

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4226468号
(P4226468)

(45) 発行日 平成21年2月18日 (2009. 2. 18)

(24) 登録日 平成20年12月5日 (2008. 12. 5)

(51) Int. Cl.	F 1
A 2 3 L 3/3526 (2006. 01)	A 2 3 L 3/3526 5 0 1
A 2 3 L 3/3454 (2006. 01)	A 2 3 L 3/3454
A 2 3 L 3/3508 (2006. 01)	A 2 3 L 3/3508
A 2 3 L 3/3571 (2006. 01)	A 2 3 L 3/3571

請求項の数 26 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2003-511772 (P2003-511772)	(73) 特許権者	397060588
(86) (22) 出願日	平成14年7月12日 (2002. 7. 12)		ダニスコ エイ/エス
(65) 公表番号	特表2005-526480 (P2005-526480A)		デンマーク国 コペンハーゲン ケイ デ
(43) 公表日	平成17年9月8日 (2005. 9. 8)		イーケー-1001, ビー. オー. ボック
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/022132		ス 17, ランゲプロガード 1
(87) 国際公開番号	W02003/005963	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003. 1. 23)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成17年6月23日 (2005. 6. 23)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/305, 114		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成13年7月13日 (2001. 7. 13)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ミン, シンティアン
			アメリカ合衆国, ウィスコンシン 535
			27, コテージ グローブ, ウェスト オ
			ーク ストリート 307
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌胞子および増殖性細胞に対する静菌および殺菌活性を有する組成物、およびそれにより食物を処理するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) ランチビオティック ;
 b) 溶菌酵素 ; および
 c) 有機酸またはその塩、と組合せた少なくとも 1 種のプロピオニバクテリア代謝産物を
 含む、食物中の有害細菌に対する静菌および殺菌活性を有する食物処理組成物。

【請求項 2】

前記ランチビオティックがナイシンおよびラクチシンからなる群から選択される請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

溶菌酵素がリゾチームおよびキチナーゼからなる群から選択される請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

有機酸またはその塩が、酢酸、乳酸、クエン酸、プロピオン酸、二酢酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸カリウム、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

有機酸またはその塩が二酢酸ナトリウムである請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

さらに、追加の抗菌剤、キレート剤、天然の調味料、合成の調味料、風味材、染料、着色剤、ビタミン、ミネラル、栄養剤、酵素、および結合剤からなる群から選択される1種以上の成分を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

a) ランチビオティック；
b) 溶菌酵素；および
c) 有機酸またはその塩、
と組合せたプロピオニバクテリア代謝産物を含むグラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対する増殖抑制および殺菌効果を実証する組成物の細菌増殖抑制性および殺菌性有効量を該食品の1以上の表面に塗布することにより、食品上の細菌の増殖を抑制すると共にそれを殺すための方法。

10

【請求項8】

組成物が食品中のグラム陽性菌の量を減少させる請求項7に記載の方法。

【請求項9】

グラム陽性菌がバシラス、クロストリジウム、ブドウ球菌、リステリア、ミクロコッカス、連鎖球菌、ラクトバシラスおよびロイコノストックからなる属から選択される請求項8に記載の方法。

【請求項10】

細菌が、バシラス属セレウス菌、バシラス属リケニホルミス菌、バシラス属枯草菌、バシラス属耐熱細菌、クロストリジウム属ボツリヌス菌、クロストリジウム属ウエルシュ菌、クロストリジウム属スポロゲネス菌、クロストリジウム属チロブチリカム菌、クロストリジウム属プトレファシエンス菌、黄色ブドウ球菌およびリステリア属モノサイトゲネス菌からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

20

【請求項11】

組成物が食品中のグラム陰性菌の量を減少させる請求項7に記載の方法。

【請求項12】

グラム陰性菌がエシェリキア、カンピロバクター、ビブリオ、ペクトバクテリア、シェードモナス、およびサルモネラからなる属から選択される請求項11に記載の方法。

【請求項13】

細菌が大腸菌H7：O157、カンピロバクター属ジェジュニ菌、腸炎ビブリオ菌、ペクトバクテリア属カロトボラム菌、およびシェードモナス属蛍光菌からなる群から選択される請求項12に記載の方法。

30

【請求項14】

食品が、乳製品、果物、野菜、果物誘導品、野菜誘導品、穀物、穀物誘導品、肉、鶏肉、水産物、即席食品、調製サラダ、サラダドレッシング、調味料、パスタ、スープ、無菌加工食品、およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項7に記載の方法。

【請求項15】

食品が1%を越える脂肪、脂質、または油溶解性材料を含有する請求項7に記載の方法。

【請求項16】

食品が脂肪性乳化液を含む請求項7に記載の方法。

40

【請求項17】

組成物が脂肪性乳化液の水相中に組み込まれる請求項16に記載の方法。

【請求項18】

組成物が食品表面に塗布されるか、またはその後食品表面と接触させられる食物包装材料に塗布されるかのいずれかである、請求項7に記載の方法。

【請求項19】

組成物が浸漬、リンス、注射、スプレー、または混合により食品に適用される請求項7に記載の方法。

【請求項20】

50

組成物がマリネ、パン粉づけ、調味料拭き、グラッセ、または着色剤混合物の成分として食品に適用される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

組成物が食品の亜致死加工処理と組合せて用いられる請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

亜致死加工処理が熱、ガンマ照射、高圧力、超音波、オゾン、亜硝酸塩、およびそれらの組合せからなる群から選択される請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対する有効性を実証する請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を、1 以上のその表面上に塗布した結果として低減した生細菌母集団を有する食品。

10

【請求項 2 4】

乳製品、果物、野菜、果物誘導品、野菜誘導品、穀物、穀物誘導品、肉、鶏肉、水産物、即席食品、調製サラダ、サラダドレッシング、調味料、パスタ、スープ、無菌加工食品、およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項 2 3 に記載の食品。

【請求項 2 5】

組成物が食品の亜致死加工処理と組合せて用いられる請求項 2 3 に記載の食品。

【請求項 2 6】

亜致死加工処理が、熱、ガンマ照射、高圧力、超音波、オゾン、および亜硝酸塩からなる群から選択される請求項 2 3 に記載の食品。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、先願の 35U.S.C. § 119(e) および 2001 年 7 月 13 日に出願された「Food-Treating Composition Having Bacteristatic and Bactericidal Activity and Process for Treating Food Therewith」という題の同時係属米国特許仮出願第 60/305,114 号下の特典を請求するものであり、これらの内容は本明細書において参考のために包含する。

【0 0 0 2】

本発明は、食物中に存在する望ましくない細菌に対する静菌および殺菌活性を有する組成物、および腐敗へのさらなる耐性および消費のための一層の安全を食物に提供するためにこうした組成物により食物を処理するための方法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

細菌腐敗および／または有害な細菌の発生を防止するかまたは抑制するために食品を処理するための方法および組成物は、広く実用化されている。それほど重要でない処理は切り抜ける高度に耐熱性のある孢子を形成するその能力から誘導される食物中で最も耐熱性のある危険な細菌と考えられる、ボツリヌス菌の孢子の少なくとも 12 デシマル (12 D) の低減を達成するために十分な熱および圧力の組合せを缶詰または袋状食物にかけることは、酸度が高くない食物 (すなわち、 $pH > 4.5$) の商業的な滅菌における一般的なやり方である。不幸にも、一般的な 12 D 滅菌法は、食物の外見および風味を変えることが可能であり、ボツリヌス菌の孢子に対して致死下 (亜致死) の温度で加工される食物に比べてそれらをより望ましくないものにする。

40

【0 0 0 4】

近年に至って、より多くの食物が、食品の細菌レベルを低減させる一方で、より官能的に魅力のある食品をも提供できる、熱、圧力、照射、超音波、またはそれらの組合せの亜致死投与量での処理を受けるようになってきた。これらの亜致死加工処理は、食品を滅菌するために用いられる従来の 12 D 熱処理ほど劇的には食品を変えないが、しかし、このやり方で加工されるたいていの食物は、次に、孢子形成性細菌の可能な副産物から保護するために冷蔵されなければならない。

【0 0 0 5】

50

亜致死加工処理は大部分の増殖性腐敗菌および病原菌細胞を殺す一方で、それらは、一般に、熱、照射および他の処理に対する高い耐性を有する潜在的な細菌孢子の一部分しか殺せない。こうした孢子は亜致死加工処理を切り抜けることができ、後に加工食物中で増殖し、腐敗、病気、最悪の場合死を引き起こす。この理由により、このやり方で処理されるたいていの食物は、こうした孢子の増殖を遅くさせるかまたは防止するために冷蔵される。

【0006】

これらの孢子形成性細菌により感染される食品は数多くあり、即席食品および定食、調製サラダ、乳製品、ドレッシングおよび調味料、加工または塩漬け肉、鶏肉、および水産物、ならびに加工果物および野菜、果物および野菜誘導品、穀物および穀物誘導品、パスタ、スープ、および無菌加工食品が挙げられるがそれらに限定されない。即席食品、特に真空包装、青果物鮮度保持包装(MAP)、および缶詰食品の長い冷蔵貯蔵期間は、それがボツリヌス菌などの一部の細菌の孢子が食物中に発生し致死毒素の生成を伴って増殖することを可能とすることができるので、とりわけ面倒であり得る。こうした危険は、一般に亜致死加工がさまなければ孢子形成性種を損傷させるかまたはそれらと戦うであろう非病原性増殖細菌種を破壊するので、亜致死加工食品において一層高いことが可能である。このクラスの食物においてさらに増幅される危険は、クロストリジウム孢子の発生および増殖のために必要な嫌気状態を生み出す真空または青果物鮮度保持包装加工の使用である。

10

【0007】

また、抗菌剤として機能することができる食品用組成物を開発するために、広範囲な調査が食品安全性の分野において行われてきた。関連先行技術は、米国特許第5,096,718号および第5,260,061号およびそこに引用される文献に見出すことが可能である。これらの特許は、得られる製品の貯蔵寿命を増大させるためにある種 of 食物におけるプロピオン酸菌の代謝産物の使用を開示している。これらの代謝産物はグラム陰性菌に対する有効性を実証しているが、しかし、一般に、グラム陽性菌またはそれらの孢子に対しては同じように有効ではない。

20

【0008】

特開平7-115950号公報には、有機酸およびそれらの塩、多価アルコールの脂肪酸エステル、アミノ酸、抗菌ペプチドおよびタンパク質、糖、糖酸およびアミノ糖およびそれらの部分分解製品を含む多糖類、香辛料およびそれらの精油および植物成分、およびアルコールのいずれかと組合せたプロピオニバクテリア属の乳酸菌により生成されるバクテリオシンの組合せが開示されている。

30

【0009】

米国特許第5,217,250号には、殺菌剤としてのナイシン組成物の使用が開示されている。ナイシンはランチビオティック、さらに詳細には、事実上バクテリウム属乳連鎖球菌の種々の菌株により産生される抗菌特性を有するポリペプチドである。ナイシンは主としてグラム陽性菌に対して有効である。この特許は、EDTAなどのキレート剤または他の酢酸塩またはクエン酸塩とナイシンとの組合せが広範な殺菌剤をもたらすことができることを開示している。

40

【0010】

米国特許第5,458,876号には、抗菌性組成物としてのランチビオティックとリゾチームとの組合せが開示されている。

【0011】

欧州特許第0,453,860号には、以下の各化合物群：(I)細胞壁溶解性物質またはその塩、(II)抗菌性化合物、および(III)食品、化粧品用途向けの製剤または個人的衛生用品における使用に許容可能な有機酸、またはこれら酸の塩；リン酸塩および縮合リン酸塩またはそれらの相当酸；および他の金属イオン封鎖剤から選択されるアジュバント、それぞれの少なくとも一つの混合物である改善された抗菌特性を有する組成物が開示されている。好ましくは、(I)はリゾチームであり、(II)はバクテリオシン（例えば、ナイシンまたはペ

50

ディオシン)であることが可能であり、および(III)は酢酸、乳酸、クエン酸、プロピオン酸、酒石酸、正リン酸塩、ヘキサメタリン酸塩、トリポリリン酸塩、他のポリリン酸塩、または置換されたまたは非置換のアミノ基を含有する金属イオン封鎖剤、例えば、EDTAであることが可能である。

【0012】

欧州特許第0466244号には、表面からグラム陰性菌を絶滅させることを支援するためにナイシンと5.5〜6.5間のpHで有効なリン酸緩衝液との組合せが開示されている。

【0013】

米国特許第5,989,612号には、プロピオン酸単独でなくプロピオニバクテリア代謝産物と、キレート剤、精油、または有機酸（プロピオン酸、酢酸、乳酸、およびそれらそれぞれの塩以外の）との組合せが開示されている。

10

【0014】

米国特許第6,207,210号には、プロピオン酸単独でなくプロピオニバクテリア代謝産物、ランチビオティック、およびキレート剤として機能する1以上のリン酸塩の組合せが開示されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

グラム陽性およびグラム陰性菌の両方、および特に亜致死（12D未満）加工処理を受けた食物中のグラム陽性孢子に対して有効である抗菌組成物を開発することはなお有益であろう。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

全く驚いたことに、少なくとも1種のプロピオニバクテリア代謝産物、および（a）ランチビオティック、（b）溶菌酵素、および（c）有機酸および／または有機酸塩からなる群から選択される少なくとも2種の追加成分を含有する食物処理組成物が、グラム陽性およびグラム陰性増殖菌、および一般に食物上または食物中に見出されるグラム陽性孢子形成性菌に対する優れた静菌および殺菌活性を実証することが、今、発見されてきた。この組成物は、1以上の亜致死加工処理と併せて用いられる場合、潜在的に有害な食物媒介病原菌に対して静菌性および殺菌性の両方であることにおいて、特に有効である。

30

【0017】

特に好ましい実施形態において、本明細書における組成物のランチビオティック（a）はナイシンまたはラクチシンであり；溶菌酵素（b）はリゾチームまたはキチナーゼであり；および有機酸および／または有機酸塩（c）は、酢酸、酢酸ナトリウム、二酢酸ナトリウム、または酢酸カリウムなどの酢酸塩、乳酸、乳酸ナトリウムまたは乳酸カリウムなどの乳酸塩、プロピオン酸、プロピオン酸ナトリウムおよびプロピオン酸カリウムに限定されないがそれらを含むプロピオン酸塩、クエン酸、クエン酸ナトリウムまたはクエン酸カリウムなどのクエン酸塩、またはそれらの混合物からなる群から選択される。

【0018】

なお別の実施形態において、本発明は、食物に前述の組成物の静菌有効および殺菌有効量を適用することにより、食物中または食物上の全体細菌数または母集団を減らすための方法を提供する。

40

【0019】

追加の実施形態において、本発明は、前述の組成物の静菌有効および殺菌有効量をその上に塗布したことの結果として、低減した生細菌母集団を有する食品を提供する。

【0020】

実際に、本発明による組成物は亜致死熱処理などの1以上の亜致死加工処理と組合せて適用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

50

本発明の抗菌性組成物は、少なくとも１種のプロピオニバクテリア代謝産物、および（a）ランチビオティック、（b）溶菌酵素、および（c）有機酸および／または有機酸塩からなる群から選択される少なくとも２種の追加成分を含有する。抗菌性組成物は、望ましくないグラム陽性およびグラム陰性増殖菌、および一般に食品上または食品中に見出されるグラム陽性孢子に対して改善された静菌および殺菌活性を実証する。

【００２２】

本明細書において用いられる「代謝産物」は、プロピオニバクテリアにより産生される水または二酸化炭素以外の有機物質を指す。「静菌性」または「静菌有効性」は、細菌の副産物または増殖を抑制するための物質または組成物の能力を指す。「殺菌性」または「殺菌有効性」は、細菌を破壊する、すなわち、殺すための物質または組成物の特性を指す。表現「活性代謝産物」および「抑制性代謝産物」は両方とも静菌性代謝産物を指す。

10

【００２３】

「溶菌酵素」には、細胞の溶解（および死）をもたらす、細菌細胞壁を分解することができるあらゆる物質が含まれる。

【００２４】

表現「有害な細菌」には、食物の腐敗を引き起こし、加速し、関与し、またはさもなければ役割を演じる、および／または細菌またはそれらの副産物（例えば、毒素）が摂取される場合健康特にヒトの健康に有害であることが可能である食物中に存在するすべての細菌性微生物が含まれる。

【００２５】

20

用語「食物」または「食品」には、すべての食用栄養分および組成物、特にヒト消費用に意図されたものが包含されると共に、非加工の、および加工された、例えば、調理された栄養分および組成物が含まれる。表現「食物中に存在する」は、有害な細菌が住み込む食物のすべての外面および内面および／または部分を指す。

【００２６】

本発明の目的のために、「亜致死処理」は、食物の細菌母集団を有意に減少させるために十分であるが、しかし、ボツリヌス菌の孢子の１２デシマル（１２Ｄ）低減を達成するには不十分であるあらゆる操作として定義される。本明細書において考慮される亜致死処理には、食物に適用される場合有意にその細菌数を減少させるが、しかし、ボツリヌス菌の孢子の１２デシマル（１２Ｄ）低減を達成するには不十分である熱、照射、圧力、超音波、オゾン、亜硝酸塩、などが挙げられる。

30

【００２７】

本発明の食物処理組成物の第一成分は、少なくとも１種のプロピオニバクテリア代謝産物の静菌有効量である。これらの代謝産物は、米国特許第5,096,718号および第5,260,061号に開示されており、それらの内容は参考のために本明細書において包含する。これらの代謝産物は、特にグラム陰性菌の場合、細菌の成長または増殖を抑制できる。この効果は、「繊細な風味の」食物においてさえ、それらの価値を下げるであろうそれらの望ましくない風味、香り、または外見をもたらすことなしに達成することができる。

【００２８】

代謝産物は、増殖性プロピオニバクテリア、例えば、プロピオニバクテリウム属セルマニ（*shermanii*）、*P. フロイデンライチ*（*freudenreichii*）、*P. ペントサシウム*（*pentosaceum*）、*P. トエニ*（*thoenii*）、*P. アラビノサム*（*arabinosum*）、*P. ラブラム*（*rubrum*）、*P. イエンセニー*（*jensenii*）、*P. ペテルソニー*（*peterssonii*）、および関連種（Malikら、*Can.J.Microbiol.* 14:1185, 1968に識別されているような）により得ることができる。数により識別されるプロピオニバクテリウム菌株は、米国微生物系統保存機関（American Type Culture Collection(ATCC))から市販されている。他の菌株も広く市販されているか、または無償でオレゴン州、コーバリスのオレゴン州立大学から入手できる。例えば、プロピオニバクテリウム属フロイデンライチ亜種、セルマニ、ATCC菌株#9616は、本発明により用いることができる。

40

【００２９】

50

プロピオン酸は本発明において用いることができるが、一方で、食物に強い風味を与えることが当業者には一般に知られている。こうした風味はスイス・チーズなどの一部の食物において望ましいが、一方で、多くの食物においてそれらは望ましくない。混合物において他のプロピオニバクテリア代謝産物を含有する全部分発酵組成物は、プロピオン酸に関連する強い風味なしで抗菌活性を実証する。これらの代謝産物を含有するこうした組成物の例には、MICROGARD（商標）商品名でローディア（Rhodia Inc.）により販売されているものが挙げられる。

【0030】

プロピオニバクテリウム菌株は、多くの食物の正常 pH でグラム陽性菌を抑制することができる 1 以上の代謝産物を含む食物成分を産生するために用いることができる。脱脂粉乳または他の適する発酵培養体のプロピオニバクテリア菌株発酵の副産物として得ることができる代謝産物は、風味添加剤として役立つことができると共に、また、発酵の終結後多くの微生物に対して抑制的であることが可能である。試験された代謝産物の混合物に対して達成される抑制の程度は、プロピオン酸単独に対するよりも一層大きく、例えば、MICROGARD（商標）組成物の使用が好ましい。食品の貯蔵寿命は、本発明の組成物の他成分と組合せた 1 以上のこうした活性代謝産物を製品中またはその上に提供することにより伸ばされる。

10

【0031】

プロピオニバクテリウム種に対する増殖培養液は、牛乳、乳漿、またはデキストロース、プラス酵母エキス、タンパク質加水分解物、またはあらゆる他の刺激物を含むタンパク質により調合することができる。種々の緩衝液、塩、酸、および他の加工助剤は、代謝産物産生を強化し、最終組成物の取扱いを改善するために組み込むことが可能である。増殖液は、mL 当たり約 10^6 ～ 約 10^{10} 個の細胞までのプロピオニバクテリアの発生後、熱処理（低温殺菌）をして、液状、凝縮化、乾燥化、または凍結形態をとる増殖培地を含有する代謝産物の使用の前に、接種された外来の細菌を殺す。

20

【0032】

貯蔵および出荷を容易にするために、プロピオニバクテリア増殖混合物は、例えば、噴霧乾燥かまたは凍結乾燥により、蒸発され凍結されるか、または濃縮され脱水されて粉末を形成することができる。代謝産物は分離するかまたは精製するかまたは混合物として利用することが可能である。プロピオニバクテリアの粉末化または液状の自然代謝産物は、グラム陰性菌の増殖および／または酵素活性による腐敗に対してそれらがより影響を受けにくくするために、種々の食物および食事中に組み込むことができる。抗腐敗活性は、また、生存能力のあるプロピオニバクテリアを直接食物中に組み込むことにより得ることができる。

30

【0033】

ほとんどの例において、細菌低減における実質的な改善は、本発明の抗菌性組成物中に、それが食品の風味または芳香に有害な影響を及ぼさないだけの十分に小さなプロピオニバクテリア代謝産物の量を含むことにより得ることができる。さらに詳細には、一般的に本発明の抗菌性組成物の他の成分に加えてプロピオニバクテリア代謝産物を含有する低温殺菌された培養固形物または液体を含む液状、凝縮化、または乾燥化製品は、一般に、プロピオニバクテリア代謝産物の量が製品の約 0.01 ～ 約 2.0 wt %、好ましくは製品の約 0.05 ～ 約 1.0 wt %、さらに好ましくは製品の約 0.1 ～ 約 0.75 wt % の範囲にあるように食品に添加される。組成物が乾燥混合物に添加され、それに液体成分が添加され、その後ケーキなどに料理される場合、添加される量は料理される前の乾燥混合物に対する重量による。

40

【0034】

市販されている材料、さらに詳細には、プロピオニバクテリア代謝産物を含む低温殺菌された培養固形物または液体は、MICROGARD（商標）商品名でローディアにより販売されている。これらの製品は、牛乳の未精製全部分発酵品または類似の培地である。MICROGARD（商標）MG100 は、脱脂粉乳固形物により標準化され、噴霧乾燥される低温殺菌された培養脱脂粉乳である。MICROGARD（商標）MG200 は、マルトデキストリンにより標準化され、

50

噴霧乾燥された低温殺菌培養デキストロースである。MICROGARD（商標）MG250は、培養デキストロース製品の凝縮（凍結または液体）版である。

【0035】

本発明の食物処理組成物は、また、第二成分として少なくとも1種のランチビオティックの殺菌有効量を含むことが可能である。用語「ランチビオティック」は、アミノ酸ランチオニンおよび他の非タンパク質アミノ酸を含有する殺菌剤のグループを説明するために、シュネル（Schnell）ら（Nature 333:276~278 (1998)）により作られた。これら殺菌剤の共通の特性は、彼らが「…多環ポリペプチド抗生物質は高含量の不飽和アミノ酸（デヒドロアラニン、デヒドロプトリン）およびチオエーテルアミノ酸（メソーランチオニン、（2S, 3S, 6R）-3-メチルランチオニン）を保有する。さらに、リシノアラニン、3-ヒドロキシアスパラギン酸およびS-（2-アミノビニル）-D-シスチンが一部のメンバーに見られる」と注記しているケルナー（Kellner）ら（Eur.J.Biochem 177:53~59(1988)）により概説されている。ランチビオティックには、ナイシン、サブチリン、pep 5、エピデルミン、ガリデルミン、シナマイシン、Ro09-0198、デュラマイシンおよびアンコベニンが挙げられる。リボソーム的に合成されたペプチド抗生物質は、19~34個のアミノ酸を含有し、ブドウ球菌種、バシラス菌種およびストレプトマイセス種を含む種々の細菌により産生される。それらの独特の非タンパク質アミノ酸組成物に加えて、それらはそれらの特異性に基づき他のポリペプチド抗生物質から識別することができる。バクテリオシンは一般に、ランチビオティックは特に、極めて狭い作用スペクトルにより特徴付けられる。従って、ほんのわずかだけの細菌種が実際の濃度で特定のバクテリオシンに対して感受性がある。これは、たいていの細菌に対して活性である他の広いスペクトルのポリペプチド抗生物質、およびたいていの細菌、酵母に対して、および哺乳類細胞に対してさえも活性である公開国際特許出願W089/00194号にジェインズ（Jaynes）らにより検討されている「溶菌ペプチド」と対照的である。

【0036】

最も完全に特徴付けられるバクテリオシンの一つ、ナイシンは、時折約7000の分子量を有する二量体として生じるリボゾーム的にコード化されたペプチドである。ナイシンは、類似のアミノ酸組成物および一部の限定された範囲の抗菌活性を示すいくつかの非常に密接な関係の物質を表す集合名である。この現象は、E. リピンスカ（Lipinska）により「Antibiotics and Antibiosis in Agriculture」（M. Woodbine編）pp. 103-130中に検討されている。それは、その全体の34個のアミノ酸の中で、ベーターメチルランチオニン、デヒドロアラニン、およびランチオニンを含むいくつかの珍しいアミノ酸を含有する。酸性溶液中でのその安定性に寄与するペプチド中の5個の珍しいチオエーテル結合がある。ナイシンは、他のランチビオティック、例えばサブチリンおよびエピデルミンとの構造上および作用上の顕著な相同性を共有する（Buchmanら、J.Bio.Chem 263(31):16260-16266 (1988)）。ナイシン、その物理的特性および使用の最近の論評には、「Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria」、T.R.Klaenhammer, Biochimie 70:337-349 (1988)), 「Nisin」、A.Hurst, Adv.Appl.Microbiol. 27:85-121 (1981), および米国特許第4,740,593号が挙げられる。

【0037】

L. モノサイトゲネス菌に有効であるナイシンの使用がM. ドイル（Doyle）により報告されている；「Effect of Enviromental and Processing Conditions on Listeria Monocytogenes」、Food Technology, 42(4):169-171 (1988)。この論文は微生物の増殖の初期抑制（約12時間にわたる）を記載し、L. モノサイトゲネスはpHレベル5.0の低さでも増殖することが可能であり、pH9.6で増殖する能力を有してアルカリ性pHに対しても耐性があることを報告している。

【0038】

ナイシンは、それ単独で、食物などの複合媒体において同じように効果的な抗菌剤ではない。例えば、ボツリヌス菌に対するナイシン活性が一般に食物などの複合媒体において低減することは知られている。（Rogers and Montville, J.Food Sci., 59(3):663-668 (

1994))

【0039】

ナイシンは、ノバシン (Novasin) (商標) の商品名で標準化された2.5wt%製剤の形態をとってローディアから市販されている。ナイシンが本発明の抗菌性組成物の成分として添加される場合、それは抗菌性組成物の約0.5重量%～約10wt%範囲の量で存在することができる。

【0040】

タンパク質を含有するランチビオティックは、また、ある種の細かい品種のチェダーまたは米国製チーズおよびMICROGARD (商標) MG300として知られる発酵脱脂粉乳品における低レベル発酵副産物として存在することが可能である。ランチビオティックがMICROGARD (商標) MG300などの発酵乳品形態をとって本発明の抗菌性組成物に添加される場合、用いられるMICROGARD (商標) MG300の量は、抗菌性組成物の約75～約95wt%の範囲にあることができる。

10

【0041】

実際、ランチビオティックが本発明の抗菌性組成物の成分として用いられる場合、ランチビオティックは、それが各種の食物における使用の安全性および適合性に基づき活性成分 (例えば、ナイシン) の (食品の質量で) 約1～約100ppm範囲、好ましくは約1～約12.5ppm範囲レベルの量で存在するように食品に添加される。

【0042】

上述のランチビオティックに対する代替として、ペディオコッカス属細菌代謝産物、特にペディオシンは、本発明の組成物中において有効な結果を生み出すことができる。加えて、W096/32482号に記載されているラクチシン、特にラクチシン3147と呼ばれる新種の連鎖球菌バクテリオシンは、グラム陽性菌に対する類似の活性を生み出すはずである。ペディオシンおよびラクチシンの両方とも、主として、限定された範囲のグラム陽性菌に対する静菌活性を有する。

20

【0043】

好ましい実施形態において、ナイシンまたはラクチシンは本発明の組成物におけるランチビオティックとして用いられる。

【0044】

本発明の抗菌性組成物の別の成分は、溶菌酵素などの細胞壁溶解性物質であることができる。これらの酵素は目標微生物の増殖を制御するかまたは防止するために用いることが可能である。抗菌成分または薬剤として食品産業において有用であろうとする溶菌酵素のために、それは広いスペクトルの細菌、特に食物腐敗を引き起こしおよび/または病原体であるものを分解できることが好ましい。

30

【0045】

好ましい実施形態において、リゾチームは溶菌酵素として用いられる。リゾチーム (ムラミダーゼ; ムコペプチド・N-アセチルムカモイルヒドロラーゼ; 1, 4-ベータ-N-アセチルヘキソサミノダーゼ, E.C.3.2.1.17) は、種々の供給源から単離されてきた周知の溶菌酵素であり、よく特徴付けられた酵素である。リゾチームは、通常、食品用抽出法において卵アルブミンから誘導されるが、しかし、また、北極のホタテ貝、人乳、涙、および他の天然源から入手することが可能である。最初はW. フレミング (Fleming) により1922年に発見されたが、卵白リゾチームは解読された最初のタンパク質の一つであって、それに対する3次元構造がX線結晶学を用いて推定された最初のものであり、それに対する作用の詳細機構が提案された最初のものであった。グラム陽性菌に対するその抗菌活性は、例えば、V. N. プロクター (Procter) らによって、CRC Crit.Reviews in Food Science and Nutrition, 26(4):359-395 (1988)にうまく記述されている。卵白リゾチームの分子量は約14,300～14,600であり、等電点はpH10.5～10.7である。それは4個のジスルフィド架橋によって相互に連結される129個のアミノ酸よりなる。類似の酵素は、大腸菌およびヒトの涙などのさまざまな産生源を含む他の供給源から単離され特徴付けられてきた。わずかな差異 (例えば、ヒトリゾチームは130個のアミノ酸を有する) にもかか

40

50

わらず、アセチルヘキソサミン・ポリマーの加水分解のための能力は本質的に同じままで残る。従って、本発明の目的のために、用語リゾチームはアセチルヘキソサミンおよび関連ポリマーを加水分解するための能力を有する細胞壁またはペプチドグリカン分解性酵素を含むように意図されている。

【0046】

リゾチームは細菌および菌類を殺すかまたはその増殖を抑制することが知られており、ヨーロッパでは多様なチーズ中の腐敗性微生物クロストリジウム属チロブチリカム菌の増殖を制御するために用いられる。それは、また、多様な他の食物保存用途における使用のために提案されてきたし、リステリア属モノサイトゲネス菌 (Hugheyら、Appl. Environ. Microbiol. 53:2165-2170 (1987)) の増殖を抑制する (および一部の場合に殺す) と報告されてきた。約20,000シュガー (Shugar) 単位/mgの活性を有する卵アルブミンから誘導されるリゾチームは、ローディアから商品名Novagard (商標) で市販されている。

10

【0047】

リゾチームが食物中の抗菌剤として用いられる場合、それは、主として熟成チーズ中のクロストリジウム属チロブチリカム菌を抑制するために、処理用に用いられる溶液の質量で約20～約500ppm、さらに好ましくは約50～約200ppm間の量において食品に添加される。リゾチームはこれらのレベルでは他のグラム陽性菌に対して殺菌性ではないが、しかし、それは、広範囲のグラム陽性菌から細胞壁を除去するためにより高いレベル (1000ppmを越えて、一般に2000ppm以上) で用いられてきた。

20

【0048】

リゾチームが本発明の抗菌性組成物の成分として添加される場合、それは抗菌性組成物の約0.25～約10wt%の範囲の量で存在することができる。好ましくは、リゾチームが本発明の抗菌性組成物の成分として添加される場合、それは本発明の組成物により処理される食品の質量で約50～約150ppmの範囲の量で存在する。

【0049】

本開示による組成物中に用いることが可能である別の好ましい溶菌酵素は、キチナーゼである。

【0050】

抗菌性組成物は、また、食品用に許容可能な有機酸またはこれらの酸の塩を含むことが可能である。抗菌性組成物は、個々の酸または塩、またはそれらの混合物を含むことが可能である。組成物における使用のための好ましい有機酸または塩には、酢酸、酢酸ナトリウム、二酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、プロピオン酸、プロピオン酸ナトリウムおよびプロピオン酸カリウムに限定されないがそれらを含むプロピオン酸塩、クエン酸またはクエン酸ナトリウムまたはクエン酸カリウムなどのその塩、またはそれらの混合物が挙げられる。さらに好ましい実施形態において、二酢酸ナトリウムが抗菌性組成物の約1～約25wt%の範囲の量で用いられる。好ましくは、本発明による抗菌性組成物により処理されて得られる食品は、約500～約1500ppmの二酢酸ナトリウムを有する。

30

【0051】

本発明の組成物中に存在することができる他の添加剤には、以下の材料が挙げられるがそれらに限定されない：追加の抗菌剤および／またはキレート剤、天然または合成の調味料および／または風味材、染料および／または着色剤、ビタミン、ミネラル、栄養剤、酵素、およびグアールガム、およびキサンタン・ガムなどの結合剤。これら材料の添加は本発明の成功に決定的なものではなく、熟練者の技術の範囲内と考えられるであろう。

40

【0052】

特に好ましい実施形態において、抗菌性組成物には、食品中の広範囲なグラム陽性およびグラム陰性の腐敗性および／または孢子形成性菌の増殖を制御するために、ナイシンまたはラクチシンなどのランチビオティック・バクテリオシン、およびリゾチームなどの溶菌酵素の両方と組み合わせ、広範囲の有機酸または二酢酸ナトリウムを含むそれらの塩と混合したプロピオニバクテリア代謝産物が挙げられる。

50

【0053】

本発明の抗菌性組成物は、細菌増殖または分解に敏感であるあらゆる食品と関連して用いることが可能である。これらには、乳製品、果物および野菜、果物および野菜誘導品、穀物および穀物誘導品、肉、鶏肉、および水産物が挙げられるがそれらに限定されない。好ましい実施形態には、即席食品、定食、および肉、調製サラダ、ドレッシング（サラダドレッシングを含む）、ソースおよび調味料、パスタ、スープ、および無菌加工食品、ならびにそれらの混合物を含む亜致死加工食品の処理が挙げられる。

【0054】

本発明による抗菌性組成物は、混合可能食品と混合するかまたはその上に塗布することにより最も容易に用いられるが、しかし、また、浸漬、リンス、またはスプレーにより、またはこうした製品の内部への適用、例えば注射により固形食品の表面を処理するのに有効であることができよう。他の実施形態において、抗菌性組成物は、マリネ、パン粉づけ、調味料拭き、グラッセ、および着色剤混合物など、または食品と混合し、組み込もうとする成分として適用することが可能であって、鍵になる基準は抗菌性組成物が細菌増殖および／または分解を受ける表面（内側面を含む）に対して利用可能であることである。なお他の実施形態において、抗菌性組成物は、組成物を食品包装材料に塗布し、その後抗菌性組成物が外側の食物表面と接触するように包装を食物表面に当てることにより、間接的に食物表面に接触して置くことが可能である。用いようとする最適量は処理しようとする特定の食品の抗菌性組成物および食物表面に抗菌性組成物を塗布するために用いられる方法に応じて決まるが、しかし、簡単な実験により決定することができる。

【0055】

本開示の抗菌性組成物は、クロストリジウム属ボツリヌス菌、クロストリジウム属ウェルシュ菌、クロストリジウム属スポロゲネス菌、クロストリジウム属チロブチリカム (*tyrobutyricum*) 菌、およびクロストリジウム属プトレファシエンス (*putrefasciens*) などのクロストリジウム種；バシラス属セレウス菌、バシラス属リケニホルミス (*licheniformis*) 菌、バシラス属枯草菌、およびバシラス属耐熱細菌などのバシラス種を含む好気性孢子形成性細菌；黄色ブドウ球菌などのブドウ球菌種を含むグラム陽性増殖性病原体；リステリア属モノサイトゲネス菌などのリステリア種；および、最後にミクロコッカス菌、連鎖球菌、およびラクトバシラスおよびロイコノストック (*Leuconostoc*) 種に限定されないがそれらを含む乳酸基からの腐敗生成性増殖細菌に限定されないがそれらを含むグラム陽性菌に対して有効である。

【0056】

本開示の抗菌性組成物は、また、大腸菌H7：O157などの大腸菌；カンピロバクター属ジェジュニ菌などのカンピロバクター菌；腸炎ビブリオ菌などのビブリオ菌；ペクトバクテリウム属カロトボラム (*carotovorum*) 菌などのペクトバクテリア；シュードモナス属蛍光菌などのシュードモナス菌；およびサルモネラ種に限定されないがそれらを含むグラム陰性菌に対して有効である。

【0057】

さらに、本開示による組成物が、約1%を越える脂肪、脂質、または油溶解性材料を含む食品、および脂肪性乳化液である食品の生細菌含量を低下させることにおいて有効であることが、発見されてきた。食品が水乳化液中の脂肪である場合、食品の抗菌性保護のために利用できないであろう脂質相中への群分離を最小化するために、組成物を食品の水相中に組み込むことは特に有利である。

【0058】

本開示による組成物により処理される食品は、また、熱、照射、圧力、超音波、凍結、パルス化電場、オゾン、亜硝酸塩、などの亜致死加工処理により処理することが可能である。亜致死加工処理と組合せた組成物が、いずれかの単独処理よりも、食品の生細菌含量を低下させることにおいてさらに有効であることが見出されてきた。これらの食品は室温で約3日以上にわたり安定したままである。冷蔵温度で、これらの食品は約7日以上にわたり安定したままである。

【0059】

以下の非限定実施例は、本開示による食品を保存するために用いることが可能である広範囲の抗菌性組成物を例証する。

【実施例】

【0060】

以下の実施例は、非脂肪脱脂粉乳（NFD M）中のC B－1と呼ばれる抗菌性組成物の有効性を対照としてのナイシン（ノバシン（Novasin）(商標)）と比較する。C B－1にはノバシン（商標）、MICROGARD（商標）MG200、二酢酸ナトリウム、およびリゾチームが含まれた。これら組成物の成分を以下の表1に示す。

【0061】

10

【表1】

表1

抗菌性組成物

混合物	混合物中の%				
	ノバシン (商標)	MG－200 (商標)	二酢酸ナト リウム	リゾチーム	NFD M
対照	8	0	0	0	92
C B－1	2	87	10	1	0

20

【0062】

実施例1

30 E Cでの全乳および脱脂粉乳中のセレウス菌に対する抗菌性組成物の抑制

30

全乳および脱脂粉乳を滅菌し、塩化2，3，5－トリフェリルテトラゾリウム（TTC）を添加し（色の変化により増殖を示すため）、得られた混合物に約4～5ログ細胞／m lでのセレウス菌（好気性孢子形成体）の孢子を接種した。抗菌性組成物（C B－1）およびノバシン（商標）対照品（対照）を10%原液として添加した（対照はC B－1の4倍のナイシン量を含んだ）。抑制を所定の時間にわたり増殖なしのための最小濃度により示し、以下の表2に表す。

【0063】

【表 2】

表 2

組成物の有効性

処理	MIC* (増殖なしのために必要とされる抗菌性組成物の%)	ノバシン (商標) 濃度 (ppm)
全乳中		
対照	>4	>3200
CB-1	3	600
脱脂粉乳中		
対照	0.5	400
CB-1	2	400

*MIC=最小抑制濃度

【0064】

次に、これらの組成物に対するセレウス菌の皿集計数を30ECで24時間にわたり培養したTSA寒天プレート上で得た。その結果を以下の表3に示す。

【0065】

【表 3】

表 3

皿集計数

全乳中のセレウス菌に対する抑制

処理	CFU/ml
対照	3x10 ⁸
ノバシン	5x10 ⁶
CB-1	1x10 ⁴

【0066】

実施例 2

25ECでの全乳および脱脂粉乳中のL. モノサイトゲネス菌に対する抗菌性組成物の抑制

全乳および脱脂粉乳を滅菌し、塩化2, 3, 5-トリフェリルテトラゾリウム (TTC) を添加し (色の変化により増殖を示すため)、得られた混合物に約4~5ログ細胞/mlでのL. モノサイトゲネス菌ATCC19115 (増殖性グラム陽性病原体) を接種した。抗菌性組成物 (CB-1) およびノバシン (商標) 対照品 (対照) を10%原液として添加した (対照はCB-1の4倍のナイシン量を含んだ)。抑制を所定の時間にわたり増殖なしの

ための最小濃度により示し、以下の表 4 に表す。

【 0 0 6 7 】

【表 4】

表 4

組成物の有効性

処理	MIC* (増殖なしのために必要とされる抗菌性組成物の%)	ノバシン (商標) 濃度 (ppm)
全乳中		
対照	4	3200
CB-1	2	400
脱脂粉乳中		
対照	0.5	400
CB-1	1	100

*MIC = 最小抑制濃度

【 0 0 6 8 】

次に、これらの組成物に対するリステリア菌の皿集計数を 30°C で 24 時間にわたり培養した TSA 寒天プレート上で得た。その結果を以下の表 5 に示す。

【 0 0 6 9 】

【表 5】

表 5

皿集計数

処理混合物 (ppm)	3%で2日目のCFU**/ml	3%におけるノバシン (商標) 濃度 (ppm)
全乳中 非処理対照	2.4x10 ⁸	0
対照	5.6x10 ⁷	2400
CB-1	5x10 ⁵	600
脱脂粉乳中 非処理対照	0.5%で2日目	0.5%で5日目
対照	1.6x10 ⁸	2.0x10 ⁸
CB-1	1800	2.0x10 ⁵
	1.1x10 ⁶	2%*で1.0x10 ³

*2%CB-1は0.5%での対照と同じナisin濃度を含む。

**CFU=コロニー形成単位 (細胞の数)

【0070】

実施例 3

30ECでの全乳中のC. スポロゲネス菌に対する抗菌性組成物の抑制

全乳を滅菌し、塩化2, 3, 5-トリフェリルテトラゾリウム (TTC) を添加し (色の变化により増殖を示すため)、得られた混合物に約4~5ログ細胞/mlでのスポロゲネス菌 (嫌気性非病原性の孢子形成体) を接種した。抗菌性組成物 (CB-1) およびノバシン (商標) 対照品 (対照) を10%原液として添加した (対照はCB-1の4倍のナisin量を含んだ)。次に、これらの組成物に対するスポロゲネス菌の皿集計数を、30ECで24時間にわたり培養したTSA寒天プレート上で得た。その結果を以下の表6に示す。

【0071】

【表 6】

表 6

処理	CFU/ml
対照	2x10 ⁸
ノバシン	6x10 ⁶
CB-1	2x10 ⁴

【0072】

実施例 4

食品中の毒素産生を遅らせるための抗菌性組成物の有効性

約100個の孢子／グラムを有するタンパク質分解性C. ボツリヌス菌孢子（嫌気性の孢子形成性病原体）の10個の菌株混合物に、88℃で10分間にわたり食物と共に熱ショックを与えた。一部の食品は高脂肪含量を有し、アルフレード・ソース、即席食品（ソース漬けの調理された鶏の胸肉）、即席スープ、および新鮮パスタを含んだ。接種食物試料を15℃または27℃で培養した。抗菌性組成物（CB-1）、ノバシン（商標）、および一つのケースにおいてリゾチームなしのCB-1を10%原液として添加した（ノバシン（商標）処理はCB-1およびリゾチームなしのCB-1と同じ量のナイシンを含んだ）。非処理食物試料を対照品として用いた（対照）。3重の試料を、時間0および処理しようとする特定の食物、そのpH、その温度、などに応じて変わる各抽出間隔で検定した。ABE3価ボツリヌス抗毒素により確認されるボツリヌス菌の存在を検査するために、標準マウス検定法を用いた。これら食品中の毒素産生を遅らせることにおけるこれら抗菌性組成物の有効性を、以下の表7～10に表す。

【0073】

【表7】

表 7

pH 5. 2、27℃でアルフレード・ソース中の毒素

産生を遅らせることにおける抗菌性組成物の有効性

処理	毒素産生のための日数
対照	9~15
CB-1	>60

【0074】

【表8】

表 8

pH 5. 6、27℃で即席食品中の毒素産生を

遅らせることにおける抗菌性組成物の有効性

処理	毒素産生のための日数
対照	7~10
ノバシン*	13~20
CB-1	>30

* ノバシン処理試料はCB-1処理試料と同じ量のナイシンを有した

【0075】

【表9】

表9

pH6.5、15℃で即席スープ中の毒素産生

を遅らせることにおける抗菌性組成物の有効性

10

処理	毒素産生のための日数
対照	12~18
ノバシン**	12~18
リゾチームなしの CB-1	12~18
CB-1	18~25

** ノバシン処理試料は、CB-1処理試料およびリゾチームなしのCB-1処理試料と同じ

量のナイシンを有した。

20

【0076】

【表10】

表10

pH6.0、27℃で新鮮パスタ中の毒素産生

を遅らせることにおける抗菌性組成物の有効性

30

処理	毒素産生のための日数
対照	<10
CB-1	>20

【0077】

本明細書において開示された実施形態に対して種々の修正がなされ得ることは理解されるであろう。従って、上述の説明は限定するものとして見なされるべきではなく、単に好ましい実施形態の例証であると解釈されるべきである。例えば、本明細書において記載される抗菌性組成物成分の種々の組合せ、および種々の食品におけるその使用は、本発明のこれまでの説明から明白であるか、またはそれにより合理的に示唆される。当業者は本明細書に付記されるクレームの範囲および精神内での他の修正を思い描くであろう。

40

フロントページの続き

(72)発明者 キング, ロバート ウィリアム
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94598, ウォルナット クリーク, イグナシオ コート
140

(72)発明者 ペイン, ジャン
アメリカ合衆国, イリノイ 60181, ビラ パーク, ダンビー 1エス226

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許第06207210 (US, B1)
米国特許第05989612 (US, A)
特開平07-115950 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23L 3/00-3/3598