

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月1日(01.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/196844 A1

(51) 国際特許分類:

A23C 9/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/014078

(22) 国際出願日: 2020年3月27日(27.03.2020)

(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 2019-063902 2019年3月28日(28.03.2019) JP

(71) 出願人: 森永乳業株式会社(MORINAGA MILK
INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088384 東京
都港区芝五丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小澤 智仁 (OZAWA, Tomohito);
〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83
号 森永乳業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP
FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東
日本橋三丁目4番10号 アクロポリス
21ビル8階 Tokyo (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, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出され
た、寄託された生物材料に関する表示 (規則13
の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

(54) Title: HEAT-RESISTANT BACTERIUM COMPOSITION

(54) 発明の名称: 耐熱性細菌組成物

(57) Abstract: Provided is a technique for improving the heat resistance of a bacterium. The heat resistance of a bacterium can be improved by mixing the bacterium with an oil or fat and an emulsifying agent.

(57) 要約: 細菌の耐熱性を向上させる技術を提供する。細菌を油脂および乳化剤と混合することにより細菌の耐熱性を向上させる。



WO 2020/196844 A1

明 細 書

発明の名称：耐熱性細菌組成物

技術分野

[0001] 本発明は、耐熱性の向上した細菌を含有する組成物およびその製造法に関する。

背景技術

[0002] 細菌の耐熱性を向上させる技術としては、例えば、乳タンパク質（特許文献1）、凝固剤（特許文献2）、常温で非流動性である疎水性物質（特許文献3）、安定化剤および保護剤（特許文献4）、タンパク質系食用ゲル化剤（特許文献5）、タンパク質（非特許文献1）、低融点油脂（LMF）（非特許文献2）等の成分を利用して細菌を被覆またはカプセル化する技術が知られている。

[0003] また、グリセリン脂肪酸エステルを利用して細菌を被覆または造粒する技術が知られている（特許文献6～7）。しかしながら、特許文献6～7には、細菌の耐熱性については記載されていない。

[0004] また、細菌を油脂および乳化剤と混合することにより細菌の耐熱性が向上することは知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特許第3698455号
特許文献2：特開2004-344146
特許文献3：特許第3102990号
特許文献4：特許第5841527号
特許文献5：特開平10-191950
特許文献6：特開平2-200639
特許文献7：特許第2596418号

非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Journal of Food Science, 2017, 9, 2134-2141

非特許文献2 : Food Hydrocolloids, 2015, 51, 459-467

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、細菌の耐熱性を向上させる技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属細菌等の細菌を油脂および乳化剤と混合することにより細菌の耐熱性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下の通り例示できる。

本発明の一態様は、細菌を含有する組成物の製造方法であって、

下記工程 A および B :

(A) 細菌を油脂と混合する工程 ;

(B) 細菌を乳化剤と混合する工程

を含み、

前記工程 A が、前記油脂の融点以上の温度で実施される、方法である。

前記方法は、前記工程 A が、前記工程 B の開始前または開始後に開始されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記工程 A および B が、同時に開始されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記油脂が、融点が 50℃ 以下の油脂であることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記油脂が、融点が 35℃ 以上の油脂であることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記油脂が、パーム核極度硬化油であることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記工程 A が、50℃ 以下の温度で実施されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記工程 A が、40℃以上の温度で実施されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記乳化剤が、レシチンまたはポリグリセリン脂肪酸エステルであることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記工程 B が、50℃以下の温度で実施されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記工程 B が、40℃以上の温度で実施されることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記油脂の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量50g当たり、1.5～4.5gであることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステルであり、前記乳化剤の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量50g当たり、8～17gであることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記乳化剤が、レシチンであり、前記乳化剤の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量50g当たり、1～20gであることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記細菌が、ビフィドバクテリウム属細菌であることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記細菌が、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) またはビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) であることを好ましい態様としている。

前記方法は、前記細菌が、ビフィドバクテリウム・ロングムBB536 (NITE BP-02621) またはビフィドバクテリウム・ブレーベM-16V (NITE BP-02622) であることを好ましい態様としている。

本発明の一態様は、細菌の耐熱性を向上させる方法であって、

下記工程 A および B :

(A) 細菌を油脂と混合する工程 ;

(B) 細菌を乳化剤と混合する工程

を含み、

前記工程 A が、前記油脂の融点以上の温度で実施される、方法である。

本発明の一態様は、細菌、油脂、および乳化剤を含有する、組成物である。

前記組成物は、前記細菌が、前記油脂および前記乳化剤でコーティングされていることを好ましい態様としている。

本発明の一態様は、前記方法で製造された組成物または前記組成物を含有する粉乳である。

前記粉乳は、育児用調製粉乳であることを好ましい態様としている。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、本発明に関する下記の説明は、特記しない限り、いずれも単独で採用してもよく、適宜組み合わせて採用してもよい。

[0011] < 1 > 本発明の方法

本発明の方法は、下記工程 A および B を含む方法である：

(A) 細菌を油脂と混合する工程；

(B) 細菌を乳化剤と混合する工程。

[0012] 本発明の方法によれば、細菌の耐熱性を向上させることができる。言い換えると、本発明の方法によれば、細菌の耐熱性を向上させる効果が得られる。同効果を「耐熱性向上効果」ともいう。すなわち、本発明の方法は、例えば、細菌の耐熱性を向上させる方法であってよい。

[0013] また、本発明の方法によれば、細菌を含有する組成物が得られてよい。細菌を含有する組成物を「細菌組成物」ともいう。すなわち、本発明の方法は、例えば、細菌組成物の製造方法であってよい。細菌組成物に含有される細菌は、耐熱性の向上した細菌であってよい。すなわち、細菌組成物は、耐熱性の向上した細菌を含有する組成物であってよい。耐熱性の向上した細菌を含有する組成物を「耐熱性細菌組成物」ともいう。また、細菌組成物の一態様は、後述する本発明の組成物であってよい。

- [0014] 「耐熱性の向上」とは、工程 A および B の実施後の細菌の耐熱性が工程 A および B の実施前の細菌の耐熱性よりも高いことを意味する。耐熱性の向上としては、細菌を加熱した際の生残率 (survival rate) の向上が挙げられる。加熱の温度としては、70℃が挙げられる。加熱の時間としては、1分が挙げられる。すなわち、加熱として、具体的には、70℃で1分間の加熱が挙げられる。細菌を70℃で1分間加熱した際の生残率は、例えば、細菌を70℃の湯に分散してから1分後の生残率として測定できる。細菌を70℃で1分間加熱した際の生残率は、具体的には、例えば、実施例に記載の条件で測定できる。細菌を加熱した際の生残率は、加熱前（具体的には、加熱開始時）の生菌数に対する加熱後の生菌数の比率として算出される。生菌数は、例えば、コロニー形成単位 (colony forming unit ; c f u) として測定することができる。なお、「細菌の加熱」とは、細菌組成物に含有される細菌にあっては、細菌組成物の加熱を意味してよい。
- [0015] 工程 A および B の実施後の細菌を70℃で1分間加熱した際の生残率（具体的には、本発明の方法により得られた細菌組成物を70℃で1分間加熱した際の細菌の生残率）は、例えば、工程 A および B の実施前の細菌を70℃で1分間加熱した際の生残率の、10倍以上、100倍以上、1000倍以上、10000倍以上、または100000倍以上であってよい。
- [0016] 工程 A および B の実施後の細菌を70℃で1分間加熱した際の生残率（具体的には、本発明の方法により得られた細菌組成物を70℃で1分間加熱した際の細菌の生残率）は、例えば、1%以上、3%以上、5%以上、または10%以上であってよい。
- [0017] 細菌、油脂、および乳化剤を総称して「有効成分」ともいう。本発明の方法においては、有効成分のみを用いてもよく、そうでなくてもよい。すなわち、本発明の方法においては、有効成分に加えて、他の成分を用いてもよい。本発明の方法に用いられる成分（すなわち、有効成分および任意で他の成分）を総称して「原料」ともいう。
- [0018] 具体的には、工程 A においては、細菌および油脂に加えて、他の成分を用

いてもよい。「原料」とは、工程Aにおいては、細菌および油脂、ならびに任意で他の成分を総称してもよい。また、具体的には、工程Bにおいては、細菌および乳化剤に加えて、他の成分を用いてもよい。「原料」とは、工程Bにおいては、細菌および乳化剤、ならびに任意で他の成分を総称してもよい。

[0019] <細菌>

細菌は特に制限されない。細菌としては、1種の細菌を用いてもよく、2種またはそれ以上の細菌を組み合わせ用いてもよい。細菌としては、プロバイオティクスとして用いられ得る細菌が挙げられる。細菌として、具体的には、乳酸菌が挙げられる。乳酸菌としては、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属細菌、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属細菌、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属細菌、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属細菌が挙げられる。

[0020] ビフィドバクテリウム属細菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アンギュラツム (*Bifidobacterium angulatum*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) が挙げられる。ビフィドバクテリウム属細菌としては、特に、ビフィドバクテリウム・ロンガムやビフィドバクテリウム・ブレーベが挙げられる。ビフィドバクテリウム属細菌として、さらに特には、ビフィドバクテリウム・ロンガムが挙げられる。

[0021] ビフィドバクテリウム・ロンガムには、ビフィドバクテリウム・ロンガム

・サブスピーシーズ・ロングム (*B. longum* subsp. *longum*)、ビフィドバクテリウム・ロングム・サブスピーシーズ・インファンティス (*B. longum* subsp. *infantis*)、ビフィドバクテリウム・ロングム・サブスピーシーズ・スイス (*B. longum* subsp. *suis*) 等の、ビフィドバクテリウム・ロングムのいずれの亜種に分類される株も包含される。ビフィドバクテリウム・アニマリスには、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシーズ・ラクティス (*B. animalis* subsp. *lactis*) 等の、ビフィドバクテリウム・アニマリスのいずれの亜種に分類される株も包含される。ビフィドバクテリウム・シュードロンガムには、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム・サブスピーシーズ・グロボッサム (*B. pseudolongum* subsp. *globosum*) やビフィドバクテリウム・シュードロンガム・サブスピーシーズ・シュードロンガム (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*) 等の、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムのいずれの亜種に分類される株も包含される。

[0022] ビフィドバクテリウム・ロングムとして、具体的には、BB536 (NITE BP-02621)、ATCC 15697、ATCC 15707、ATCC 25962、ATCC 15702、ATCC 27533、M-63 (NITE BP-02623)、BG7、DSM 24736、SBT 2928、NCC 490 (CNCM I-2170)、NCC 2705 (CNCM I-2618) が挙げられる。ビフィドバクテリウム・ロングムとしては、特に、BB536が挙げられる。ビフィドバクテリウム・ロングムとしては、1種の株を用いてもよく、2種またはそれ以上の株を用いてもよい。

[0023] ビフィドバクテリウム・ブレーベとして、具体的には、M-16V (NITE BP-02622)、MCC1274 (FERM BP-11175)、ATCC 15700、B632 (DSM 24706)、Bb99 (DSM 13692)、ATCC 15698、DSM 24732、UCC2003、YIT4010、YIT4064、BBG-001、BR-03、C50、R0070が挙げられる。ビフィドバクテリウム・ブレーベとしては、特に、M-16Vが挙げられる。ビフィドバクテリウム・ブレーベとしては、1種の株を用いてもよく、2種またはそれ以上の株を用いてもよい。

[0024] ビフィドバクテリウム・ロングムBB536は、2018年1月26日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に、NITE BP-02621の受託番号で、

ブダペスト条約に基づく国際寄託がなされている。

[0025] ビフィドバクテリウム・ブレーベM-16Vは、2018年1月26日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に、NITE BP-02622の受託番号で、ブダペスト条約に基づく国際寄託がなされている。

[0026] ビフィドバクテリウム・ビフィダムとして、具体的には、ATCC 29521、OLB 6378、BF-1が挙げられる。ビフィドバクテリウム・アドレセンティスとして、具体的には、ATCC 15703が挙げられる。ビフィドバクテリウム・デンティウムとして、具体的には、DSM 20436が挙げられる。ビフィドバクテリウム・アニマリスとして、具体的には、DSM 10140、Bb-12、DN-173 010、GCL2505、CNCM I-3446が挙げられる。ビフィドバクテリウム・シュードロンガムとして、具体的には、JCM 5820やATCC 25526が挙げられる。ビフィドバクテリウム・サーモフィラムとして、具体的には、ATCC 25525が挙げられる。

[0027] ラクトバチルス属細菌としては、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・デルブレッキイ (*Lactobacillus delbrueckii*) が挙げられる。ラクトバチルス・デルブレッキイには、ラクトバチルス・デルブレッキイ・サブスピーシーズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブレッキイ・サブスピーシーズ・デルブレッキイ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)、ラクトバチルス・デルブレッキイ・サブスピーシーズ・ラクティス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) 等の、ラクトバチルス・デルブレッキイのいずれの亜種に分類される株も包含される。

[0028] ラクトコッカス属細菌としては、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) が挙げられる。ラクトコッカス・ラクティスには、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス (*Lactococcus lactis* subs

p. lactis)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホルドニエ (Lactococcus lactis subsp. hordniae) 等の、ラクトコッカス・ラクティスのいずれの亜種に分類される株も包含される。

[0029] ストレプトコッカス属細菌としては、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) が挙げられる。

[0030] これらの菌株は、例えば、American Type Culture Collection (ATCC, Address: 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110, United States of America)、Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM, Address: Rue de la Science 8, 1000 Brussels, Belgium)、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Address: Inhoffenstr. 7B, D38124 Braunschweig, Germany)、Japan Collection of Microorganisms (JCM, 郵便番号：305-0074、住所：日本国茨城県つくば市高野台3-1-1 理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室)、または各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。

[0031] なお、上記例示した菌株名で特定される菌株には、当該菌株名で所定の機関に寄託や登録がなされている株そのもの（以下、説明の便宜上、「寄託株」ともいう）に限られず、それと実質的に同等な株（「派生株」または「誘導株」ともいう）も包含される。すなわち、例えば、「ビフィドバクテリウム・ロンガムBB536」には、BB536の寄託番号で上記寄託機関に寄託されている株そのものに限られず、それと実質的に同等な株も包含される。各菌株について、「上記寄託株と実質的に同等の株」とは、上記寄託株と同一の種に属し、さらにその16S rRNA遺伝子の塩基配列が、上記寄託株の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対して、好ましくは99.86%以上、より好ましくは99.93%以上、さらに好ましくは100%の同一性を有し、且つ、好ましくは上記寄託株と同一の菌学的性質を有する株をいう。各菌株について、上記寄託株と実質的に同等の株は、例えば、当該寄託株を親株とす

る派生株であってよい。派生株としては、寄託株から育種された株や寄託株から自然に生じた株が挙げられる。育種方法としては、遺伝子工学的手法による改変や、突然変異処理による改変が挙げられる。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、エチルメタンスルフォネート(EMS)、およびメチルメタンスルフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。寄託株から自然に生じた株としては、寄託株の使用の際に自然に生じた株が挙げられる。そのような株としては、寄託株の培養(例えば継代培養)により自然に生じた変異株が挙げられる。派生株は、1種の改変により構築されてもよく、2種またはそれ以上の改変により構築されてもよい。

[0032] 細菌としては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものを用いてもよい。例えば、ビフィドバクテリウム属細菌の市販品としては、森永乳業社製のビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・ロンガムBB536やビフィドバクテリウム・ブレーベM-16Vが挙げられる。また、細菌の菌体は、細菌を培養することにより容易に取得することができる。培養方法は、細菌が増殖できる限り、特に制限されない。培養方法としては、例えば、ビフィドバクテリウム属細菌等の細菌の培養に通常用いられる方法を、そのまま、あるいは適宜修正して、用いることができる。培養温度は、例えば、25～50℃であってよく、35～42℃であることが好ましい。培養は、好ましくは嫌気条件下で実施することができ、例えば、炭酸ガス等の嫌気ガスを通気しながら実施することができる。また、培養は、液体静置培養等の微好気条件下で実施することもできる。培養は、例えば、細菌が所望の程度に増殖するまで実施することができる。

[0033] 培養に用いる培地は、細菌が増殖できる限り、特に制限されない。培地としては、例えば、ビフィドバクテリウム属細菌等の細菌の培養に通常用いられる培地を、そのまま、あるいは適宜修正して、用いることができる。培地は、例えば、炭素源、窒素源、無機塩、有機成分、乳成分、またはそれらの組み合わせを含有してよい。炭素源としては、例えば、ガラクトース、グル

コース、フルクトース、マンノース、セロビオース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デンプン、デンプン加水分解物、廃糖蜜等の糖類を資化性に応じて用いることができる。窒素源としては、例えば、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等のアンモニウム塩類や硝酸塩類を用いることができる。また、無機塩としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、塩化マンガン、硫酸第一鉄等を用いることができる。また、有機成分としては、例えば、ペプトン、大豆粉、脱脂大豆粕、肉エキス、酵母エキス等を用いることができる。乳成分としては、例えば、乳タンパク質等を用いることができる。乳タンパク質としては、カゼイン、ホエイ、それらの分解物が挙げられる。また、ビフィドバクテリウム属細菌等の細菌の培養に通常用いられる培地として、具体的には、強化クロストリジヤ培地 (Reinforced Clostridial medium)、MRS培地 (de Man, Rogosa, and Sharpe medium)、mMRS培地 (modified MRS medium)、TOSP培地 (TOS propionate medium)、TOSP Mup培地 (TOS propionate mupirocin medium) が挙げられる。

[0034] 細菌としては、細菌の菌体またはそれを含有する画分を、特に制限されず用いることができる。すなわち、細菌としては、例えば、培養により得られた培養物をそのまま用いてもよく、培養物を希釈又は濃縮して用いてもよく、培養物から回収した菌体を用いてもよい。また、耐熱性向上効果を損なわない限り、加熱、噴霧乾燥、凍結乾燥等の種々の追加操作を培養後に行うことができる。追加操作は、菌体の生残率が高いものであるのが好ましい。すなわち、細菌の菌体またはそれを含有する画分として、具体的には、細菌の培養物、同培養物から回収した菌体、それらの希釈物、濃縮物、乾燥物等の処理物が挙げられる。

[0035] なお、菌体は、生菌体を含有する形態で使用されるものとする。菌体は、例えば、生菌体からなるものであってもよく、生菌体と死菌体の混合物であってもよい。

[0036] 菌体の生残率の観点から、細菌としては、凍結乾燥菌末を用いることが好ましい。すなわち、細菌（具体的には細菌の菌体またはそれを含有する画分）としては、特に、凍結乾燥菌末が挙げられる。また、凍結乾燥前に細菌を保護剤等とともに分散媒に分散させることが好ましい。具体的には、培養液から菌体を集菌し、洗浄し、湿菌体を得た後、当該湿菌体を水に分散して菌体分散液を調製することができる。次いで、当該菌体分散液に好ましくは保護剤等を添加して均一に混合した後、常法により凍結乾燥して凍結乾燥菌末を得ることができる。保護剤としては、アスパラギン酸、アルギニン、グルタミン酸、プロリン、リジン、ロイシン、及びメチオニン等のアミノ酸、グリセリン、ショ糖、及びアスコルビン酸等の公知の保護剤を使用することができる。凍結乾燥菌末は、そのまま、あるいは他の食品素材と混合して用いることができる。凍結乾燥菌末は、そのまま使用することが好ましい。

[0037] <油脂>

油脂は、乳化剤との併用により耐熱性向上効果が得られるものであれば、特に制限されない。油脂としては、1種の油脂を用いてもよく、2種またはそれ以上の油脂を組み合わせ用いてもよい。油脂としては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものをを用いてもよい。

[0038] 油脂としては、動物由来の油脂（動物油脂）、植物由来の油脂（植物油脂）、それらの硬化油が挙げられる。動物油脂としては、鶏脂、豚脂、牛脂、羊油、鯨油、魚油、卵油、バターが挙げられる。魚油としては、マグロ油、カツオ油、イワシ油、サバ油、サケ油、タラ油が挙げられる。植物油脂としては、菜種油、米油、紅花油、ヒマワリ油、オリーブ油、落花生油、パーム油、パーム核油、やし油、大豆油、コーン油、綿実油、ごま油、ぶどう種子油、えごま油が挙げられる。硬化油としては、部分硬化油や極度硬化油が挙げられる。硬化油として、具体的には、上記例示した植物油脂の部分硬化油や、上記例示した植物油脂の極度硬化油が挙げられる。硬化油としては、特に、パーム核油の硬化油が挙げられる。硬化油として、さらに特には、パーム核油の極度硬化油（パーム核極度硬化油）が挙げられる。市販のパーム核

極度硬化油としては、K-40（太陽油脂社製）が挙げられる。

[0039] 油脂としては、融点が特定の範囲であるものが挙げられる。油脂としては、例えば、上記例示した油脂の内、融点が特定の範囲であるものを選択してもよい。なお、パーム核極度硬化油の融点は、40℃付近であり得る。油脂の融点は、例えば、20℃以上、25℃以上、30℃以上、35℃以上、40℃以上、45℃以上、または50℃以上であってもよく、55℃以下、50℃以下、45℃以下、40℃以下、35℃以下、30℃以下、または25℃以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。油脂の融点は、具体的には、例えば、20～55℃、25～50℃、30～50℃、35～50℃、または40～50℃であってもよい。油脂の融点は、具体的には、例えば、20～25℃、25～30℃、30～35℃、35～40℃、40～45℃、45～50℃、または50～55℃であってもよい。油脂の融点は、特に、35℃以上であってもよく、50℃以下であってもよく、35～50℃であってもよい。

[0040] <乳化剤>

乳化剤は、油脂との併用により耐熱性向上効果が得られるものであれば、特に制限されない。乳化剤としては、1種の乳化剤を用いてもよく、2種またはそれ以上の乳化剤を組み合わせ用いてもよい。乳化剤としては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものをを用いてもよい。

[0041] 乳化剤としては、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、レシチン、サポニンが挙げられる。グリセリン脂肪酸エステルとしては、モノグリセリン脂肪酸エステルやポリグリセリン脂肪酸エステルが挙げられる。グリセリン脂肪酸エステルとしては、特に、ポリグリセリン脂肪酸エステルが挙げられる。乳化剤としては、特に、ポリグリセリン脂肪酸エステルやレシチンが挙げられる。乳化剤として、さらに特には、レシチンが挙げられる。

[0042] 「ポリグリセリン脂肪酸エステル」とは、ポリグリセリンの水酸基に脂肪酸がエステル結合した構造を有する化合物の総称である。ポリグリセリン脂

脂肪酸エステルの分子構造（例えば、ポリグリセリンの重合度、ポリグリセリンの重合形態（直鎖状か、環状か、分岐状か）、構成脂肪酸の種類、エステル化率、エステル化位置、等）は、油脂との併用により耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。構成脂肪酸としては、炭素数8～24の脂肪酸が挙げられる。構成脂肪酸は、飽和脂肪酸であってもよく、不飽和脂肪酸であってもよい。炭素数8～24の脂肪酸として、具体的には、カプリル酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ベヘン酸、エルカ酸が挙げられる。構成脂肪酸としては、1種の脂肪酸を用いてもよく、2種またはそれ以上の脂肪酸を組み合わせ用いてもよい。例えば、1分子のポリグリセリンに2種またはそれ以上の脂肪酸がエステル結合していてもよい。

[0043] ポリグリセリンの重合度（平均重合度）は、例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、または8以上であってもよく、20以下、15以下、12以下、10以下、8以下、または5以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。ポリグリセリンの重合度（平均重合度）は、具体的には、例えば、2～20、3～15、3～12、または3～5であることが好ましい。ポリグリセリンの重合度（平均重合度）は、ポリグリセリンの水酸基価に基づいて算出されるものとする。ポリグリセリンの水酸基価は、日本工業規格JIS K 0070:1992に準拠して測定されるものとする。

[0044] ポリグリセリンのHLB（hydrophile-lipophile balance）値は、例えば、1以上、2以上、3以上、または4以上であってもよく、20以下、15以下、10以下、8以下、または5以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。ポリグリセリンのHLB値は、具体的には、例えば、1～15、1～10、2～8、または2～5であることが好ましい。HLB値は、アトラス法によって算出されるものとする。

[0045] ポリグリセリン脂肪酸エステルの分子構造（例えば、構成脂肪酸の種類、等）についての記載は、他の脂肪酸エステルにも準用できる。

- [0046] 市販のポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、ポエムRJ-38（理研ビタミン社製）が挙げられる。ポエムRJ-38は、C 1 8（65%）およびC 1 6（34%）の構成脂肪酸を有するポリグリセリン脂肪酸エステルである。
- [0047] 「レシチン」とは、リン脂質を含有する素材の総称である。レシチンは、リン脂質を主成分として含有してよい。レシチンとしては、植物レシチン、卵黄レシチン、それらの派生物が挙げられる。植物レシチンとしては、大豆レシチン、アブラナレシチン、ヒマワリレシチンが挙げられる。派生物としては、分別レシチン、酵素処理レシチン、酵素分解レシチンが挙げられる。レシチンとしては、特に、大豆レシチンが挙げられる。
- [0048] レシチンのHLB値は、例えば、1以上、2以上、3以上、または4以上であってもよく、20以下、15以下、10以下、8以下、または5以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。レシチンのHLB値は、具体的には、例えば、1～15、1～10、2～8、または2～5であることが好ましい。
- [0049] 市販のレシチンとしては、Yelkin TS（HLB値＝約4、エー・ディー・エム・ジャパン社製）が挙げられる。Yelkin TSは、液体状の大豆レシチンである。
- [0050] 「サポニン」とは、サポゲニン配糖体の総称である。サポニンとしては、各種植物のサポニンが挙げられる。サポニンとして、具体的には、大豆サポニン、茶種子サポニン、エンジュサポニンが挙げられる。
- [0051] <他の成分>
- 他の成分は、耐熱性向上効果を損なわない限り、特に制限されない。他の成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせて用いてもよい。
- [0052] 他の成分としては、細菌組成物の利用態様に応じて許容可能なものを利用できる。他の成分としては、経口摂取可能な成分が挙げられる。経口摂取可能な成分としては、飲食品または医薬品に配合して利用される成分が挙げられる。

[0053] <工程 A および B>

工程 A は、細菌を油脂と混合する工程である。工程 B は、細菌を乳化剤と混合する工程である。細菌は、工程 A および B の両方（すなわち、油脂との混合と乳化剤との混合の両方）に供される。

[0054] 工程 A および B は、同時に実施されてもよく、個別に実施されてもよい。工程 A および B は、特に、個別に実施されてよい。工程 A および B を実施する順序は特に制限されない。すなわち、工程 A の実施後に工程 B を実施してもよく、工程 B の実施後に工程 A を実施してもよい。特に、工程 A の実施後に工程 B を実施してよい。「工程 A および B が同時に実施される」とは、工程 A および B のいずれか一方の完了前に、工程 A および B のもう一方を開始することを意味する。「工程 A および B が同時に実施される」ことには、工程 A および B を同時に開始する場合や、工程 A および B のいずれか一方の実施中に工程 A および B のもう一方を開始する場合が包含される。すなわち、「工程 A および B が同時に実施される」とは、工程 A および B が一部または全部の期間において同時に実施されることを意味してもよい。工程 A および B が同時に実施される場合、工程 A および B は、同時に完了してもよく、個別に完了してもよい。「工程 A および B が個別に実施される」とは、工程 A および B のいずれか一方の完了後に、工程 A および B のもう一方を開始することを意味する。「工程の実施中」とは、当該工程の開始から完了までの期間を意味する。「工程の完了」とは、当該工程が十分に実施された状態を意味し、具体的には、当該工程が所定の時間実施された状態を意味してよい。各工程が実施される「所定の時間」としては、後述する各工程の実施時間が挙げられる。

[0055] 言い換えると、工程 A および B は、同時に開始してもよく、個別に開始してもよい。工程 A および B は、特に、個別に開始してよい。すなわち、工程 A および B のいずれか一方の開始後に、工程 A および B のもう一方を開始してよい。具体的には、工程 A および B のいずれか一方の実施中または完了後に、工程 A および B のもう一方を開始してよい。工程 A および B を開始する

順序は特に制限されない。すなわち、工程 A の開始後に工程 B を開始してもよく、工程 B の開始後に工程 A を開始してもよい。特に、工程 A の開始後に工程 B を開始してよい。さらに特に、工程 A の完了後に工程 B を開始してもよい。

[0056] 工程 A の実施により、例えば、細菌が油脂でコーティングされてよい。工程 B の実施により、例えば、細菌が乳化剤でコーティングされてよい。工程 A および B の実施により、例えば、細菌が油脂および乳化剤でコーティングされてよい。工程 A および B の実施により、具体的には、例えば、細菌が油脂および乳化剤の混合物でコーティングされてよい。また、工程 A および B の実施により、具体的には、例えば、細菌が油脂でコーティングされ、さらに、乳化剤でコーティングされてもよい。特に、工程 B が工程 A の後に開始される場合に、細菌が油脂でコーティングされ、さらに、乳化剤でコーティングされてよい。また、工程 A および B の実施により、具体的には、例えば、細菌が乳化剤でコーティングされ、さらに、油脂でコーティングされてもよい。特に、工程 A が工程 B の後に開始される場合に、細菌が乳化剤でコーティングされ、さらに、油脂でコーティングされてよい。すなわち、「細菌が油脂および乳化剤でコーティングされる」とは、特記しない限り、油脂および乳化剤の混合状態ならびに油脂および乳化剤によるコーティングの順序によらず、細菌が油脂および乳化剤でコーティングされることを意味してよい。

[0057] 「細菌が油脂でコーティングされる」とは、細菌が油脂単独でコーティングされる場合に限られず、細菌が油脂と他の成分との混合物でコーティングされる場合も包含する。例えば、工程 A を実施する際に、細菌と油脂に加えて、他の成分が共存している場合、細菌が油脂と他の成分との混合物でコーティングされてよい。

[0058] 「細菌が乳化剤でコーティングされる」とは、細菌が乳化剤単独でコーティングされる場合に限られず、細菌が乳化剤と他の成分との混合物でコーティングされる場合も包含する。例えば、工程 B を実施する際に、細菌と乳化

剤に加えて、他の成分が共存している場合、細菌が乳化剤と他の成分との混合物でコーティングされてよい。

[0059] なお、工程 B が工程 A の後に開始される場合にあっては、工程 B に供される「細菌」とは、工程 A の開始後の細菌と読み替えてよい。工程 A の開始後の細菌は、例えば、細菌と油脂の混合物であってよい。工程 A の開始後の細菌は、具体的には、例えば、油脂でコーティングされた細菌であってもよい。また、工程 A が工程 B の後に開始される場合にあっては、工程 A に供される「細菌」とは、工程 B の開始後の細菌と読み替えてよい。工程 B の開始後の細菌は、例えば、細菌と乳化剤の混合物であってよい。工程 B の開始後の細菌は、具体的には、例えば、乳化剤でコーティングされた細菌であってもよい。

[0060] 工程 A において、原料（細菌および油脂、ならびに任意で他の成分）は、いずれも、液体、ペースト、粉末等の任意の形状で用いられてよい。例えば、油脂は、特に、液体の形状で工程 A に用いられてよい。液体状の油脂は、本来的に液体状のものであってもよく、液体状になるように処理（例えば加熱）したものであってもよい。すなわち、油脂は、例えば、予め融点以上の温度に加熱してから工程 A に用いてもよい。工程 A の実施の際には、例えば、細菌に油脂を添加してもよく、油脂に細菌を添加してもよい。添加手段は、原料の形状等の諸条件に応じて適宜設定できる。例えば、添加する成分が液状である場合、同成分を滴下または噴霧してよい。具体的には、例えば、油脂が液状である場合、油脂を細菌に滴下または噴霧してよい。他の成分が用いられる場合、他の成分は、例えば、予め細菌および／または油脂と混合されていてもよく、そうでなくてもよい。

[0061] 工程 B において、原料（細菌および乳化剤、ならびに任意で他の成分）は、いずれも、液体、ペースト、粉末等の任意の形状で用いられてよい。例えば、乳化剤は、特に、液体の形状で工程 B に用いられてよい。液体状の乳化剤は、本来的に液体状のものであってもよく、液体状になるように処理（例えば加熱）したものであってもよい。すなわち、乳化剤は、例えば、予め融

点以上の温度に加熱してから工程Bに用いてもよい。工程Bの実施の際には、例えば、細菌に乳化剤を添加してもよく、乳化剤に細菌を添加してもよい。添加手段は、原料の形状等の諸条件に応じて適宜設定できる。例えば、添加する成分が液状である場合、同成分を滴下または噴霧してよい。具体的には、例えば、乳化剤が液状である場合、乳化剤を細菌に滴下または噴霧してよい。他の成分が用いられる場合、他の成分は、例えば、予め細菌および／または乳化剤と混合されていてもよく、そうでなくてもよい。

[0062] 工程AおよびBが同時に実施される場合、油脂および乳化剤は、例えば、個別に用いてもよく、混合物として用いてもよい。

[0063] 原料を混合する手段は、特に制限されない。原料を混合する手段としては、攪拌混合や反転混合が挙げられる。原料を混合する手段としては、特に、攪拌混合が挙げられる。原料の混合は、例えば、適当な容器内で実施することができる。原料の混合が実施される容器を「混合容器」ともいう。工程AおよびBは、同一の混合容器内で実施されてもよく、そうでなくてもよい。工程AおよびBは、いずれも、例えば、バッチ式で実施されてもよく、連続式で実施されてもよい。原料の混合は、例えば、混合装置を用いて実施することができる。混合装置は、例えば、混合容器を備えていてよい。また、混合装置は、例えば、攪拌羽根を備えていてよい。攪拌羽根は、アジテーターまたはチョッパー等と呼ばれる場合もある。また、混合装置は、例えば、温度制御機能を備えていてよい。混合装置としては、攪拌造粒装置が挙げられる。混合装置として、具体的には、高速攪拌型混合造粒機（NMGシリーズ等；奈良機械製作所製）、ニュースピードニーダー（NSKシリーズ等；岡田精工製）、バランスグラン（BGシリーズ等；フロイント・ターボ製）、フレキシミックス（FXD-250等；ホソカワミクロン製）、バーチカル・グラニュレーター（パウレック製）が挙げられる。

[0064] 本発明の方法に用いられる原料の量比は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。本発明の方法に用いられる原料の量比は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途等の諸条件に応じ

て適宜設定できる。

[0065] 油脂の使用量は、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、例えば、1.2g以上、1.5g以上、2g以上、2.5g以上、3g以上、または3.5g以上であってもよく、4.8g以下、4.5g以下、4g以下、3.5g以下、3g以下、または2.5g以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。油脂の使用量は、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、具体的には、例えば、1.2～4.8g、好ましくは1.5～4.5g、より好ましくは2～4gであってもよい。また、油脂の使用量は、細菌の生菌数を基準に設定してもよい。その場合、上記「細菌の乾燥菌体重量50g当たり」とは、例えば、「細菌の生菌 4×10^{12} cfu当たり」と読み替えてもよい。

[0066] 乳化剤の使用量は、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、例えば、1g以上、1.5g以上、2g以上、3g以上、4g以上、5g以上、6g以上、7g以上、8g以上、9g以上、または10g以上であってもよく、20g以下、17g以下、15g以下、14g以下、13g以下、12g以下、11g以下、10g以下、9g以下、8g以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。乳化剤の使用量は、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、具体的には、例えば、1～20g、1.5～17g、または2～15gであってもよく、8～17g、9～16g、または10～15gであってもよい。乳化剤の使用量は、特に、乳化剤がレシチンである場合に、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、1～20g、好ましくは1.5～17g、より好ましくは2～15gであってもよい。乳化剤の使用量は、特に、乳化剤がポリグリセリン脂肪酸エステルである場合に、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、8～17g、好ましくは9～16g、より好ましくは10～15gであってもよい。また、乳化剤の使用量は、特に、乳化剤がレシチンである場合に、細菌の乾燥菌体重量50g当たり、リン脂質の重量に換算して、上記例示した使用量の1/2量であってもよい。また、乳化剤の使用量は、細菌の生菌数を基準に設定してもよい。その場合、上記「細菌の乾

乾燥菌体重量50g当たり」とは、例えば、「細菌の生菌 4×10^{12} cfu当たり」と読み替えてもよい。

[0067] 有効成分の総使用量は、原料の総使用量に対する重量比として、例えば、1%以上、3%以上、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、または99%以上であってもよく、100%以下、99%以下、97%以下、95%以下、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または50%以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。有効成分の総使用量は、原料の総使用量に対する重量比として、具体的には、例えば、1~100%、10~100%、30~100%、50~100%、70~100%、90~100%、95~100%、または99~100%であってもよい。

[0068] 工程Aの実施時間は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Aの実施時間は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程Aの実施時間は、例えば、30秒以上、45秒以上、1分以上、1.5分以上、2分以上、2.5分以上、3分以上、3.5分以上、または4分以上であってもよく、15分以下、10分以下、7分以下、5分以下、4.5分以下、4分以下、3.5分以下、3分以下、または2.5分以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Aの実施時間は、具体的には、例えば、30秒~15分、好ましくは45秒~10分、より好ましくは1分~7分であってもよい。

[0069] 工程Bの実施時間は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Bの実施時間は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程Bの実施時間は、例えば、30秒以上、1分以上、2分以上、3分以上、5分以上、7分以上、10分以上、15分以上、20分以上、25分以上、または30分以上であってもよく、180分以下、150分以下、120分以下、100分以下

下、90分以下、80分以下、70分以下、60分以下、50分以下、45分以下、40分以下、35分以下、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、または10分以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Bの実施時間は、具体的には、例えば、30秒～30分、1分～20分、または2分～15分であってもよく、30秒～180分、1分～120分、または2分～90分であってもよい。工程Bの実施時間は、特に、乳化剤がポリグリセリン脂肪酸エステルである場合に、30秒～40分、好ましくは1分～30分、より好ましくは2分～20分であってもよい。工程Bの実施時間は、特に、乳化剤がレシチンである場合に、30秒～180分、好ましくは1分～120分、より好ましくは2分～90分であってもよい。

[0070] 工程Bが工程Aの後に開始される場合、例えば、工程Aを開始した後、上記例示したような工程Aの実施時間の経過前に工程Bを開始してもよく、上記例示したような工程Aの実施時間の経過後に工程Bを開始してもよい。例えば、工程Aの開始から工程Bの開始までの時間を、上記例示したような工程Aの実施時間に設定してもよい。

[0071] 工程Aが工程Bの後に開始される場合、例えば、工程Bを開始した後、上記例示したような工程Bの実施時間の経過前に工程Aを開始してもよく、上記例示したような工程Bの実施時間の経過後に工程Aを開始してもよい。例えば、工程Bの開始から工程Aの開始までの時間を、上記例示したような工程Bの実施時間に設定してもよい。

[0072] 工程AおよびBの総実施時間は、例えば、両工程について上記例示したような実施時間が確保できるように設定してよい。「工程AおよびBの総実施時間」とは、工程AおよびBのいずれか早く開始する方の開始から工程AおよびBのいずれか遅く完了する方の完了までの時間をいう。なお、「工程AおよびBのいずれか早く開始する方の開始」とは、両工程が同時に開始する場合にあっては、両工程の開始をいう。また、「工程AおよびBのいずれか遅く完了する方の完了」とは、両工程が同時に完了する場合にあっては、両

工程の完了をいう。工程 A および B が同時に開始される場合、工程 A および B の総実施時間は、例えば、上記例示したような工程 A の実施時間および上記例示したような工程 B の実施時間のいずれか長い方に設定してよい。

[0073] 工程 A および B の実施条件（例えば、温度や混合速度）は同一であってもよく、なくてもよい。少なくとも、工程 A および B が同時に実施されている期間において、工程 A および B の実施条件は同一である。

[0074] 工程 A の実施条件（例えば、温度や混合速度）は、工程 A が実施される全期間において一定であってもよく、そうでなくてもよい。

[0075] 工程 B の実施条件（例えば、温度や混合速度）は、工程 B が実施される全期間において一定であってもよく、そうでなくてもよい。

[0076] 工程 A は、油脂の融点以上の温度で実施される。すなわち、工程 A の温度（すなわち、工程 A が実施される温度）は、油脂の融点以上の温度である。工程 A の温度は、油脂の融点以上であり、且つ、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程 A の温度は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程 A の温度は、例えば、油脂の融点より 1℃ 以上、2℃ 以上、3℃ 以上、4℃ 以上、または 5℃ 以上高くてもよい。工程 A の温度は、例えば、20℃ 以上、25℃ 以上、30℃ 以上、35℃ 以上、40℃ 以上、45℃ 以上、または 50℃ 以上であってもよく、55℃ 以下、50℃ 以下、45℃ 以下、40℃ 以下、35℃ 以下、30℃ 以下、または 25℃ 以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程 A の温度は、具体的には、例えば、20～55℃、25～50℃、30～50℃、35～50℃、または 40～50℃ であってもよい。工程 A の温度は、具体的には、例えば、20～25℃、25～30℃、30～35℃、35～40℃、40～45℃、45～50℃、または 50～55℃ であってもよい。工程 A の温度は、特に、40℃ 以上であってもよく、50℃ 以下であってもよく、40～50℃ であってもよい。温度は、通常は工程 A の全期間において上記例示したような温度の範囲内であってもよいが、一時的にその範囲外となってもよい。

。すなわち、「工程Aの温度が或る範囲である」とは、工程Aの全期間において温度が当該範囲内である場合に限らず、温度が一時的に当該範囲外となる場合も包含する。例えば、工程Aにおいて、温度は、一時的に油脂の融点未満に低下してもよい。工程Aについての「一時的」の長さは、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Aについての「一時的」とは、例えば、工程Aの全期間の内の、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下の期間を意味してよい。なお、工程Aの温度は、工程Aを実施した際に所望の程度に細菌が生存するように設定されるものとする。工程Aを実施した際の細菌の生残率は、例えば、50%以上、70%以上、90%以上、または95%以上であってよい。工程Aを実施した際の細菌の生残率は、工程Aの実施前（具体的には、工程Aの開始時）の生菌数に対する工程Aの実施後（具体的には、工程Aの完了時）の生菌数の比率として算出される。

[0077] 工程Bの温度（すなわち、工程Bが実施される温度）は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Bの温度は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程Bは、例えば、乳化剤の融点以上の温度で実施されてよい。すなわち、工程Bの温度は、例えば、乳化剤の融点以上の温度であってよい。工程Bの温度は、例えば、乳化剤の融点より1℃以上、2℃以上、3℃以上、4℃以上、または5℃以上高くてもよい。工程Bの温度は、例えば、20℃以上、25℃以上、30℃以上、35℃以上、40℃以上、45℃以上、または50℃以上であってもよく、55℃以下、50℃以下、45℃以下、40℃以下、35℃以下、30℃以下、または25℃以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Bの温度は、具体的には、例えば、20～55℃、25～50℃、30～50℃、35～50℃、または40～50℃であってもよい。工程Bの温度は、具体的には、例えば、20～25℃、25～30℃、30～35℃、35～40℃、40～45℃、45～50℃、または50～55℃であってもよい。工程Bの

温度は、特に、40℃以上であってもよく、50℃以下であってもよく、40～50℃であってもよい。温度は、通常は工程Bの全期間において上記例示したような温度の範囲内であってもよいが、一時的にその範囲外となってもよい。すなわち、「工程Bの温度が或る範囲である」とは、工程Bの全期間において温度が当該範囲内である場合に限られず、温度が一時的に当該範囲外となる場合も包含する。工程Bについての「一時的」の長さは、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Bについての「一時的」とは、例えば、工程Bの全期間の内の、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下の期間を意味してよい。なお、工程Bの温度は、工程Bを実施した際に所望の程度に細菌が生存するように設定されるものとする。工程Bを実施した際の細菌の生残率は、例えば、50%以上、70%以上、90%以上、または95%以上であってもよい。工程Bを実施した際の細菌の生残率は、工程Bの実施前（具体的には、工程Bの開始時）の生菌数に対する工程Bの実施後（具体的には、工程Bの完了時）の生菌数の比率として算出される。

[0078] 工程AおよびBの温度は、いずれも、例えば、上記例示したような温度範囲となるように適宜制御する（例えば昇温させる）ことができる。温度の制御方法（例えば昇温方法）は、特に制限されない。例えば、混合容器を加熱することにより、温度を制御する（例えば昇温させる）ことができる。混合容器を加熱する手段は、混合容器内部を加熱できるもの（具体的には、混合容器内部の原料を加熱できるもの）であれば、特に制限されない。加熱手段は、例えば、混合容器に組み込まれていてもよく、混合容器の外部に備わっていてもよい。混合容器の外部に備わる加熱手段としては、加熱用ジャケットが挙げられる。すなわち、例えば、混合容器を加熱用ジャケットで覆い、ジャケットを加熱することにより、混合容器内部を外部から加熱することができる。

[0079] 工程Aにおける混合速度は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Aにおける混合速度は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形

状（剤形）、細菌組成物の用途、用いる混合装置の種類等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程Aにおける混合速度は、例えば、攪拌羽根の回転数として、100rpm以上、300rpm以上、500rpm以上、1000rpm以上、1500rpm以上、2000rpm以上、または2500rpm以上であってもよく、5000rpm以下、4000rpm以下、3000rpm以下、2500rpm以下、2000rpm以下、1500rpm以下、または1000rpm以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Aにおける混合速度は、具体的には、例えば、攪拌羽根の回転数として、500～5000rpm、好ましくは1000～4000rpm、より好ましくは2000～3000rpmであってもよい。また、工程Aにおける混合速度は、例えば、攪拌羽根の周速（すなわち攪拌羽根の先端の回転速度）として、1m/s以上、3m/s以上、5m/s以上、10m/s以上、15m/s以上、20m/s以上、または25m/s以上であってもよく、50m/s以下、40m/s以下、30m/s以下、25m/s以下、20m/s以下、15m/s以下、または10m/s以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Aにおける混合速度は、具体的には、例えば、攪拌羽根の周速（すなわち攪拌羽根の先端の回転速度）として、3～50m/s、好ましくは5～40m/s、より好ましくは10～30m/sであってもよい。混合速度は、通常は工程Aの全期間において上記例示したような混合速度の範囲内であってもよいが、一時的にその範囲外となってもよい。すなわち、「工程Aにおける混合速度が或る範囲である」とは、工程Aの全期間において混合速度が当該範囲内である場合に限られず、混合速度が一時的に当該範囲外となる場合も包含する。例えば、工程Aにおいて、原料の混合は、一時的に停止してもよい。すなわち、工程Aにおいて、原料の混合は、連続的に行われてもよく、間欠的に行われてもよい。工程Aについての「一時的」の長さは、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Aについての「一時的」とは、例えば、工程Aの全期間の内の、20%以下、15%以下、

10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下の期間を意味してよい。

[0080] 工程Bにおける混合速度は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Bにおける混合速度は、例えば、原料の種類、細菌組成物の形状（剤形）、細菌組成物の用途、用いる混合装置の種類等の諸条件に応じて適宜設定できる。工程Bにおける混合速度は、例えば、攪拌羽根の回転数として、100rpm以上、300rpm以上、500rpm以上、1000rpm以上、1500rpm以上、2000rpm以上、または2500rpm以上であってもよく、5000rpm以下、4000rpm以下、3000rpm以下、2500rpm以下、2000rpm以下、1500rpm以下、または1000rpm以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Bにおける混合速度は、具体的には、例えば、攪拌羽根の回転数として、500～5000rpm、好ましくは1000～4000rpm、より好ましくは2000～3000rpmであってもよい。また、工程Bにおける混合速度は、例えば、攪拌羽根の周速（すなわち攪拌羽根の先端の回転速度）として、1m/s以上、3m/s以上、5m/s以上、10m/s以上、15m/s以上、20m/s以上、または25m/s以上であってもよく、50m/s以下、40m/s以下、30m/s以下、25m/s以下、20m/s以下、15m/s以下、または10m/s以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。工程Bにおける混合速度は、具体的には、例えば、攪拌羽根の周速（すなわち攪拌羽根の先端の回転速度）として、3～50m/s、好ましくは5～40m/s、より好ましくは10～30m/sであってもよい。混合速度は、通常は工程Bの全期間において上記例示したような混合速度の範囲内であってもよいが、一時的にその範囲外となってもよい。すなわち、「工程Bにおける混合速度が或る範囲である」とは、工程Bの全期間において混合速度が当該範囲内である場合に限られず、混合速度が一時的に当該範囲外となる場合も包含する。例えば、工程Bにおいて、原料の混合は、一時的に停止してもよい。すなわち、工程Bにおいて、原料の混合は、連続的に行われ

てもよく、間欠的に行われてもよい。工程Bについての「一時的」の長さは、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。工程Bについての「一時的」とは、例えば、工程Bの全期間の内の、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下の期間を意味してよい。

[0081] 上記のようにして工程AおよびBを実施することにより、細菌の耐熱性を向上させることができる。耐熱性の向上した細菌は、例えば、細菌組成物（具体的には、耐熱性細菌組成物）として得られてよい。

[0082] 細菌組成物は、例えば、ペースト状の組成物として得られてよい。細菌組成物は、そのまま、あるいは適宜加工して利用してよい。細菌組成物は、例えば、任意の形状に加工して利用してもよい。

[0083] 細菌組成物の用途は、特に制限されない。細菌組成物は、例えば、飲食品に添加して利用されてよい。すなわち、細菌組成物は、例えば、飲食品添加用の組成物（すなわち飲食品に添加して利用される組成物）であってよい。また、本発明は、細菌組成物を含有する飲食品を提供する。飲食品は、特に制限されない。飲食品としては、乳製品が挙げられる。乳製品は、牛乳を原料として製造された製品であってよい。乳製品としては、粉乳が挙げられる。粉乳としては、全粉乳、脱脂粉乳、調整粉乳、ホエイパウダー、クリームパウダーが挙げられる。粉乳等の飲食品として、具体的には、乳児用のものや幼児用のものが挙げられる。粉乳等の飲食品としては、特に、乳児用のものが挙げられる。例えば、粉乳として、具体的には、乳児用調製粉乳やフォローアップミルク等の育児用調製粉乳が挙げられる。「乳児」とは、生後1年未満の子供をいう。「幼児」とは、生後1年から小学校就学までの子供をいう。

[0084] 飲食品における細菌組成物の含有量は、特に制限されない。飲食品における細菌組成物の含有量は、例えば、0.01% (w/w) 以上、0.1% (w/w) 以上、0.5% (w/w) 以上、1% (w/w) 以上、5% (w/w) 以上、または10% (w/w) 以上であってもよく、50% (w/w) 以下、30% (w/w) 以下、20% (w/w) 以下、10% (w/w) 以

下、または5% (w/w) 以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせの範囲であってもよい。飲食品における細菌組成物の含有量は、具体的には、例えば、0.01% (w/w) ~ 50% (w/w)、0.1% (w/w) ~ 50% (w/w)、0.1 (w/w) ~ 10 (w/w) %、または0.5 (w/w) ~ 5 (w/w) %であってもよい。また、飲食品における細菌組成物の含有量は、例えば、細菌の含有量に換算して、 1×10^4 cfu/g 以上、 1×10^5 cfu/g 以上、 1×10^6 cfu/g 以上、または 1×10^7 cfu/g 以上であってもよく、 1×10^{13} cfu/g 以下、 1×10^{12} cfu/g 以下、 1×10^{11} cfu/g 以下、または 1×10^{10} cfu/g 以下であってもよく、それらの組み合わせの範囲であってもよい。飲食品における細菌組成物の含有量は、具体的には、例えば、細菌の含有量に換算して、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g、好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g、より好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/g であってもよい。

[0085] <2> 本発明の組成物

本発明の組成物は、細菌、油脂、および乳化剤を含有する組成物である。細菌、油脂、および乳化剤を総称して「有効成分」ともいう。

[0086] 本発明の組成物は、有効成分からなるものであってもよく、そうでなくてもよい。すなわち、本発明の組成物は、有効成分に加えて、他の成分を含有していてもよい。

[0087] 本発明の組成物に含有される成分（すなわち、有効成分および任意で他の成分）については、本発明の方法における原料についての記載を準用できる。本発明の組成物に含有される細菌は、本発明の組成物に含有されない場合と比較して耐熱性の向上した細菌であってよい。すなわち、本発明の組成物は、耐熱性細菌組成物（耐熱性の向上した細菌を含有する組成物）であってよい。本発明の組成物においては、本発明の組成物に含有されることにより得られる細菌の耐熱性を向上させる効果を「耐熱性向上効果」ともいう。本発明の組成物における耐熱性向上効果については、本発明の方法における耐

熱性向上効果についての記載を準用できる。すなわち、本発明の方法における工程 A および B の実施前の細菌は、本発明の組成物に含有されていない状態の細菌と読み替えてよい。また、本発明の方法における工程 A および B の実施後の細菌は、本発明の組成物に含有された状態の細菌と読み替えてよい。

[0088] 本発明の組成物に含有される成分の量および量比は、耐熱性向上効果が得られる限り、特に制限されない。本発明の組成物に含有される成分の量および量比については、本発明の方法における原料の使用量についての記載を準用できる。すなわち、本発明の方法に用いられる原料の量比は、本発明の組成物に含有される成分の量比と読み替えてよい。また、本発明の方法における原料の総使用量に対する有効成分の総使用量の重量比は、本発明の組成物における有効成分の総含有量と読み替えてよい。また、本発明の組成物における各有効成分の含有量は、本発明の組成物における有効成分の総含有量と本発明の組成物に含有される成分の量比から算出される範囲であってよい。

[0089] また、本発明の組成物における細菌の含有量は、例えば、 1×10^4 cfu/g 以上、 1×10^5 cfu/g 以上、 1×10^6 cfu/g 以上、または 1×10^7 cfu/g 以上であってもよく、 1×10^{13} cfu/g 以下、 1×10^{12} cfu/g 以下、または 1×10^{11} cfu/g 以下であってもよく、それらの組み合わせの範囲であってもよい。本発明の組成物における細菌の含有量は、具体的には、例えば、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{13}$ cfu/g、好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g、より好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g であってもよい。

[0090] 本発明の組成物において、細菌は、例えば、油脂および乳化剤でコーティングされていてよい。本発明の組成物において、細菌は、具体的には、例えば、油脂と乳化剤の混合物でコーティングされていてよい。本発明の組成物において、細菌は、具体的には、例えば、油脂でコーティングされ、さらに乳化剤でコーティングされていてもよい。本発明の組成物において、細菌は、具体的には、例えば、乳化剤でコーティングされ、さらに油脂でコーティ

ングされていてもよい。

[0091] 本発明の組成物の形状は、特に制限されない。本発明の組成物は、例えば、粉末状であってもよく、ペースト状であってもよい。

[0092] 本発明の組成物の用途は、特に制限されない。本発明の組成物の用途については、本発明の方法により得られる細菌組成物の用途についての記載を準用できる。すなわち、本発明の組成物は、例えば、粉乳等の飲食品に添加して利用されてよい。

[0093] 本発明の組成物を製造する方法は、特に制限されない。本発明の組成物は、例えば、上述した本発明の方法により製造できる。すなわち、本発明の組成物の一態様は、本発明の方法により製造される細菌組成物であってよい。

実施例

[0094] 以下、非限定的な実施例を参照して、本発明をさらに具体的に説明する。

[0095] [実施例 1]

本実施例では、油脂および乳化剤の併用による細菌の耐熱性向上効果を評価した。細菌としては、*Bifidobacterium longum* BB536 (NITE BP-02621; 以下、「BB536」ともいう)を用いた。油脂としては、パーム核極度硬化油 (K-40; 太陽油脂社製)を用いた。乳化剤としては、ポリグリセリン脂肪酸エステル (ポエムRJ-38; 理研ビタミン社製)を用いた。ポエムRJ-38は、C 18 (65%) およびC 16 (34%)の構成脂肪酸を有するポリグリセリン脂肪酸エステルである。

[0096] BB536を培養し、得られた菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体を得た。BB536の乾燥菌体50 gをバランスグランLBG-1L (攪拌羽根の回転直径=0.136 m; フロイント・ターボ社製)に入れ、2400 rpmで攪拌しながら、表1に記載の原料を添加した。原料の添加後、表1に記載の条件で攪拌を実施し、ペースト状の産物を得た。なお、攪拌が2段階で実施される場合は、1層目の原料を添加して1層目の条件で攪拌を実施した後、さらに2層目の原料を添加して2層目の条件で攪拌を実施した。パーム核極度硬化油は、予め加熱溶解してから菌体に滴下した。ポリグリセリン脂肪酸エステルは、粉末のまま菌体に添加

した。産物を1.0重量%の濃度で70℃の湯に分散し、1分後のBB536の生残率を測定し、BB536の耐熱性の指標とした。実験条件は、特記しない限り、以下の実施例においても同一である。

[0097] 結果を表1に示す。パーム核極度硬化油とポリグリセリン脂肪酸エステルを併用した場合（No. 4～6）には、未処理の場合（No. 1）およびパーム核極度硬化油またはポリグリセリン脂肪酸エステルを単独で用いた場合（No. 2～3）と比較して、高い耐熱性が得られた。特に、パーム核極度硬化油とポリグリセリン脂肪酸エステルを2段階に分けて細菌と混合した場合（No. 5～6）には、パーム核極度硬化油とポリグリセリン脂肪酸エステルを同時に添加した場合（No. 4）と比較して、高い耐熱性が得られた。一方、パーム核極度硬化油の添加後の攪拌温度がパーム核極度硬化油の融点未満である場合には、耐熱性はあまり向上しなかった（No. 7）。以上より、細菌を油脂および乳化剤と混合することにより細菌の耐熱性が向上すること、および細菌と油脂との混合は油脂の融点以上の温度で実施するのが好ましいことが明らかとなった。

[0098] [表1]

表1：Bifidobacterium longum BB536の耐熱性の評価結果

No.	原料	1層目			2層目			70℃で1分 処理後の 生残率(%)
		温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	
1	未処理							<0.001
2	パーム核極度硬化油 3g	45	2400	3				0.4
3	ポリグリセリン脂肪酸エステル 12.5g	50	2400	2.5				1.5
4	パーム核極度硬化油 3g ポリグリセリン脂肪酸エステル 12.5g 同時添加	45	2400	5				4.1
5	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 12.5g	45	2400	3	45	2400	5	15.0
6	1層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 3g 2層目 パーム核極度硬化油 3g	50	2400	3	45	2400	5	13.8
7	1層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 3g 2層目 パーム核極度硬化油 12.5g	50	2400	3	30	2400	5	2.0

[0099] [実施例2]

本実施例では、乳化剤を種々の添加量で用いた際の、油脂および乳化剤の併用による細菌の耐熱性向上効果を評価した。用いた細菌、油脂、および乳

化剤は実施例 1 と同一である。

[0100] 表 2 に記載の原料および攪拌条件にて攪拌を実施し、細菌の耐熱性を評価した。

[0101] 結果を表 2 に示す。いずれの添加量でポリグリセリン脂肪酸エステルを用いた場合（No. 8～12）でも、未処理の場合（No. 1）と比較して、高い耐熱性が得られた。特に、ポリグリセリン脂肪酸エステルの添加量が 10g～15g の場合（No. 9～11）に、高い耐熱性が得られた。

[0102] [表2]

表 2 : Bifidobacterium longum BB536 の耐熱性の評価結果

No.	原料	1層目			2層目			70℃で1分 処理後の 生残率(%)
		温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	
1	未処理							<0.001
8	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 7.5g	45	2400	3	45	2400	5	4.7
9	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 10g	45	2400	3	45	2400	15	12.9
10	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 12.5g	45	2400	3	45	2400	10	15.9
11	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 15g	45	2400	3	45	2400	5	12.0
12	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 ポリグリセリン脂肪酸エステル 17.5g	45	2400	3	45	2400	5	2.6

[0103] [実施例 3]

本実施例では、他の乳化剤を用いた際の、油脂および乳化剤の併用による細菌の耐熱性向上効果を評価した。用いた細菌および油脂は実施例 1 と同一である。乳化剤としては、レシチン（Yelkin TS；エー・ディー・エム・ジャパン社製）を用いた。Yelkin TSは、液体状の大豆レシチンである。

[0104] 表 3 に記載の原料および攪拌条件にて攪拌を実施し、細菌の耐熱性を評価した。レシチンは、そのまま菌体に滴下した。

[0105] 結果を表 3 に示す。乳化剤としてレシチンを用いた場合（No. 13～28）でも、未処理の場合（No. 1）と比較して、高い耐熱性が得られた。以上より、ポリグリセリン脂肪酸エステルに限られず、種々の乳化剤について、油脂との併用により細菌の耐熱性向上効果が得られることが明らかとな

った。

[0106] [表3]

表3 : Bifidobacterium longum BB536 の耐熱性の評価結果

No.	原料	1層目			2層目			70℃で1分 処理後の 生残率(%)
		温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	
1	未処理							<0.001
13	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 2.5g	45	2400	3	45	2400	40	9.4
14	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 3.5g	45	2400	3	45	2400	5	21.8
15	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 3.5g	45	2400	3	45	2400	20	24.7
16	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 3.5g	45	2400	3	45	2400	40	37.3
17	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 3.5g	45	2400	3	45	2400	60	27.1
18	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 4.5g	45	2400	3	45	2400	40	33.6
19	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 5.5g	45	2400	3	45	2400	60	55.1
20	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 5.5g	45	2400	3	45	2400	120	50.2
21	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 6.5g	45	2400	3	45	2400	40	33.4
22	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 6.5g	45	2400	3	45	2400	60	33.4
23	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 6.5g	45	2400	3	45	2400	120	37.3
24	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 7.5g	45	2400	3	45	2400	40	30.8
25	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 8.5g	45	2400	3	45	2400	30	31.4
26	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 9.0g	45	2400	3	45	2400	30	30.2
27	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 10.5g	45	2400	3	45	2400	20	44.4
28	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 12.0g	45	2400	3	45	2400	10	23.6

[0107] [実施例4]

本実施例では、他の細菌を用いた際の、油脂および乳化剤の併用による細菌の耐熱性向上効果を評価した。用いた油脂および乳化剤は実施例3と同一である。細菌としては、Bifidobacterium breve M-16V (NITE BP-02622 ; 以下、「M-16V」ともいう)を用いた。

[0108] M-16Vを培養し、菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体を得た。M-16Vの乾燥菌体50

gを用いて、表4に記載の原料および攪拌条件にて攪拌を実施し、細菌の耐熱性を評価した。

[0109] 結果を表4に示す。細菌として*Bifidobacterium breve*を用いた場合（No. 30）でも、未処理の場合（No. 29）と比較して、高い耐熱性が得られた。以上より、*Bifidobacterium longum*に限られず、種々の細菌について、油脂および乳化剤の併用による耐熱性向上効果が得られることが明らかとなった。

[0110] [表4]

表4： *Bifidobacterium breve* M-16Vの耐熱性の評価結果

No.	原料	1層目			2層目			70℃で1分 処理後の 生残率(%)
		温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	温度 (℃)	回転数 (rpm)	時間 (分)	
29	未処理							<0.00001
30	1層目 パーム核極度硬化油 3g 2層目 レシチン 8.8g	45	2400	3	45	2400	60	29.0

[0111] [実施例5]

BB536の培養物を凍結乾燥して得た菌末50 gをバランスグランLBG-1L（攪拌羽根の回転直径=0.136 m；フロイント・ターボ社製）に入れ、2400 rpmで攪拌しながら、あらかじめ加熱溶解しておいた液体状のナタネ極度硬化油脂3gを添加し、45℃、回転数2400rpmの条件で3分間攪拌する。次いで、液体状のレシチン5gを添加した後、45℃、回転数2400rpmの条件でさらに3分間攪拌して、耐熱性の高い細菌を含有する組成物を得る。

[0112] [実施例6]

BB536の培養物を凍結乾燥して得た菌末50 gをバランスグランLBG-1L（攪拌羽根の回転直径=0.136 m；フロイント・ターボ社製）に入れ、2400 rpmで攪拌しながら、あらかじめ加熱溶解しておいた液体状のパーム極度硬化油脂3gを添加し、45℃、回転数2400rpmの条件で3分間攪拌する。次いで、モノグリセリン脂肪酸エステル 10gを添加した後、45℃、回転数2400rpmの条件でさらに5分間攪拌して、耐熱性の高い細菌を含有する組成物を得る。

[0113] 〔実施例 7〕

M-16Vの培養物を凍結乾燥して得た菌末50 gをバランスグランLBG-1L（攪拌羽根の回転直径＝0.136 m；フロイント・ターボ社製）に入れ、2400 rpmで攪拌しながら、あらかじめ加熱溶解しておいた液体状のパーム核極度硬化油脂3 gを添加し、45℃、回転数2400rpmの条件で3分間攪拌する。次いで、ショ糖脂肪酸エステル 10gを添加した後、45℃、回転数2400rpmの条件でさらに5分間攪拌して、耐熱性の高い細菌を含有する組成物を得る。

産業上の利用可能性

[0114] 本発明によれば、細菌の耐熱性を向上させることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 細菌を含有する組成物の製造方法であって、
下記工程 A および B :
(A) 細菌を油脂と混合する工程 ;
(B) 細菌を乳化剤と混合する工程
を含み、
前記工程 A が、前記油脂の融点以上の温度で実施される、方法。
- [請求項2] 前記工程 A が、前記工程 B の開始前または開始後に開始される、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程 A および B が、同時に開始される、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項4] 前記油脂が、融点が 5 0℃以下の油脂である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項5] 前記油脂が、融点が 3 5℃以上の油脂である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項6] 前記油脂が、パーム核極度硬化油である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項7] 前記工程 A が、5 0℃以下の温度で実施される、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項8] 前記工程 A が、4 0℃以上の温度で実施される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項9] 前記乳化剤が、レシチンまたはポリグリセリン脂肪酸エステルである、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項10] 前記工程 B が、5 0℃以下の温度で実施される、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項11] 前記工程 B が、4 0℃以上の温度で実施される、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項12] 前記油脂の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量 5 0 g 当たり、1 .

5～4. 5 gである、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

[請求項13] 前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステルであり、
前記乳化剤の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量50 g当たり、8～17 gである、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

[請求項14] 前記乳化剤が、レシチンであり、
前記乳化剤の混合量が、前記細菌の乾燥菌体重量50 g当たり、1～20 gである、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

[請求項15] 前記細菌が、ビフィドバクテリウム属細菌である、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

[請求項16] 前記細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) またはビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) である、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 前記細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムBB536 (NITE BP-02621) またはビフィドバクテリウム・ブレーベM-16V (NITE BP-02622) である、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

[請求項18] 細菌の耐熱性を向上させる方法であって、
下記工程AおよびB：
(A) 細菌を油脂と混合する工程；
(B) 細菌を乳化剤と混合する工程
を含み、
前記工程Aが、前記油脂の融点以上の温度で実施される、方法。

[請求項19] 細菌、油脂、および乳化剤を含有する、組成物。

[請求項20] 前記細菌が、前記油脂および前記乳化剤でコーティングされている、請求項19に記載の組成物。

[請求項21] 請求項1～17のいずれか1項に記載の方法で製造された組成物または請求項19もしくは20に記載の組成物を含有する粉乳。

[請求項22] 育児用調製粉乳である、請求項21に記載の粉乳。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/014078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23C 9/16 (2006.01) i; C12N 1/00 (2006.01) i; C12N 1/20 (2006.01) i
 FI: C12N1/20 C; C12N1/00 K; A23C9/16

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)

A23C9/16; C12N1/00; C12N1/20

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-103823 A (SUNTORY HOLDINGS LIMITED) 02.06.2011 (2011-06-02) claim 1, paragraphs	1, 3-5, 7-12, 14, 15, 18-21
Y	[0015], [0019], [0021], [0035], [0044], [0048], [0062], examples 1-3	6-17, 21, 22
X	JP 60-221078 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) 05.11.1985 (1985-11-05) claims 1, 4, page 2, lower left column, lines 8-10, page 4, upper right column, lines 9-15, page 4, lower left column, line 14 to lower right column, line 1, examples 1, 3, table 2	1, 3-5, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 18-21
X	JP 2013-510560 A (UNISTRAW PATENT HOLDINGS LIMITED) 28.03.2013 (2013-03-28) claims 1, 6, 10, examples 2, 3	1, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 14-16, 19-21
Y		9, 10, 12, 13, 15-17, 21, 22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"I" 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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2020 (16.06.2020)

Date of mailing of the international search report

23 June 2020 (23.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/014078

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0055083 A1 (KOWALSKI, Ray Edward) 04.03.2010 (2010-03-04) claims 2, 4, 10, 11, formulations 1, 2	1, 3-5, 7, 9, 10, 14, 15, 19- 21
Y		9, 10, 13, 15- 17, 21, 22
A	JP 2017-102182 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 08.06.2017 (2017-06-08) paragraph [0018]	1-22
X	US 2012/0282104 A1 (CHUNG, Myung-Jun) 08.11.2012 (2012-11-08) claims 1, 6, embodiments 1, 2, paragraph [0074]	1, 3-5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 18-21
Y		9, 10, 12, 13, 15-17, 21, 22
A	JP 7-39351 A (RIKEN VITAMIN CO., LTD.) 10.02.1995 (1995-02-10) paragraph [0013]	1-22
X	JP 8-214875 A (MIZUSAWA INDUSTRIAL CHEMICALS, LTD.) 27.08.1996 (1996-08-27) example 25, paragraph [0053]	19, 21
Y	JP 2018-19628 A (MIYOSHI OIL & FAT CO., LTD.) 08.02.2018 (2018-02-08) paragraphs [0048], [0068]	6-17, 21, 22
Y	JP 2014-65669 A (NIHON KENKO ZOSHIN SHIEN KIKO) 17.04.2014 (2014-04-17) examples	16, 17, 21, 22
Y	ABE, Fumiaki et al., "Stability of bifidobacteria in powdered formula", International Journal of Food Science and Technology, 2009, vol. 44, pp. 718-724, in particular, abstract abstract	16, 17, 21, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/014078

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2011-103823 A	02 Jun. 2011	(Family: none)	
JP 60-221078 A	05 Nov. 1985	US 4888171 A claim 1, column 2, lines 40-43, column 3, lines 30-44, 52- 65, experiments 1, 3, table 2	
JP 2013-510560 A	28 Mar. 2013	EP 159891 A1 US 2012/0247993 A1 claims 1, 6, 9, examples 2, 3 WO 2010/054439 A1 EP 2512266 A1 CN 102834026 A	
US 2010/0055083 A1	04 Mar. 2010	WO 2008/046625 A2 EP 2073643 A1	
JP 2017-102382 A	08 Jun. 2017	(Family: none)	
US 2012/0282304 A1	08 Nov. 2012	WO 2012/060554 A1 EP 2653533 A2 KR 10-2012-0046676 A	
JP 7-39351 A	10 Feb. 1995	(Family: none)	
JP 8-214875 A	27 Aug. 1996	(Family: none)	
JP 2018-19628 A	08 Feb. 2018	(Family: none)	
JP 2014-65669 A	14 Apr. 2014	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A23C 9/16(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: C12N1/20 C; C12N1/00 K; A23C9/16														
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（IPC）） A23C9/16; C12N1/00; C12N1/20														
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2020年													
日本国実用新案登録公報	1996-2020年													
日本国登録実用新案公報	1994-2020年													
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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)														
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 請求項の番号												
X	JP 2011-103823 A (サントリーホールディングス株式会社) 02.06.2011 (2011-06-02) 請求項1、段落0015、0019、0021、0035、0044、0048、0062、実施例1～3	1,3-5,7-12,14,15,18-21												
Y		6-17,21,22												
X	JP 60-221078 A (森永乳業株式会社) 05.11.1985 (1985-11-05) 請求項1、4、2頁左下欄8～10行、4頁右上欄9～15行、4頁左下欄14行～右下欄1行、実施例1、3、第2表	1,3-5,7,8,10,11,15,16,18-21												
X	JP 2013-510560 A (ユニストロー パテント ホールディングス リミテッド) 28.03.2013 (2013-03-28) 請求項1、6、10、実施例2、3	1,3,4,7,9,10,12,14-16,19-21												
Y		9,10,12,13,15-17,21,22												
X	US 2010/0055083 A1 (KOWALSKI, Ray Edward) 04.03.2010 (2010-03-04) 請求項2、4、10、11、Formulation 1, 2	1,3-5,7,9,10,14,15,19-21												
Y		9,10,13,15-17,21,22												
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 参考文献のカテゴリー</td> <td>"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 参考文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"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	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
* 参考文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
"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	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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														
国際調査を完了した日 16.06.2020	国際調査報告の発送日 23.06.2020													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 田中 晴絵 4B 9739 電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

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 請求項の番号
A	JP 2017-102382 A (三菱ケミカル株式会社) 08.06.2017 (2017 - 06 - 08) 段落 0 0 1 8	1-22
X Y	US 2012/0282304 A1 (CHUNG, Myung Jun) 08.11.2012 (2012 - 11 - 08) 請求項 1、6、Embodiment 1, 2、[0 0 7 4]	1, 3-5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 18-21 9, 10, 12, 13, 15-17, 21, 22
A	JP 7-39351 A (理研ビタミン株式会社) 10.02.1995 (1995 - 02 - 10) 段落 0 0 1 3	1-22
X	JP 8-214875 A (水澤化学工業株式会社) 27.08.1996 (1996 - 08 - 27) 実施例 2 5、段落 0 0 5 3	19, 21
Y	JP 2018-19628 A (ミヨシ油脂株式会社) 08.02.2018 (2018 - 02 - 08) 段落 0 0 4 8、0 0 6 8	6-17, 21, 22
Y	JP 2014-65669 A (特定非営利活動法人日本健康増進支援機構) 17.04.2014 (2014 - 04 - 17) 実施例	16, 17, 21, 22
Y	ABE, Fumiaki et al., Stability of bifidobacteria in powdered formula, International Journal of Food Science and Technology, 2009, vol.44, p.718-724, 特に、要約 要約	16, 17, 21, 22

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/014078

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2011-103823	A	02.06.2011	(ファミリーなし)	
JP	60-221078	A	05.11.1985	US 4888171 A	
				請求項 1、2 欄 4 0 ~ 4 3 行、3 欄 3 0 ~ 4 4 行、5 2 ~ 6 5 行、Experiment 1, 3、Table 2	
				EP 159891 A1	
JP	2013-510560	A	28.03.2013	US 2012/0247993 A1	
				請求項 1、6、9、Example 2、3	
				WO 2010/054439 A1	
				EP 2512266 A1	
				CN 102834026 A	
US	2010/0055083	A1	04.03.2010	WO 2008/046625 A2	
				EP 2073643 A1	
JP	2017-102382	A	08.06.2017	(ファミリーなし)	
US	2012/0282304	A1	08.11.2012	WO 2012/060554 A1	
				EP 2653533 A2	
				KR 10-2012-0046676 A	
JP	7-39351	A	10.02.1995	(ファミリーなし)	
JP	8-214875	A	27.08.1996	(ファミリーなし)	
JP	2018-19628	A	08.02.2018	(ファミリーなし)	
JP	2014-65669	A	17.04.2014	(ファミリーなし)	