

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6018171号
(P6018171)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016.11.2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	1/20	(2006.01)	C 12 N	1/20	A
A 23 C	9/123	(2006.01)	A 23 C	9/123	
A 23 C	19/032	(2006.01)	A 23 C	19/032	
C 12 P	7/04	(2006.01)	C 12 P	7/04	
C 12 R	1/225	(2006.01)	C 12 N	1/20	A

請求項の数 12 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-503169 (P2014-503169)
 (86) (22) 出願日 平成24年4月9日(2012.4.9)
 (65) 公表番号 特表2014-509871 (P2014-509871A)
 (43) 公表日 平成26年4月24日(2014.4.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2012/056386
 (87) 國際公開番号 WO2012/136832
 (87) 國際公開日 平成24年10月11日(2012.10.11)
 審査請求日 平成27年1月23日(2015.1.23)
 (31) 優先権主張番号 11161665.2
 (32) 優先日 平成23年4月8日(2011.4.8)
 (33) 優先権主張國 歐州特許庁(EP)

微生物の受託番号 DSMZ DSM24616

(73) 特許権者 503260310
 セーホーエル、ハンセン アクティーゼル
 スカブ
 デンマーク国、デコーー 2970 ヘル
 ルスホルム、ペイエ アレ 10-12
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】フレーバー強化ラクトバチルス・ラムノサス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スターーター培養物及びラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を含む乳製品を調製するために適切な組成物であって、前記ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株が、受託番号DSM24616としてドイツ微生物・培養細胞コレクション(DSMZ)に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697、又はその変異体菌株であり、前記変異体菌株が、出発材料として前記寄託された菌株を用いることにより得られ、前記変異体菌株が、ジアセチル生成に関して母菌株と同じ性質を有する、組成物。

【請求項 2】

10

前記スターーター培養物が、好熱性スターーター培養物である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記スターーター培養物が、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 及びラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属から成る群から選択される、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

乳製品の調製のための請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 5】

前記乳製品が、発酵乳製品である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

20

前記発酵乳製品が、ヨーグルトである、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記乳製品が、チーズである、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 8】

前記乳製品が、少なくとも 0 . 7 5 p p m のジアセチルを含む、請求項 4 ~ 7 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

前記乳製品が、少なくとも 1 . 5 p p m のジアセチルを含む、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

乳製品の製造方法であって、以下のステップ :

10

- a) 請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の組成物で乳基質を接種し ;
- b) 前記乳基質を発酵し ;
- c) 任意により、前記乳基質に追加の微生物及び / 又は添加剤を添加し ;
- d) 任意により、前記乳基質を後処理し ; 及び
- e) 任意により、前記乳製品を充填する、

ことを含む、方法。

【請求項 11】

ステップ b) が、 3 5 以上 の温度で前記乳基質を発酵することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

20

受託番号DSM24616としてドイツ微生物・培養細胞コレクション (DSMZ) に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株、又は出発材料として前記寄託された菌株を用いることにより得られ、そしてジアセチル生成に関して母菌株と 同じ性質 を有するその変異体菌株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくとも 1 つのスター ター 培養物、及び乳製品のレオロジーに負の影響を与えないで、乳製品に、増強されたクリーミーフレーバーを付与することができるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を含む、乳製品を調製するために適切な組成物に関する。さらに、本発明は、高含有率のジアセチルを有する乳製品、例えば、低脂肪のヨーグルト又はチーズの製造方法に関する。そのような乳製品の製造のために有用なラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株はまた、本発明の一部である。

30

【背景技術】

【0002】

酪農業界では、低脂肪含有率又は脂肪不含有の製品は、消費者からの需要の増加を抱えている。しかしながら、そのような低脂肪乳製品はしばしば、クリーミーフレーバーの不足を抱えている。

【0003】

40

ジアセチルは高付加価値製品であり、そしてそれは、マーガリン及びオイルベースの製品のような製品に添加されるバター風味産生化合物として酪農業界では使用されている。

【0004】

ヘテロ乳酸菌は、主生成物としてラクテートと共に、副産物としてジアセチル / アセトイソイソを形成する。その細胞は、ピルビン酸オキシダーゼにより、ピルビン酸塩及びチアミンピロリン酸塩から活性アセトアルデヒドを形成する。その活性アセトアルデヒドは、別の分子のピルビン酸塩と縮合し、そして - アセトラクテートシンターゼを形成する。ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) におけるジアセチルの形成は十分には理解されておらず、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス次亜種ジアセチラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) においては、

50

-アセトラクテートは、アセトラクテートオキシダーゼによりジアセチルに酸化されることが示唆されている (Jyoti et al. 2003)。アセトイントは、-アセトラクテートの脱カルボキシル化により直接的に形成される。アセトイント形成は、アセトイントへのジアセチルの不可逆的ジアセチルレダクターゼにより生じ得る。

【0005】

ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) は、ジアセチル及びアセトイントのようなフレーバー化合物を生成するために使用され得るヘテロ乳酸細菌である (Jyoti et al. 2003)。生成されるジアセチルのレベルは、菌株、及びそれが増殖される基質に依存する。

【0006】

米国特許第4,867,992号及び第5,236,833号は、それぞれ、コーヒー基質及びペクチン基質を、乳酸産生細菌と共に発酵することによるジアセチルの製造方法に関する。

【0007】

ジアセチル及び／又はアセトイントの調製、濃縮、及び食品へのその添加は、実質的な費用に結び付く。

【0008】

米国特許第4,678,673号は、ジアセチル及びアセトイントを生成するラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株と共に発酵される脂肪種子製品を対象とする。発酵脂肪種子製品は、バター又は乳様フレーバーを有する。乳製品へのラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) の使用は言及されていない。

【0009】

従って、ジアセチル及び／又はアセトイントの高価な添加を伴わないで、改善されたクリーミーフレーバーを有する乳製品を製造する方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0010】

ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) の菌株の存在下により付与される増強されたクリーミーフレーバーにより改良された乳製品を調製するための組成物及び方法を提供することが本発明の目的である。

【0011】

乳製品、例えばヨーグルト又はチーズに、増強されたクリーミーフレーバーを付与できることに関して、改善された性質を有する新規ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を提供することが本発明の別の目的である。

【0012】

更なる目的は、以下で明らかになるであろうし、そしてさらに、他は、本発明が関与する当業者に明らかであろう。

【0013】

本明細書の実施例から分かるように、受託番号DSM24616としてGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697は、ジアセチル及びアセトイントを生成し、それにより、乳製品のレオロジー及び後酸性化に実質的に悪影響を与えないで、乳製品に増強されたクリーミーフレーバーを付与する。

【0014】

従って、本発明の第1態様は、少なくとも1つのスターター培養物及びラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を含む、乳製品の製造のための組成物に関する。

【0015】

より好ましい実施形態によれば、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株は、受託番号DSM24616としてGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697又はその変異体菌株であり、ここで前記変異体菌株は、出発材料として前記

10

20

30

40

50

寄託された菌株を用いることにより得られる。

【0016】

本発明の第2態様は、乳製品の製造のための本発明の第1態様の組成物の使用に関する。

【0017】

本発明の第3態様は、乳製品の製造方法を対象とし、前記方法は、以下のステップ：

- a) 本発明の第1態様の組成物で乳基質を接種し；
- b) 前記乳基質を発酵し；
- c) 任意により、前記乳基質に追加の微生物及び/又は添加剤を添加し；
- d) 任意により、前記乳基質を後処理し；及び
- e) 任意により、前記乳製品を充填する

ことを含む。

【0018】

本発明の第4態様は、本発明の第3態様の方法により得られる乳製品に関する。

【0019】

本発明の第5態様は、受託番号DSM24616としてGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697又は出発材料として前記寄託された菌株を用いることにより得られるその変異体菌株に関する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、ヨーグルトについての発酵時間 (pH 4.55に達する時間) を示す。ヨーグルトは、0%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(1)、7.5%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(2)、及び15%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(3)を含む、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) の複数菌株を含む乳酸菌培養物により製造される。標準偏差値は、3回の反復試験から計算される。

【図2】図2は、42日間にわたってのヨーグルトのpHの進行を示す。ヨーグルトは、0%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(1)、7.5%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(2)、及び15%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(3)を含む、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) の複数菌株を含む乳酸菌培養物により製造される。標準偏差値は、3回の反復試験から計算される。

【図3】図3は、ヨーグルトについてのレオロジー測定を示す。ヨーグルトは、0%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(1)、7.5%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(2)、及び15%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(3)を含む、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) の複数菌株を含む乳酸菌培養物により製造される。標準偏差値は、3回の反復試験から計算される。

【図4】図4は、ヨーグルトにおけるジアセチルを示す。ヨーグルトは、0%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(1)、7.5%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(2)、及び15%のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697(3)を含む、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) の複数菌株を含む乳酸菌培養物により製造される。標準偏差値は、2回の反復試験から計算される。

【図5】図5は、ミルクにおいて43でヨーグルトバックグラウンド (ストレプトコッ

10

20

30

40

50

カス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) (合計0.007g / 1で接種された))におけるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12534 (0.003g / 1で接種された) 又はラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697 (0.003 g / 1で接種された) の単一菌株との発酵の後の発酵乳における揮発性化合物 (VOC) の濃度を示す。

【図6】図6は、ミルクにおいて43でヨーグルトバックグラウンド (ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) (合計0.007g / 1で接種された))におけるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12534 (0.003g / 1で接種された) 又はラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697 (0.003 g / 1で接種された) 菌株との発酵の後の発酵乳における揮発性化合物 (VOC) の濃度を示す。
10

【図7】図7は、7週間の熟成の後、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697 (0.02% (w / w) で接種された) の添加を伴って (LBArh12697) 又は添加なしで (付加物なし) のゴーダ40+チーズにおけるジアセチルフレーバーの官能評価を示す。結果は、95%最下位距離間隔 (Least Significant Distance intervals) で平均官能値として示される。

【図8】図8は、7週間の熟成の後、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697 (0.02% (w / w) で接種された) の添加を伴って (LBArh12697) 又は添加なしで (付加物なし) のゴーダ40+チーズに検出されるジアセチル臭の官能評価を示す。結果は、95%最下位距離間隔で平均官能値として示される。
20

【図9】図9は、7週間の熟成の後、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697 (0.02% (w / w) で接種された) の添加を伴って (LBArh12697) 又は添加なしで (付加物なし) のゴーダ40+チーズに検出されるジアセチルの量を示す。結果は、標準偏差間隔で平均ジアセチル値 (シグナル / ノイズ比) として表された。

【発明を実施するための形態】

【0021】

定義

本明細書において使用される場合、用語「乳酸菌」 (lactic acid bacterium) とは、優先的に生成される酸として乳酸、酢酸及びプロピオン酸を包含する酸の生成を伴って、糖を発酵する、グラム陽性微好気性又は嫌気性細菌を示す。産業的に最も有用な乳酸菌は、ラクトコッカス属 (*Lactococcus spp.*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus spp.*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus spp.*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc spp.*)、シュードロイコノストック属 (*Pseudoleuconostoc spp.*)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus spp.*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium spp.*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus spp.*) 及びプロピオン菌属 (*Propionibacterium spp.*) を包含する「ラクトバチルス目 (*Lactobacillales*)」内に見出される。さらに、厳格な嫌気性菌、ビフィズス菌、すなわちビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium spp.*) のグループに属する乳酸产生細菌は一般的に、乳酸菌のグループに包含される。それらは頻繁に、単独又は他の乳酸菌と組合して、食品培養物として使用される。
30

【0022】

ラクトバチルス属 (*Lactobacillus spp.*) 及びストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) の種を包含する乳酸菌は、通常、多量のスターーター増殖のための凍結又は凍結乾燥培養物として、又は乳製品、例えば発酵乳製品又はチーズの製造のために発酵容器又はタンク中の直接的接種のために意図された、いわゆる「直接タンク設定」 (Direct Vat Set) (DVS) 培養物として、酪農産業に供給される。そのような乳酸菌培養物は一般的に、「スターーター培養物 (starter cultures) 又は「スターーター」 (starters) として言及される。

【0023】

用語「中温菌」 (mesophile) とは、本明細書において使用される場合、中位の温度 (

10

20

30

40

50

15 ~ 40) で最も増殖する微生物を言及する。産業的に最も有用な中温菌は、ラクトコッカス属 (*Lactococcus spp.*) 及びロイコノストック属 (*Leuconostoc spp.*) を包含する。用語「中温発酵」 (*mesophilic fermentation*) とは、本明細書において使用される場合、約 12 ~ 約 35 の温度での発酵を言及する。用語「中温乳製品」 (*mesophilic dairy products*) とは、中温スターー培養物の中温発酵により調製される乳製品を言及し、そしてバーミルク、サワーミルク、培養ミルク、スメタナ (*smetana*)、サワークリーム及びフレッシュチーズ、例えばクォーク、トバログ (*trarog*) 及びクリームチーズのような乳製品を包含する。

【0024】

用語「好熱性」 (*thermophile*) とは、本明細書において使用される場合、43 以上 10 の温度で最も良に増殖する微生物を言及する。産業的に最も有用な好熱性細菌は、ストレプトコッカス属及びラクトバチルス属を包含する。用語「好熱性発酵」 (*thermophilic fermentation*) とは、本明細書において使用される場合、約 35 以上の温度での発酵を言及する。用語「好熱性乳製品」 (*thermophilic dairy product*) とは、好熱性スターー培養物の好熱性発酵により調製される乳製品を言及し、そしてヨーグルトのような乳製品を包含する。

【0025】

用語「ミルク」 (*milk*) とは、哺乳類、例えば牛、羊、ヤギ、バッファロー又はラクダを搾乳することにより得られる乳分泌物として理解されるべきである。好ましい実施形態によれば、ミルクは牛乳である。用語ミルクはまた、植物材料、例えば豆乳から製造されるタンパク質 / 脂肪溶液も包含する。

【0026】

用語「乳基質」 (*milk substrate*) とは、本発明の方法に従って発酵にゆだねられ得るいずれかの原料及び / 又は加工乳材料であり得る。従って、有用な乳基質としては次のものを挙げることができるが、但しそれらだけには制限されない：タンパク質を含む何れかの乳又は乳様製品、完全又は低脂肪ミルク、スキムミルク、バーミルク、再構成乳粉末 (*reconstituted milk powder*)、練乳、粉乳、ホエー、ホエー浸透物 (*whey permeate*)、ラクトース、ラクトースの結晶化からの母液、ホエータンパク質濃縮物又はクリームの溶液 / 懸濁液。明らかに、乳基質は、いずれかの哺乳類に起源することができ、例えば実質的に純粋な哺乳類乳又は再構成乳粉末であり得る。

【0027】

発酵の前、乳基質は、当業者において知られている方法に従って、均質化され、そして低温殺菌され得る。

【0028】

「均質化する」 (*homogenizing*) とは、本明細書において使用される場合、可溶性懸濁液又はエマルジョンを得るために集中的混合を意味する。均質化が発酵の前に実施される場合、それは乳脂肪が、ミルクからもはや分離しないように、より小さなサイズに分解するために実施される。これは、小さな開口部を通してミルクに高圧力をかけることにより達成され得る。

【0029】

「低温殺菌する」 (*pasteurizing*) とは、本明細書において使用される場合、生存生物、例えば微生物の存在を低めるか又はそれを排除するための乳基質の処理を意味する。好ましくは、低温殺菌は、特定温度で特定時間、維持することにより達成される。その特定温度は通常、加熱により達成される。温度及び持続時間は、一定の細菌、例えば有害な細菌を殺害するか又は不活性化するために選択され得る。急速冷却ステップが続くことができる。

【0030】

本発明の方法における「発酵」 (*fermentation*) とは、微生物の作用を通しての炭水化合物のアルコール又は酸への変換を意味する。好ましくは、本発明の方法における発酵は、ラクトースの乳酸への変換を包含する。

10

20

30

40

50

【0031】

乳製品の製造に使用される発酵工程は良く知られており、そして当業者は、適切な工程条件、例えば温度、酸素、微生物の量及び特性、及び工程時間をいかにして選択するかを知っているであろう。明らかに、発酵条件は、本発明の達成を支持し、すなわち固体形（例えば、チーズ）又は液体形（例えば、発酵乳製品）で乳製品を得るよう選択される。

【0032】

本明細書において、用語「剪断応力」（shear stress）は粘度を決定する。粘度（単位はPa sである）は、剪断応力（Pa）／剪断速度（1/s）として定義される。剪断応力値は、本明細書において、剪断速度 = 300 1/sで標準として報告される。官能実験は、レオロジー測定値と官能粘度／口での濃厚さ（mouth thickness）との間の最良な相互関係が、300 1/sの剪断速度で測定される粘度を用いる場合に見出されることを示した（データは示されていない）。

10

【0033】

本明細書において、用語「変異体」（mutant）とは、例えば遺伝子工学、放射線、UV光及び／又はゲノムに変化を誘導する化学的処理及び／又は方法により、本発明の菌株から誘導される菌株として理解されるべきである。好ましくは、変異体は、機能的に同等の変異体、例えば母菌株と実質的に同じか又は改良された性質（例えば、ジアセチル生成、粘度、ゲル剛性、マウスコーティング、風味、後酸性化、酸性化速度及び／又はファージ堅牢性（phage robustness）に関する）を有する変異体である。そのような変異体は、本発明の一部である。特に、用語「変異体」（mutant）とは、いずれかの従来使用される突然変異誘導処理、例えば化学的変異原、例えばエタンメタンスルホネート（EMS）又はN-メチル-N-ニトロ-N-ニトログアニジン（NTG）、UV光に、本発明の菌株をゆだねることにより得られる菌株又は自発的に発生する菌株を意味する。変異体は、数回の突然変異誘導処理（单一の処理は1つの突然変異誘導ステップ、続いてスクリーニング／選択ステップを含むものとして理解されるべきである）にゆだねられ得るが、しかし現在、好ましくは、20以下、又は10以下、又は5以下の処理（又はスクリーニング／選択ステップ）が実施される。現在、好ましい変異体においては、細菌ゲノムにおける、5%以下又はさらに、0.1%以下のヌクレオチドが、母菌株と比較して、別のヌクレオチドにより変更され、又は欠失されている。

20

【0034】

30

本発明の記載において（特に、以下の特許請求の範囲において）、用語「不定冠詞」（a及びan）及び「定冠詞」（the）及び類似する参照は、特にことわらないか又は明確に矛盾しない限り、単数及び複数の両方に及ぶものとして解釈されるべきである。用語「含む」（comprising）、「有する」（having）、「含む」（including）及び「含む」（containing）とは、特にことわらない限り、開放端用語（すなわち、「含むが、但しそれらだけには限定されない」（including, but not limited to）として解釈されるべきである。値の範囲の列挙は、本明細書において、特にことわらない限り、範囲内にある各値を個々に参照する簡単な方法として役立つよう單に意図されており、そして各値は、それが本明細書に個々に引用されているかのように、本明細書中に組込まれる。本明細書に記載されるすべての方法は、特にことわらない又は明らかに矛盾しない限り、いずれかの適切な順序で実施される。本明細書で提供される、いずれか及びすべての実施例、又は典型的な用語（例えば、「例えば」（such as））は、本発明をより明らかにすることを意図しており、そして特にことわらない限り、本発明の範囲を制限するものではない。本明細書における用語は、本発明の実施に不可欠ないずれかの請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

40

【0035】

本発明の実施及び態様

本発明者等は驚くべきことに、スターター培養物の他に、ラクトバチルス・ラムノサス（*Lactobacillus rhamnosus*）の菌株により乳基質を接種し、そして発酵することにより、乳製品の質感、発酵時間及び後酸性化に負の影響を与えないで、得られる乳製品に心地

50

よいクリーミーなフレーバーを付与することが可能である。

【0036】

増強されたクリーミーフレーバーは、受託番号DSM24616としてGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697の存在下で、中温(26 ~ 30)及び好熱性(43)発酵工程により調製される乳製品で検出された。

【0037】

用語「増強されたクリーミーフレーバー」(enhanced creamy flavor)とは、製品中のジアセチル及び/又はアセトインの含有率が高められ、そして/又は官能パネルにより決定される場合の製品のクリーミーフレーバーが、本発明のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を含まない製品に比較して、増強されることを意味する。
10

【0038】

理論に束縛されるものではないが、本発明のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株により乳製品に付与される増強されたクリーミーフレーバーは、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株によるジアセチル及び/又はアセトインの増強された製造によるものであると思われる。

【0039】

好ましい実施形態によれば、乳製品は、本発明のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株が発酵に使用されていない場合、クリーミーフレーバーを実質的に欠いている低脂肪/非脂肪発酵乳製品である。
20

【0040】

本明細書に記載されるようなラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株は、少なくとも1つのスターター培養物及びラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株を含む乳製品の製造のための組成物において有用である。

【0041】

典型的には、そのような組成物は、濃縮された形、例えば典型的には、組成物1g当たり $10^4 \sim 10^{12}$ cfu (コロニー形成単位)、例えば組成物1g当たり少なくとも 10^4 cfu、例えば少なくとも 10^5 cfu/g、例えば少なくとも 10^6 cfu/g、例えば少なくとも 10^7 cfu/g、例えば少なくとも 10^9 cfu/g、例えば少なくとも 10^{10} cfu/kg、例えば少なくとも 10^{11} cfu/gで存在する、生存細胞の濃度を有する、凍結され、乾燥され又は凍結乾燥された濃縮物形における細菌を含む。従って、本発明の抗菌組成物は好ましくは、凍結され、乾燥され、又は凍結乾燥された形で、例えば直接タンク設定(Direct Vat Set) (DVS) 培養物として存在する。しかしながら、本明細書において使用される場合、抗菌組成物はまた、凍結され、乾燥され、又は凍結乾燥された細胞濃縮物を、液体媒体、例えば水又はPBS緩衝液に懸濁した後に含まれる液体でもあり得る。本発明の抗菌組成物が懸濁後である場合、生存細胞の濃度は、組成物1ml当たり $10^4 \sim 10^{12}$ cfu (コロニー形成単位)、例えば組成物1ml当たり少なくとも 10^4 cfu、例えば少なくとも 10^5 cfu/ml、例えば少なくとも 10^6 cfu/ml、例えば少なくとも 10^7 cfu/ml、例えば少なくとも 10^8 cfu/ml、例えば少なくとも 10^9 cfu/ml、例えば少なくとも 10^{10} cfu/ml、例えば少なくとも 10^{11} cfu/mlである。
30
40

【0042】

組成物はさらに、追加の成分として、凍結防止剤及び/又は従来の添加剤、例えば栄養物、例えば酵母抽出物、糖及びビタミン、例えばビタミンA, C, D, K又はビタミンBファミリーのビタミンを含むことができる。本発明の組成物に添加される適切な凍結防止剤は、微生物の耐寒性を改善する成分、例えばマンニトール、ソルビトール、トリポリリン酸ナトリウム、キシリトール、グリセロール、ラフィノース、マルトデキストリン、エリトリトール、トレイトール、トレハロース、グルコース及びフルクトースである。他の添加剤としては、炭水化物、風味剤、鉱物、酵素(例えば、レンネット、ラクターゼ及び
50

/又はホスホリパーゼ)を挙げることができる。

【0043】

スターーター培養物として混合培養物を適用することは、乳酸菌発酵工程においては通常であるので、組成物は、ある実施形態によれば、同じ種に属するか、又は異なった種に属する複数菌株を含むであろう。スターーター培養物における乳酸菌のそのような有用な組合せの典型的な例は、ラクトバチルス・ブルカリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) 菌株及びストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 菌株の混合物である。

【0044】

本発明の好ましい実施形態によれば、スターーター培養物は、好熱性スターーター培養物であり、そして組成物は好熱性発酵のために適切である。 10

【0045】

別の好ましい実施形態によれば、スターーター培養物は、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 及びラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) から成る群から選択される。好ましい実施形態によれば、スターーター培養物は、少なくとも1つのラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 菌株を含む。スターーター培養物は、当業者において知られている、いざれかのラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、例えばラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ホルダニアエ (*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*)、又はラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) からの菌株を含むことができる。さらに別の好ましい実施形態によれば、スターーター培養物はラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 菌株及びラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 菌株を含む。組成物は、増強されたクリーミーフレーバーを有する乳製品の調製のために使用され得る。 20

【0046】

好ましい実施形態によれば、乳製品は、発酵乳製品、例えばヨーグルトである。別の好ましい実施形態によれば、乳製品はチーズである。

【0047】

好ましい実施形態によれば、乳製品は少なくとも0.75 ppmのジアセチル、例えば少なくとも1.0 ppmのジアセチル、例えば少なくとも1.5 ppmのジアセチルを含む。中温性乳製品は、約0.75 ppm~3.00 ppmのジアセチル、より好ましくは約1.00~2.50 ppmのジアセチル及び最も好ましくは約1.5 ppm~2 ppmのジアセチルを含むことができる。好ましい実施形態によれば、中温性乳製品は、1.5 ppm以上のジアセチルを含む。当業者は、本発明の乳製品におけるジアセチルの含有率を決定するための多くの方法を認識しているであろう。例えば、その含有率は、適切なクロマトグラフィー方法、例えば静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HSGC) により決定され得る。 30

【0048】

前述のように、本発明の態様は、以下のステップ:

- a) 本発明の第1態様の組成物で乳基質を接種し;
- b) 前記乳基質を発酵し;
- c) 任意により、前記乳基質に追加の微生物及び/又は添加剤を添加し;
- d) 任意により、前記乳基質を後処理し; 及び
- e) 任意により、前記乳製品を充填する

ことを含む、クリーミーフレーバーを有する乳製品の製造方法に関する。

【0049】

上記のように、ステップa)に使用される乳基質は、本発明の方法に従って発酵にゆだねられ得る何れかの原料及び/又は加工乳材料であり得る。

【0050】

10

20

30

40

50

乳基質はいずれかの適切な方法により、上記組成物で接種され得る。例えば、乳基質は、直接的な接種により発酵容器中に接種され得る。

【0051】

1つの好ましい実施形態によれば、ステップb)は、約37℃以上の温度で乳基質を発酵することを含む。発酵は好ましくは、約38℃～約45℃、より好ましくは約39℃～約42℃の温度で実施される。別の好ましい実施形態によれば、乳基質は、約40℃で発酵される。乳製品の製造に使用される発酵工程は、良く知られており、そして当業者は、適切な工程条件、例えば温度、酸素、微生物の量及び特性、及び工程時間をいかにして選択するかを知っている。明らかに、発酵条件は、改善されたフレーバー及び高質感を有する乳製品の製造に適切な発酵乳製品を得るために選択される。

10

【0052】

さらなる微生物及び／又は添加剤は、ステップb)において乳基質の発酵の前、間又は後に乳基質に添加され得る。乳基質に添加され得る微生物は、乳製品の性質に、好都合な態様で寄与するであろう。例えば、微生物は、乳製品におけるジアセチル製造、粘度、ゲル剛性、マウスコーティング、風味、後酸性化及び／又は酸性化速度を改善するか又は支持することができる。任意により、他の成分、例えば着色剤、安定化剤、例えばペクチン、澱粉、変性澱粉、CMC等；多価不飽和脂肪酸、例えばオメガ-3脂肪酸が乳基質に添加され得る。そのような成分は、製造工程の間、いずれかの時点で、例えば発酵の前又は後で添加され得る。

【0053】

20

乳基質はさらに、所望する乳製品を製造するのに必要な、いずれかの手段により後処理され得る。例えば、さらなる成分、例えば抗凍結剤及び／又は従来の添加剤、例えば栄養物、例えば酵母抽出物、糖及びビタミンが、乳基質に添加され得る。さらに、乳基質は均質化されるか、又は熱処理され、すなわち低温殺菌され得る。

【0054】

乳製品は、当業者において知られている何れかの適切な手段で充填され得る。例えば乳製品は、例えば25～1500mlの範囲の容積を有する密封容器に充填され得る。乳製品は、製造工程の間、いずれかの時点でも充填され得、例えば接種ステップの次に充填され、そして次に、その充填下で発酵され得る。

【0055】

30

本発明の方法により得られる乳製品は、典型的な例として、ヨーグルト、サワークリーム、チーズ及びバターミルクのような製品を包含する。上記方法により得られる乳製品もまた、本発明の一部である。

【0056】

好ましい実施形態によれば、乳製品は、発酵乳製品である。好ましくは、発酵乳製品はヨーグルトである。

【0057】

さらに別の好ましい実施形態によれば、乳製品はチーズである。

【0058】

好ましい実施形態によれば、乳製品は、少なくとも0.75ppmのジアセチル、例えば少なくとも1.0ppmのジアセチル、例えば少なくとも1.5ppmのジアセチルを含む。

40

【0059】

本発明の第5態様は、受託番号DSM24616としてGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)に寄託されたラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株に関する。この菌株とは別に、本発明はまた、それに由來した変異体にも関し、すなわちそれらは、寄託された菌株CHCC12697を、出発材料として用いることにより得られた。変異体菌株は、例えば遺伝子工学、放射線、UV光、化学的処理及び／又はゲノムの変化を誘導する方法により、CHCC12697から誘導され得る。本発明の変異体は、酢酸塩、アセトアルデヒド、ジアセチル及び／又はアセトイソの生成レベルの点

50

で、母菌株と同じ特性を実質的に有する。好ましくは、変異体は、実質的に、少なくとも 80 % 又はそれ以上、少なくとも 90 % 又はそれ以上、少なくとも 95 % 又はそれ以上、又はさらに 100 %まで又はそれ以上の酢酸塩、アセトアルデヒド、ジアセチル及び／又はアセトイソイソを、その母菌株に比較して生成する。

【0060】

出発材料として、寄託された菌株を用いることにより、当業者は、従来の突然変異誘導又は再単離技法により、本明細書に記載される関連する特徴及び利点を保持する、さらなる変異体又はその誘導体を日常的に得ることは、当業者に明らかである。従って、第1態様の用語「その変異体」(mutant thereof)とは、出発材料として寄託された菌株を用いることにより得られる変異体菌株に関する。

10

本発明の実施形態が、非制限的例により、下記に記載される。

【実施例】

【0061】

実施例1：酸性化されたボイルドミルクにおける高アセトイソイソレベルを有する高熱性ラクトバチルス属 (Lactobacillus spp.) のスクリーニング

176のラクトバチルス種 (Lactobacillus sp.) 菌株の選択を、約24時間、30、37、40及び43で、ボイルドミルクを酸性化する能力について試験した。37インキュベーション由来の酸性化されたボイルドミルクを、実施例5に記載のようにして、ヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより、発酵の後、揮発性有機化合物 (VOC) について直接試験した。CHCC12697の名称の菌株が、高レベルのアセトイソイソ (135 ppm) 及びまた、かなり高レベルのアセトアルデヒド (8 ppm) を生成することが見出された (データは示されていない)。この菌株は、中温温度 (30 ~ 37) 及び好熱性温度 (40 ~ 43) の両者で、ボイルドミルクを酸性化することを観察した。この菌株はまた、40及び43で、2%グルコース、又は2%ラクトース、又は2%フルクトース又は2%ガラクトースにより補充されたMRSブイヨンにおいて高ODに増殖することを観察した。その菌株は、抗生物質に対して耐性ではなかった。部分的16S rRNA 遺伝子配列決定は、その菌株がラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) であったことを示した。

20

【0062】

実施例2：ヨーグルトの製造方法

30

スキムミルク (DanMaelk, Aria) を、2%スキムミルク粉末 (Aria) により強化し、そして90で20分間、熱処理した。この溶液を、バックグラウンドスターーター培養物及びラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697菌株で接種するか、又はラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697菌株なしで接種した。

【0063】

ヨーグルトを製造するために使用されるバックグラウンドスターーター培養物を、0.02%の割合で接種された、凍結直接タンク設定 (Direct Vat Set) (F-DVS) 形態において、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) 及びラクトバチルス・ブルカリカス (Lactobacillus bulgaricus) の複数菌株から構成した。F-DVS形態におけるラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) 菌株を、結果のセクションに記載される量で、バックグラウンドスターーター培養物に添加した。接種で、細胞数は、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) 及びラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) 菌株について 1×10^{10} cfu/g以上、及びラクトバチルス・ブルカリカス (Lactobacillus bulgaricus) 菌株について 1×10^8 cfu/g以上であった。

40

【0064】

接種された溶液を43に加熱し、そしてpH 4.55まで発酵した。pH 4.55に達する時間は、図1に示される発酵時間である。pH 4.55に達すると、ヨーグルトを、2バールの圧力で、25で、後処理ユニットによりポンプで送り、そしてプラスチッ

50

クカップ中に満たし、次に冷蔵下に置いた。レオロジー測定を、1日の冷蔵の後に行った。ヨーグルト中のpHの進行を、1, 14, 28及び42日の冷蔵の後に測定した。ジアセチル測定を、7日の冷蔵の後に行った。

【0065】

実施例3：pHの進行を測定するための方法

分析の日(1、14、28及び42日の冷蔵の後)、ヨーグルトを含む1つのプラスチックカップを、冷蔵から取り、そしてpH計(pHM 240、Meter Lab)を用いて、pHを測定した。測定の前、pH計を校正した(7.00及び4.01の緩衝液による2点校正)。サンプルとして、校正のために使用される緩衝液は冷貯藏された。図2は、pHの進行を示す。

10

【0066】

実施例4：ゲル硬度及び粘度の測定方法

ゲル硬度を、自動サンプル交換装置を備えたAnton Paarレオメーター(Physica DSR Rheometer + ASC)を用いて測定した。測定ボブを、20mlのヨーグルトサンプルを含む測定カップに配置し、それを手動攪拌し、そして13℃に加熱した。ボブをヨーグルトサンプルに配置した後、待機時間を適用した。待機することにより、カップにボブを配置することにより壊れた構造のほとんどが再構築した。次に、ゲル硬度を、振動により測定した。ここで、菌株は、0.3%で一定に保持され、そして周波数を0.5ヘルツから30ヘルツに高めた。それらの測定から、弾性率(G')及び粘性率(G'')が、計算され得、そしてそれから、複素弾性率(G*)が得られた。

20

【0067】

【数1】

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

【0068】

1ヘルツでのG*は、ゲル硬度に相関し、そして異なったサンプルの比較のために使用した(図3)。

30

【0069】

同じ装置(Anton Paarレオメーター)を用いて、粘度を、10秒ごとの測定点(剪断応力)を伴って、0.2707 1/sから300 1/sに剪断速度を高めることにより測定した。次に、剪断速度を、10秒ごとの測定点を伴って、275 1/sから0.2707 1/sに低めた。製品の粘度はフロー曲線測定において、300 1/sでの剪断応力に相関し、そして図3に示した。

【0070】

実施例5：揮発性化合物(VOC)の測定方法

ヨーグルトサンプルを、複雑なマトリックス中の揮発物を分析するための強力技法である静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(HSGC)により分析した。その設定は、フレームイオン化検出器(FID)と共にガスクロマトグラフに連結される静的ヘッドスペースサンプラーから成了た。使用される装置(カラムを含む)及びソフトウェアを以下に列挙する：

40

HS-自動サンプラー: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer,

HS-ソフトウェア: HSControl v.2.00, Perkin Elmer,

GC:自動システム XL, Perkin Elmer,

GC-ソフトウェア: Turbochrom navigator, Perkin Elmer,

カラム: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33 μm, Agilent Technologies.

【0071】

既知濃度の標準を用いて、応答係数(校正)を決定し、対照を用いて、応答係数が分析シリーズ内で及び中間シリーズで、及び時間(月)にわたって安定するよう制御した。サ

50

ンプル及び対照中の揮発物の濃度(ppm)を、標準からである応答係数を用いて、決定した。

【0072】

サンプルを、1 g のヨーグルトサンプルに、200 μl の4 N の H₂SO₄を添加することにより調製した。ジアセチル含有率を、図4に示す。

【0073】

結果

図1～4のグラフは、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株を伴って及びそれを伴わないで、乳酸菌培養物により製造されたヨーグルトにおいて得られた結果を要約する。

10

【0074】

ヨーグルトを製造するために使用される乳酸菌培養物におけるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株の存在は、発酵時間(図1)、後酸性化(図2)又はヨーグルトのレオロジー特性(図3)に影響を及ぼさない。

【0075】

ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株がヨーグルトを製造するために使用される乳酸菌培養物に存在する場合、有意に高い量のジアセチルがヨーグルトに測定され得る(図4)。

【0076】

実施例6：ヨーグルトの官能分析

20

ヨーグルト中のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697の存在の効果を記録するために、クリーミーフレーバーの官能評価を、訓練パネルを用いて実施した。試験は、2-AFC試験(AFC:代替強制選択)/対比較試験として実施された。この試験は、2種のサンプルが1つの属性(この場合、クリーミーフレーバー)に焦点を当てて評価されるべきである場合、適切である。この試験は、目的が、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株の存在が増強されたクリーミーフレーバーをもたらすことを確認することであったので、一方的として見なされるべきである。

【0077】

合計20の供給から、評価者に、最高強度のクリーミーフレーバーを有するサンプル(2つのうち)を指摘してもらった。ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株を含むヨーグルトを、最高強度のクリーミーフレーバーを有するものとして、20の供給のうち15において指摘した。この数は、有意差(a=0.45)を構成する。

30

【0078】

2-AFC試験(AFC:代替強制選択)/対比較試験についての参照: Meilgaard M.C., Civille, G.V. & Carr, B.T. (2007). *Sensory Evaluation Techniques*, 4th Ed . Chapter 7 : Attribute Difference Tests: How does attribute X Differ Between Samples? pp. 105- 128. CRC Press.

【0079】

実施例7：2種のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株により生成されるヨーグルト風味に関連する選択された VOC のスクリーニング

40

発酵乳製品における、それぞれラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697及びラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12534の使用による、ヨーグルト風味に関連するVOCのレベルに対する効果を決定するために、試験を、ミルク(0.1%脂肪、3.7%タンパク質及び4.8%ラクトース)におけるヨーグルト発酵条件(43)で実施し、ここで菌株は、単独で、又はバックグラウンドとして、ヨーグルト培養物(ラクトバチルス・ブルカリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) 及びストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*))を用いて試験された。アセトイン、アセトアルデヒド、エタノール及びジアセチルのレベルを、実

50

施例5に記載されるように、16時間の発酵の後に、決定した。

【0080】

試験を、ミルク(0.1%脂肪、3.7%タンパク質及び4.8%ラクトース)、及びラクトバチルス・ラムノサス(*Lactobacillus rhamnosus*)CHCC12697及びラクトバチルス・ラムノサス(*Lactobacillus rhamnosus*)CHCC12534(10g/l)の一晩の培養物を用いて、マイクロタイタープレート上で実施した。液体処理を、Multiprobe II PLUS口ボット(Perkin Elmer)により行った。

【0081】

【表1】

10

結果:

表1: CHCC12534、CHCC12697又はヨーグルト培養物(バックグラウンド)で発酵したミルクにおけるVOCのレベル:

	アセトアルデヒド	エタノール	ジアセチル	アセトイソ
CHCC12534 (0.003 g/l)	2.8	2.4	2.7	60.5
CHCC12697 (0.003 g/l)	3.7	1.9	2.8	67.4
バックグラウンド (0.007 g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
ミルク	0.1	0.3	0.0	0.0

20

【0082】

CHCC12697及びCHCC12534の両者は、接種比率の半分以下でさえ、バックグラウンドとして使用されるヨーグルト培養物よりも有意に高いレベルのジアセチル及びアセトイソを生成する。ヨーグルト培養物は、有意に高いアセトアルデヒドレベル(より高い接種比率)を生成する。CHCC12697及びCHCC12534のプロフィールは、単一菌株レベルで、お互い有意に異なる(表1及び図5)。

【0083】

【表2】

30

表2: CHCC12534及びヨーグルト培養物(CHCC12534及びバックグラウンド)、CHCC12697及びヨーグルト培養物(CHCC12697及びバックグラウンド)、又はヨーグルト培養物(バックグラウンド)で発酵したミルクにおけるVOCのレベル:

	アセトアルデヒド	エタノール	ジアセチル	アセトイソ
CHCC12534 (0.003 g/l)及び バックグラウンド (0.007 g/l)	3.7	2.4	5.0	61.8
CHCC12697 (0.003 g/l)及び バックグラウンド (0.007 g/l)	12.7	4.2	5.2	127.9
バックグラウンド (0.007 g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
ミルク	0.1	0.3	0.0	0.0

40

【0084】

ヨーグルトバックグラウンド培養物と共に発酵したCHCC12697(30%の接種物)は、ヨーグルトバックグラウンドと共に発酵したCHCC12534(30%の接種物)に比較して、及びバックグラウンド接種物のみに比較して、有意に高いレベルのアセトイソ、アセトアルデヒド及びエタノールを生成する。ヨーグルトバックグラウンド培養物と共に発酵したCHCC12697及びCHCC12534(両者とも、30%の接種物)は、有意に異なったレベルのジアセチルを生成しない(表2及び図6)。

【0085】

ヨーグルト培養物における30%のCHCC12697の添加は、表3に従ってVOCの上昇をもた

50

らした。

【0086】

【表3】

表3：30% CHCC12697又は30% CHCC12534の添加によるヨーグルト培養物におけるVOCの上昇：

	CHCC12697	CHCC12534
アセトアルデヒド	119%	-36%
エタノール	133%	33%
ジアセチル	189%	178%
アセトイソ	246%	68%

10

【0087】

実施例8：ラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697を有するヨーグルトの官能性質

ラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697を有するヨーグルトのゲル硬度、口での濃厚さ及びクリーミーフレーバーを分析するためにヨーグルトを、添加された2%スキムミルク粉末と共に均質化されたスキムミルクから、3L規模の容器において製造した。そのベースを、92で20分間、殺菌し、そして接種のために43で冷却した。バックグラウンドスターーター培養物（ストレプトコーカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) 及びラクトバチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus)）を、0.02%で接種した。ラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697を、一晩の培養物（パッチ当たり15g）として添加した。

20

【0088】

ヨーグルトをpH4.55まで発酵し、次に攪拌し、冷却し、そして200ml容器に充填した。サンプルの官能評価を、5メンバーの官能パネルにより、7日後に行った。パネルは、サンプルの順位のための固定点（値0）を創造するために参照サンプル（フレーバー培養物は添加されていない）を使用した。次に、サンプルを、各記述について参照サンプルに比較して評価し、そしてすべての判断についての平均値を用いて、各記述についての平均値評点を得た（表4）。

30

【0089】

【表4】

表4：添加されるラクトバチルス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697を有するヨーグルトサンプルの官能評価：

	ゲル硬度	口での濃厚さ	クリーミーフレーバー	アセトアルデヒド	ジアセチル
CHCC12697 (Lb. ラムノサス)	2	1.8	1.5	0.8	1.8
バックグラウンド／フレーバーなし	0.1	0.5	1	0.1	0.25

40

【0090】

ヨーグルトへのCHCC12697の添加は、高いゲル硬度、良好な口での濃厚さ及び増強されたクリーミーフレーバーをもたらした。

【0091】

実施例9：ゴーダ40+チーズの製造方法

ゴーダ40+チーズを、150Lの殺菌された全乳から製造した（72で20秒）。ミルクを5に冷却し、そしてそれを、使用の前、38%クリームとタンパク質レベル（3.4～3.7%）（脂肪：タンパク質の比率）に応じて標準化した。その標準化を、ミ

50

ルク中のタンパク質含有率及び乾燥物質で40%脂肪を有する標準的ゴーダチーズに基づいて計算した。

【0092】

標準化の後、ミルクを、32°の前熟成温度まで、熱交換器において予備加熱し、そしてチーズバットにポンプで送った。ゆっくりした搅拌(235 rpm)を、レンネットがミルクに分散されるまで、続けた。

【0093】

ゴーダ40+チーズを、表5におけるパラメーターを用いて製造した。

【0094】

0.01% (w/w) 酸性化培養物(CHN-19, Chr. Hansen /S)、0.02% (w/w) レンネット(10 Chy-Max Plus, Chr.Hansen A/S)、0.01% (w/w) CaCl₂ (34% 溶液) 及び 0.01% (w/w) 硝酸の添加物を、各チーズに添加した。0.02% (w/w) の補助培養物(ラクトバチルス・ラムノサス(Lactobacillus rhamnosus) CHCC12697)を1つのバットに添加し、7週間の熟成の後、ジアセチル臭及び風味に対する菌株の効果を試験した。

【0095】

チーズを、10°で22%塩水において20時間、塩漬けした。チーズを被覆し、そしてプラスチックバッグに真空充填し、そして9°で1週間、続いて13°で2週間及び9°で2週間、貯蔵した。この後、ゴーダ40+を5°で貯蔵した。

【0096】

【表5】

20

表5：ゴーダ40+についてのチーズ製造パラメーター：

ステップ	持続時間	値
予備発酵	35分	32°C
レンネット時間	35分	
予備搅拌	20分	
ホエーオフ(Whey off)	5分	52.5kg
中間搅拌	10分	
熱処理時間	15分	38°C/51°Cでの45kgの水
最終搅拌	40分	
バットの端へのカード	5分	
予備加圧	25分	1バール/10分-2バール/15分
加圧1	15分	2バール/15分
加圧2	15分	3.5バール/15分
加圧3	90分	5バール/90分

30

【0097】

実施例10：チーズの化学分析

40

ゴーダ40+チーズにおけるラクトバチルス・ラムノサス(Lactobacillus rhamnosus)CHCC12697の存在の効果を記録するために、それぞれジアセチル臭及び風味の官能評価を、訓練パネルを用いて実施した。

【0098】

官能評価を、ランキング検定を用いて行った。サンプルを、官能評価の前、13°で保持した。サンプルは、蓋付きで、3行のランダム数字によりラベルされたプラスチックボックスにランダムに出された。チーズサンプルを、1-8の規模で評点をつけ、1は低強度の臭又は風味であり、そして8は高強度の臭い又は風味である。差異分析が各官能記述子に対して行われた。ANOVAの結果は、12人の評価者により評価されるように、官能記述子の平均値を示すプロットにより説明された。プロットはまた、各平均の周りに間隔を

50

示した。示される間隔は、Fisherの最小有意差（LSD）手順に基づく。それらは、2つの平均が同じである場合、それらの間隔は時間の95.0%と重複するような手段で構成された。垂直方向に重ならない任意の間隔対は、統計学的有意差を有する平均値対を示す。

【0099】

ゴーダ40+チーズへのラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHC C12697の添加は、ジアセチル臭及び風味の知覚を有意に高めた（図7及び8）。

【0100】

実施例11：チーズの化学分析

ゴーダ40+チーズにおけるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697の存在の効果を記録するために、ジアセチル含有率の化学分析を、実施例5に記載のようにして（チーズのサンプル調製は除く）、ガスクロマトグラフィーを用いて実施した。10

【0101】

チーズプラグを、使い捨ての3mlの注射器を用いてサンプリングした。底をナイフにより除き、そして注射器をチーズ中に押し、「プラグ」(plug)を切断した。その「プラグ」を、20mlのヘッドスペースバイアルに移した。酸素感受性化合物の分析のために、バイアルを、キャップより閉じる前、窒素によりフラッシュした。酸を、チーズサンプルに添加しなかった。

【0102】

ゴーダ40+チーズへのラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHC C12697の添加は、チーズにおけるジアセチルのレベルを有意に高めた（図9）。20

【0103】

寄託及び専門家の解決策

出願人は、下記に言及される寄託された微生物が、特許が付与される日まで、専門家に利用可能にすることを要求する。

【0104】

ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) CHCC12697菌株は、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、2011年3月1日に寄託され、そして受託番号DSM24616を付与された。30

【0105】

寄託物は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に従って行われた。

【0106】

参考文献：

Jyoti, B.D., Suresh, A.K., and Venkatesh, K.V. (2003) : Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19 : 509-514.

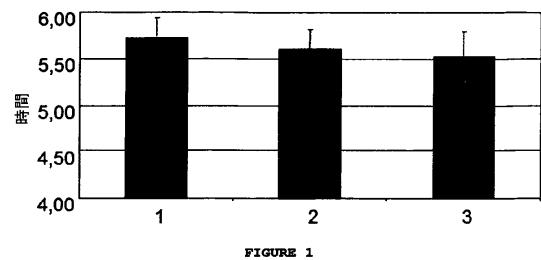
米国特許第4,678,673号 (Marshall et al.)

米国特許第4,867,992号 (Boniello et al.)

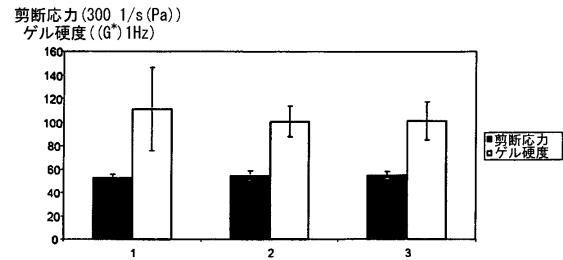
米国特許第5,236,833号 (Duboff et al.)

40

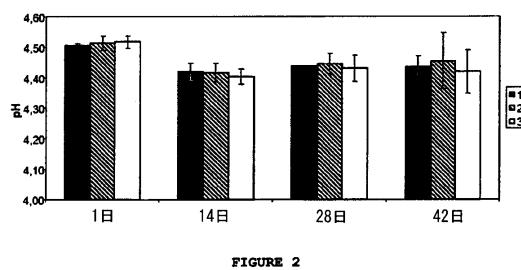
【図1】



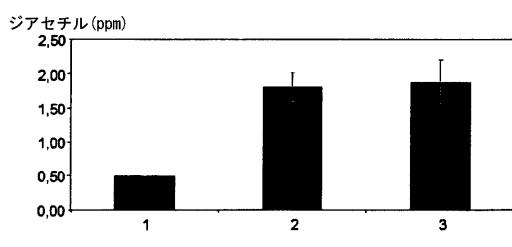
【図3】



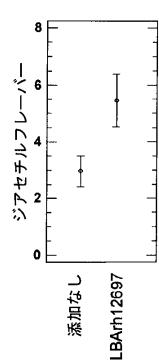
【図2】



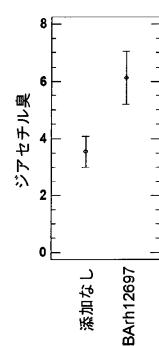
【図4】



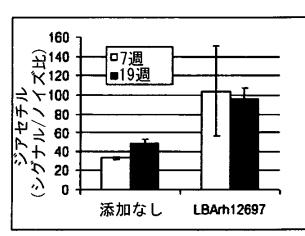
【図7】



【図8】



【図9】



【図5】

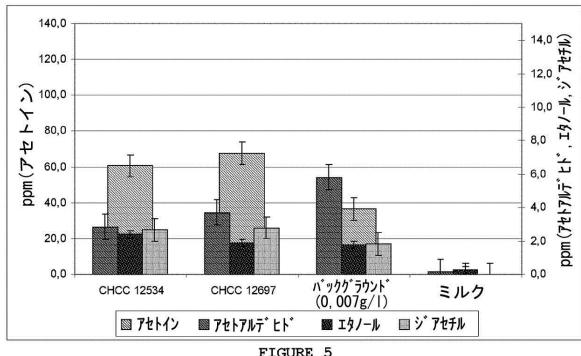


FIGURE 5

【図6】

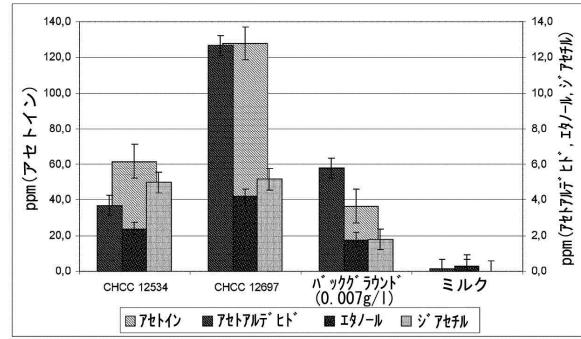


FIGURE 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 R 1:225

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100179039

弁理士 伊藤 洋介

(72)発明者 ルシアナ ジメネ

フランス国, エフ - 75013 パリ, リュ ドゥ トルビック 30

(72)発明者 グナール エレガールド

デンマーク国, デーコー - 3500 ベルレーセ, ハレスコフビュ, ガメル ハレスコフバイ 2
43

(72)発明者 ヨルゴス トリハース

デンマーク国, デーコー - 3310 エルステッド, エグホルムバイ 2

(72)発明者 ゲル ルティエール ブショルン

デンマーク国, デーコー - 2830 ピールム, グレンネバイ 84, 1. テホ

(72)発明者 ディッテ マリエ ブラント

デンマーク国, デーコー - 2500 バルビュー, ランドリーストバイ 22セ, エステ テホ

(72)発明者 ディッテ マリエ フォルケンベルウ

デンマーク国, デーコー - 3400 ヒレズ, ベド スコフガエルデット 33

(72)発明者 ピルギッテ ベデル ターゲ

デンマーク国, デーコー - 3230 グラステッド, エスベンデルップ, ギデバルケン 19

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 Journal agroalimentary processes and technologies , 2010年, Vol.16, p.188-195

CICHOSZ GRAINYNA , AROMA COMPOUNDS IN GOUDA CHEESE PRODUCED WITH ADDITION OF PROBIOTIC S

TRAINS , POLISH JOURNAL OF NATURAL SCIENCES , 2006年 1月 1日, V21 N2 , P987-997

DEGHEIDI M A , UTILIZATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN UF WHITE SOFT CHEESE , EGYPTIAN JOUR
NAL OF DAIRY SCIENCE , EG , EGYPTIAN SOCIETY OF DAIRY SCIENCE , 2009年 1月 1日 , V
37 N1 , P73-84

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0

J STPplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)