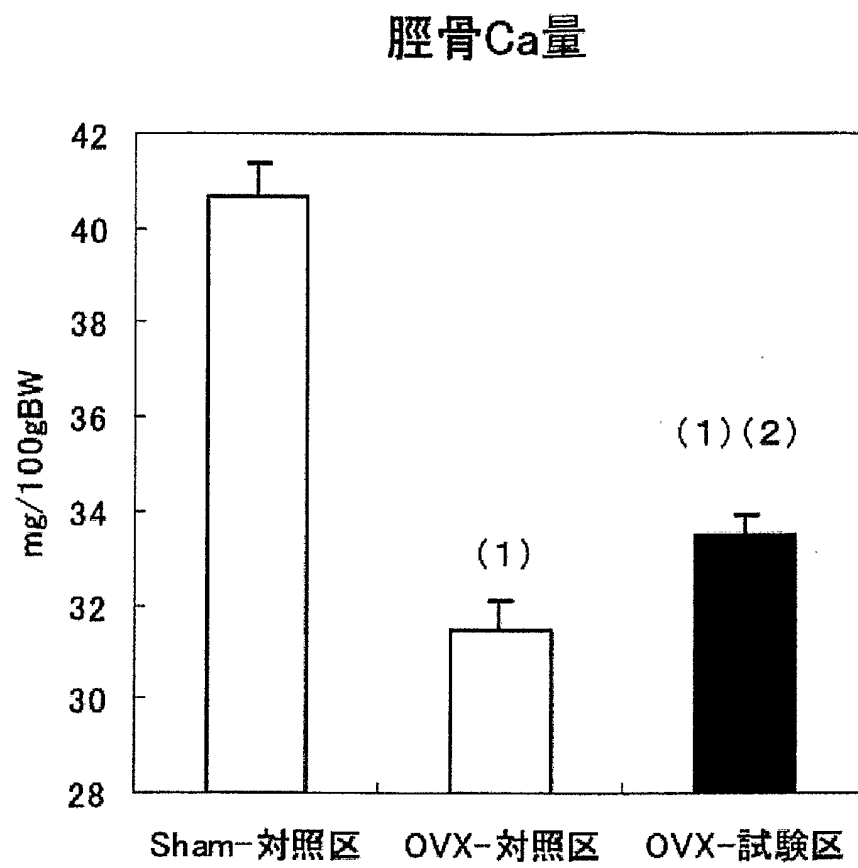
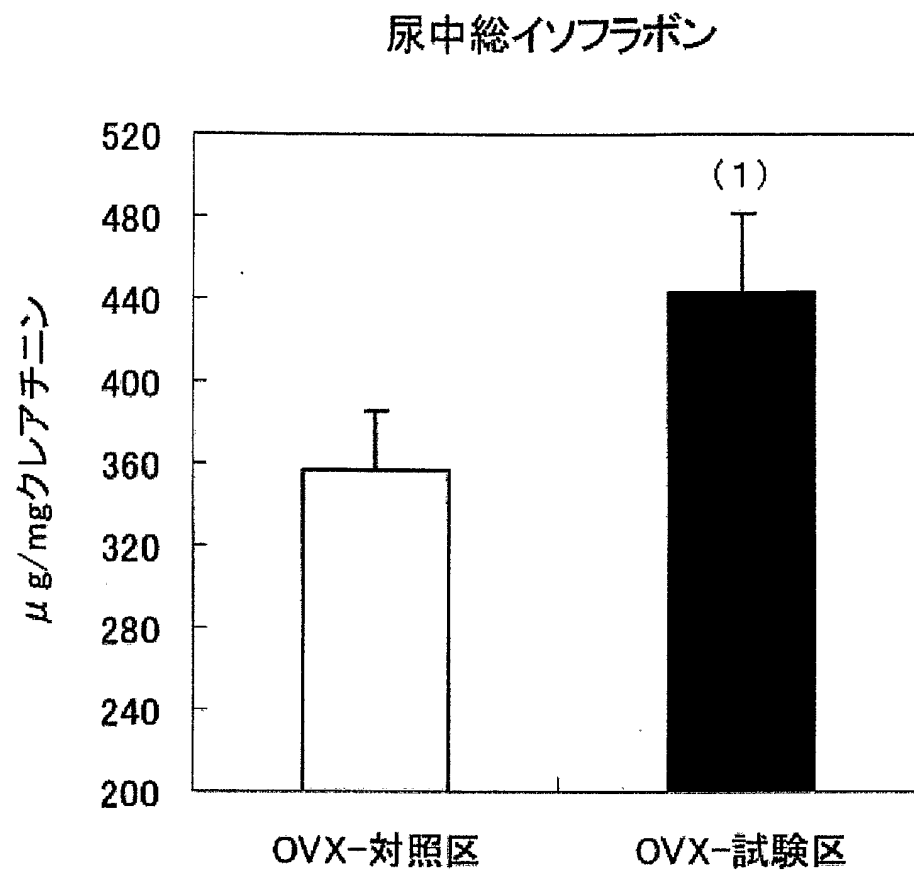


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/14(2006.01)i, A23L1/202(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/35(2006.01)n, A61K36/00(2006.01)n, A61P19/10(2006.01)n, C12G3/02(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/14, A23L1/202, A23L1/30, A61K31/35, A61K36/00, A61P19/10, C12G3/02

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

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

BIOSIS/Foodline/Foods Adlibra/Food Science and Technology
Abstracts/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-238743 A (Yaegaki Bio-industry, Inc.), 14 September, 2006 (14.09.06), (Family: none)	1, 2
$\frac{X}{Y}$	JP 2005-304493 A (Ajinomoto Co., Inc.), 04 November, 2005 (04.11.05), & EP 1579772 A1 & US 2005/0260300 A1 & CN 1836565 A	$\frac{1-10}{1-10}$
Y	Yohei OKUZAWA et al., "Shoyu Koji-chu no Bacillus-zoku Saikin ni Taisuru Kojikin no Eikyo", Journal of Japan Soy Sauce Research Institute, 25 January, 2003 (25.01.03), Vol.29, No.1, pages 1 to 7	1-10

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
07 January, 2008 (07.01.08)

Date of mailing of the international search report
15 January, 2008 (15.01.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>P, X</u> <u>P, Y</u>	JP 2007-82441 A (Ajinomoto Co., Inc.), 05 April, 2007 (05.04.07), & US 2007/0128314 A1 & CN 1935009 A	<u>1-10</u> <u>1-10</u>
A	Toshiya TODA et al., "Shihan Daizu Shokuhin no Isoflavone ni Tsuite", FFI JOURNAL, 1997, No.172, pages 83 to 89	1-10
A	JP 2006-94747 A (Ajinomoto Co., Inc.), 13 April, 2006 (13.04.06), & US 2006/0067987 A1	1-10
A	JP 2005-312439 A (Ajinomoto Co., Inc.), 10 November, 2005 (10.11.05), & US 2005/0220937 A1 & EP 1582103 A1	1-10
A	JP 2001-224359 A (Aichi-Ken), 21 August, 2001 (21.08.01), (Family: none)	1-10
A	JP 2005-210903 A (Shoda Shoyu Kabushiki Kaisha), 11 August, 2005 (11.08.05), (Family: none)	1-10
A	JP 2002-369678 A (Kabushiki Kaisha Yamaya Communications), 24 December, 2002 (24.12.02), (Family: none)	1-10
A	Kato T et al., Complete Growth Inhibition of <i>Bacillus subtilis</i> by Nisin-Producing Lactococci in Fermented Soybeans, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, Vol.63, No.4, pp.642-647	1-10
A	Kato T et al., Growth of Nisin-Producing Lactococci in Cooked Rice Supplemented with Soybean Extract and Application to Inhibition of <i>Bacillus subtilis</i> in Rice Miso, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, Vol.65, No.2, pp.330-337	1-10
A	JP 9-140375 A (KawataKogyo Kabushiki Kaisha), 03 June, 1997 (03.06.97), (Family: none)	1-10
A	JP 2004-97330 A (Uniflows Co., Ltd.), 02 April, 2004 (02.04.04), (Family: none)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Microfilm of the specification and drawings annexed to the request of Japanese Utility Model Application No. 88321/1987 (Laid-open No. 197000/1988) (Kabushiki Kaisha Yamazaki Tekkosho), 19 December, 1988 (19.12.88), (Family: none)	1-10
P,A	JP 2007-236384 A (San-Ei Gen F.F.I., Inc.), 20 September, 2007 (20.09.07), (Family: none)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071173

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 10.

Remark on Protest

the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071173

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The technical feature common to the inventions according to claims 1 to 10 resides in "a liquid *koji* obtained by culturing a *koji* mold in 5 to 500 times as much as a liquid culture medium (or the supernatant thereof) of a lactic acid bacterium".

On the other hand, the technical feature common to the inventions according to claims 11 to 19 resides in "a composition for improving bone metabolism which comprises a quick-fermented-*miso* type food material having an aglycon-conversion ratio of isoflavone of 80 to 100%".

Thus, it cannot be recognized that there is a technical feature common to the inventions according to claims 1 to 19.

As discussed above, the technical feature common to the inventions according to claims 11 to 19 resides in "a composition for improving bone metabolism which comprises a quick-fermented-*miso* type food material having an aglycon-conversion ratio of isoflavone of 80 to 100%". However, such a composition cannot be distinguished as a material from "*mame miso*" that is disclosed in Table 1 in the following document 1. Therefore, this common technical feature cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Such being the case, it does not appear that the inventions according to claims 1 to 19 are so linked as to form a single general inventive concept because of having a special technical feature in common.

Accordingly, claims of the present international application have the following three invention groups classified depending on the technical features: (1) claims 1 to 10; (2) claims 11 and 19; and (3) claims 12 to 18.

Document 1: Toshiya TODA et al., "Shihan Daizu Shokuhin no Isoflavone ni Tsuite", FFI JOURNAL, 1997, No.172, pp.83-89

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N1/14(2006.01)i, A23L1/202(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/35(2006.01)n, A61K36/00(2006.01)n, A61P19/10(2006.01)n, C12G3/02(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N1/14, A23L1/202, A23L1/30, A61K31/35, A61K36/00, A61P19/10, C12G3/02			
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			
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） BIOSIS/Foodline/Foods Adlibra/Food Science and Technology Abstracts/WPI(DIALOG), JSTPlus(JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
X	JP 2006-238743 A（ヤエガキ醗酵技研株式会社）2006.09.14, （ファミリーなし）	1, 2	
<u>X</u> Y	JP 2005-304493 A（味の素株式会社）2005.11.04, & EP 1579772 A1 & US 2005/0260300 A1 & CN 1836565 A	<u>1-10</u> 1-10	
Y	奥沢洋平ほか，醤油麴中のBacillus属細菌に対する麴菌の影響，日 本醤油研究所雑誌，2003.01.25, Vol.29, No.1, pp.1-7	1-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">0 7 . 0 1 . 2 0 0 8</div>		国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right;">1 5 . 0 1 . 2 0 0 8</div>	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） <div style="text-align: right;">4 B 3 4 3 5</div> 松田 芳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	JP 2007-82441 A (味の素株式会社) 2007. 04. 05, & US 2007/0128314 A1 & CN 1935009 A	1-10 1-10
A	戸田 登志也ほか, 市販大豆食品のイソフラボンについて, FFI JOURNAL, 1997, No. 172, pp. 83-89	1-10
A	JP 2006-94747 A (味の素株式会社) 2006. 04. 13, & US 2006/0067987 A1	1-10
A	JP 2005-312439 A (味の素株式会社) 2005. 11. 10, & US 2005/0220937 A1 & EP 1582103 A1	1-10
A	JP 2001-224359 A (愛知県) 2001. 08. 21, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2005-210903 A (正田醤油株式会社) 2005. 08. 11, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2002-369678 A (株式会社やまやコミュニケーションズ) 2002. 12. 24, (ファミリーなし)	1-10
A	Kato T et al., Complete Growth Inhibition of <i>Bacillus subtilis</i> by Nisin-Producing Lactococci in Fermented Soybeans, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, Vol. 63, No. 4, pp. 642-647	1-10
A	Kato T et al., Growth of Nisin-Producing Lactococci in Cooked Rice Supplemented with Soybean Extract and Application to Inhibition of <i>Bacillus subtilis</i> in Rice Miso, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, Vol. 65, No. 2, pp. 330-337	1-10
A	JP 9-140375 A (カワタ工業株式会社) 1997. 06. 03, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2004-97330 A (株式会社 ユニフロース) 2004. 04. 02, (ファミリーなし)	1-10
A	日本国実用新案登録出願 62-88321 号 (日本国実用新案登録出願公開 63-197000 号) の願書に添付した明細書及び図面の内容を撮影したマ イクロフィルム (株式会社 山崎鉄工所) 1988. 12. 19, (ファミリーなし)	1-10
P, A	JP 2007-236384 A (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) 2007. 09. 20, (ファミリーなし)	1-10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（別紙参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1 - 1 0

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III 欄の別紙)

請求の範囲 1-10 に係る発明は、「麹菌を 5～500 倍量の乳酸菌培養液又はその上清で培養して得られる液体麹」を共通の技術的特徴としている。

他方、請求の範囲 11-19 に係る発明は、「大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100% である速醸型味噌様食材を含有してなる骨代謝改善組成物」を共通の技術的特徴としている。

したがって、請求の範囲 1-19 に係る発明は、共通の技術的特徴を有しているとは認められない。

また、上述のように、請求の範囲 11-19 に係る発明は、「大豆イソフラボンのアグリコン化率が 80～100% である速醸型味噌様食材を含有してなる骨代謝改善組成物」を共通の技術的特徴としているが、このような組成物は、下記文献 1 の表 1 に記載の「豆みそ」と物質として区別することが出来ない。したがって、この共通の技術的特徴は、PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味における特別な技術的特徴とはいえない。

よって、請求の範囲 1-19 に係る発明は、特別の技術的特徴を有することにより、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

そこで、技術的特徴に基づき整理すると、この国際出願の請求の範囲は、(1) 請求の範囲 1-10 (2) 請求の範囲 11, 19 (3) 請求の範囲 12-18 とに区分される 3 発明を包含するものである。

文献 1 戸田 登志也ほか、市販大豆食品のイソフラボンについて、
FFI JOURNAL, 1997, No. 172, pp. 83-89