

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-531713

(P2019-531713A)

(43) 公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
C 12 N 1/20 (2006.01)	C 12 N 1/20	Z N A A	4 B 0 0 1
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 B 0 6 5
A 23 C 9/123 (2006.01)	A 23 C 9/123		
A 23 C 9/13 (2006.01)	A 23 C 9/13		
A 23 C 19/032 (2006.01)	A 23 C 19/032		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-511780 (P2019-511780)	(71) 出願人	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, デーコー-2970 ヘル ルスホルム, ベイエ アレ 10-12
(86) (22) 出願日	平成29年8月24日 (2017.8.24)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月24日 (2019.4.24)	(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(86) 國際出願番号	PCT/EP2017/071352	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87) 國際公開番号	W02018/041717	(74) 代理人	100141977 弁理士 中島 勝
(87) 國際公開日	平成30年3月8日 (2018.3.8)	(74) 代理人	100150810 弁理士 武居 良太郎
(31) 優先権主張番号	PCT/DK2016/000031		
(32) 優先日	平成28年9月1日 (2016.9.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	デンマーク (DK)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規細菌

(57) 【要約】

本発明は、食感特性を有する細菌細胞、前記細胞を含む種菌、及び前記細菌細胞を用いて製造された乳製品に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10ppm(百万分率、mg/kg乾燥重量)未満、例えば9ppm未満、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満の鉄イオン(例えば、Fe²⁺)を含有する乳酸菌(LAB)。

【請求項 2】

6ppm(百万分率、mg/kg乾燥重量)未満、例えば5.5ppm未満、5.2ppm未満、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のマンガンイオン(例えば、Mn²⁺)を含有するLAB。

【請求項 3】

合計で16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、13ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺を含有する、請求項1又は2に記載のLAB。

10

【請求項 4】

攪乱された二価金属イオン代謝(DMIM)を有する、請求項1~3の何れか1項に記載の乳酸菌(LAB)。

【請求項 5】

攪乱された二価金属イオン代謝(DMIM)を有する乳酸菌(LAB)。

【請求項 6】

前記攪乱されたDMIMが、減少したDMIMである、請求項1~5の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 7】

前記攪乱されたDMIMが、fur遺伝子の変化した発現(例えば、減少)、例えば前記遺伝子の(部分的又は完全な)不活性化、前記遺伝子又はその一部の欠失及び/又は前記遺伝子への追加のDNAの挿入によって引き起こされる、請求項1~6の何れか1項に記載のLAB。

20

【請求項 8】

前記攪乱されたDMIMが、ノックアウト突然変異等の二価金属イオンの取り込みに関連する遺伝子の変異によって引き起こされる、請求項1~7の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 9】

前記攪乱されたDMIMが、mntH遺伝子の発現の減少、例えば前記遺伝子の(部分的又は完全な)不活性化、前記遺伝子又はその一部の欠失及び/又は前記遺伝子への追加のDNAの挿入等によって引き起こされる、請求項1~8の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 10】

前記攪乱されたDMIMが、fatc遺伝子又は鉄の取り込みに関与する何れか他の遺伝子の発現の減少、例えば前記遺伝子の(部分的又は完全な)不活性化、前記遺伝子又はその一部の欠失及び/又は前記遺伝子への追加のDNAの挿入等によって引き起こされる、請求項1~9の何れか1項に記載のLAB。

30

【請求項 11】

前記攪乱されたDMIMが、バクテリウム属(bacterium)が、亜テルル酸塩(tellurite)に耐性があることによって引き起こされる、請求項1~10の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 12】

前記二価金属イオンが、Fe²⁺、Mg²⁺、及びMn²⁺からなる群、好ましくは、Fe²⁺、及びMg²⁺の群から選択される、請求項1~11の何れか1項に記載のLAB。

40

【請求項 13】

前記二価金属イオンが、Fe²⁺である、請求項1~12の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 14】

前記二価金属イオンが、Mn²⁺である、請求項1~13の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 15】

突然変異により、及び/又は遺伝子工学により得られた、請求項1~14の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 16】

0.25 μg/g未満、例えば、0.2 μg/g未満のFe²⁺及びMn²⁺からなる群から選択される二価金属イオンの濃度を有する培地で増殖することによって得られる、請求項1~15の何れか1項に記載のLAB。

50

【請求項 17】

ラクトバチルス・ブルガリカス種 (species *Lactobacillus bulgaricus*) に属する、請求項1～16の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 18】

ストレプトコッカス・サーモフィルス種 (species *Streptococcus thermophilus*) に属する、請求項1～17の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 19】

例えば、向上したEPS産生を有する突然変異株又は変異株等のストレプトコッカス・サーモフィルスCHCC15712 (DSM25955)、又は当該株の突然変異株又は変異株。

【請求項 20】

亜テルル酸塩に耐性である、請求項1～19の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 21】

乳に1ml当たり10E8 CFUで接種した際、37℃で9.5%の還元脱脂粉乳における前記バクテリウム属の16時間後の増殖のせん断応力として測定される、乳中で約50Pa.sより大きい(例えば、60又は70Pa.sより大きい)粘度を生じる、請求項1～20の何れか1項に記載のLAB。

【請求項 22】

請求項1～21の何れか1項に記載のLAB (*lactic acid bacterium*) を含む組成物。

【請求項 23】

種菌である、請求項22に記載の組成物。

【請求項 24】

LABを含む組成物であって、前記組成物が、金属イオンキレート剤(例えば、EDTA)を、好ましくは1ppm以上の濃度でさらに含む、組成物。

【請求項 25】

1mg当たり少なくとも10E9 CFU(細胞形成単位 (cell forming unit))の前記LABを含む、請求項22～24の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 26】

1mg当たり少なくとも10E11 CFUの前記LABを含む、請求項22～25の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 27】

1mg当たり10E10 CFU～10E14 CFUの前記LABを含む、請求項22～26の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 28】

凍結又は凍結乾燥等の乾燥形態である、請求項22～27の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 29】

10ppm未満、例えば9.5ppm未満、9ppm未満、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満のFe²⁺を含む、請求項22～28の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 30】

6ppm未満、例えば5.5ppm未満、5.2ppm未満、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のMn²⁺を含む、請求項22～29の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 31】

16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、13ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺の合計量を含む、請求項22～30の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 32】

少なくとも2種類、例えば少なくとも3種類、少なくとも5種類又は少なくとも10種類等の異なるLAB株を含む、請求項22～31の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 33】

少なくとも2種類異なるLAB株が、異なる種に属する、請求項22～32の何れか1項に記載の組成物。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）の製造方法であって、上記請求項の何れかに記載のLAB、上記請求項の何れかに記載の株、上記請求項の何れかに記載の組成物を用いて、乳基質を発酵させることを含む、製造方法。

【請求項 3 5】

乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）の製造方法であって、0.25 μg/g未満（例えば、0.20 μg/g未満又は0.15 μg/g未満等）のFe2+濃度を有する乳基質を、例えば、上記請求項の何れかに記載のLABを用いて発酵させることを含む、製造方法。

【請求項 3 6】

乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ）の製造方法であって、0.025 μg/g（例えば、0.020 μg/g未満又は0.015 μg/g未満）のMn2+の濃度を有する乳基質を、例えば、上記請求項の何れかに記載のLAB等のLABを用いて発酵させることを含む、製造方法。

【請求項 3 7】

乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）の製造方法であって、活性furタンパク質を含まないLABを用いて乳基質を発酵させることを含む、製造方法。

【請求項 3 8】

前記LABが、ストレプトコッカス・サーモフィルスの株である、請求項34～37の何れか1項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記LABが、ラクトバチルス・ブルガリカスの株である、請求項34～38の何れか1項に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項34～38の何れか1項に記載の方法によって得ることが出来る、例えば、発酵乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）等の乳製品。

【請求項 4 1】

果実濃縮物、シロップ、プロバイオティック細菌培養物、着色剤、増粘剤、香味剤、及び保存剤からなる群から選択される成分を任意で含み、及び/又は任意で搅拌タイプ製品、セットタイプ製品、又は飲用製品の形態である、請求項40に記載の乳製品。

【請求項 4 2】

乳基質に接種した際、食感を与える（又は母株と比較して増加した食感を与える）LAB株の製造方法であって、

- LAB株（母株）の前記fur遺伝子に突然変異を導入すること、すなわち、遺伝子工学又は突然変異誘発によって導入すること、及び

- 母株と比較して向上した食感特性を有する突然変異株をスクリーニングすること、を含む、製造方法。

【請求項 4 3】

LAB株（EPSを産生することができる）のEPS産生を向上させるための方法であって、前記方法が、株の接種前、接種中又は接種後に培地（例えば、産生培地又は乳基質）から、例えば金属キレート剤を加えること等によるFe2+イオンを除去することを含む、方法。

【請求項 4 4】

結果として生じる培地が、0.25 μg/g未満（例えば0.20 μg/g未満又は0.15 μg/g未満等）のFe2+濃度未満のFe2+濃度を有する、請求項43に記載の製造方法。

【請求項 4 5】

LAB株のEPS産生を向上させるための方法であって、前記方法が、株の接種前、接種中又は接種後に培地からMn2+イオンを除去することをさらに含む、請求項42～44の何れか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 6】

結果として生じる培地が、0.025 μg/g未満（例えば、0.020 μg/g未満又は0.015 μg/g未満）のMn²⁺濃度を有する、LAB株のEPS産生を向上させる、請求項45に記載の方法。

【請求項 4 7】

増殖が、少なくとも2時間、又は少なくとも4時間行われる、請求項43～46の何れか1項に記載の方法。

【請求項 4 8】

LAB株（EPS産生可能）の産生方法であって、前記方法が、前記fur遺伝子の不活性化（部分的又は完全な）を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、組織化特性を有する細菌細胞、前記細胞を含む種菌、及び前記細菌細胞を用いて製造された乳製品に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

食品産業では、食品の味及び食感を改善するためのみならず、これらの食品の貯蔵寿命を延ばすためにも、多数の細菌、特に乳酸菌（lactic acid bacteria）（LAB）を用いている。乳業において、LABは、乳の酸性化をもたらすためのみならず（発酵による）、それらが組み込まれている製品に食感を加える目的でも広く用いられている。

20

【0 0 0 3】

食品産業において用いられるLABの中には、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）属、ラクトコッカス（*Lactococcus*）属、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属、ロイコノストック（*Leuconostoc*）属、ペディオコッカス（*Pediococcus*）属、及びビフィドバクテリウム（*Bifidobacterium*）属が、挙げられ得る。

【0 0 0 4】

LABは、食品、特に発酵食品の製造のために単独で又は他の細菌と組み合わせて広範囲で用いられる。例えば、ヨーグルト等の発酵乳の製造に用いられる種菌の製剤化に用いられる。それらのいくつかは、発酵製品の食感の発展において主要な役割を担う。この特徴は、ポリサッカライドの産生と密接に関連する。ストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）及びラクトバチルス・ブルガリカス（*Lactobacillus bulgaricus*）の株の間で、食感付与（texturizing）株と非食感付与株に区別することが可能である。

30

【0 0 0 5】

産業界の要求に合致させる目的で、LAB、特にストレプトコッカス・サーモフィルス及びラクトバチルス種の新規食感付与株を提案することが必要になった。具体的な焦点の1つは、乳製品中のタンパク質又はペクチン（両方とも食感を向上させる）の量を減らすことであり、これらは、両方ともコストがかかるためである。

【0 0 0 6】

従って、本発明が解決しようと提案する課題は、食品の食感付与、特に乳酸菌（例えば、ストレプトコッカス・サーモフィルス）の食感付与株が、ラクトバチルス種の株と一緒に用いられる食品のための良好な性質を有する乳酸菌の株を提供することである。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 7】

【非特許文献 1】Lin et al., *Microbiology* (2011), 157, 419-429.

【非特許文献 2】E.P. Skaar, *PLoS Pathog.* (2010) Aug 12;6(8):e1000949.

【非特許文献 3】Baichoo et al., *Molecular Microbiology* (2002) 45 (6), 1613-1629.

【非特許文献 4】Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

50

【非特許文献 5】Albert Saavedra et al., 2013, Advanced Materials Research, 825, 115

【発明の概要】

【0008】

本発明者達は、驚くべきことに、乳酸菌細胞、又は乳細菌細胞を含有する種菌における金属イオン濃度が、その細菌細胞、又は種菌が、発酵乳の製造に用いられる際に、食感の形成に影響を及ぼすことを見出した。

【0009】

この驚くべき発見に従って、本発明は、向上した食感付与特性を有する新規LAB株、及びそのような株を製造するための方法、並びにそのような株を用いて製造された発酵乳製品に関する。 10

【0010】

従って、本発明の一態様は、乳基質に食感を与えることを可能にする乳酸菌の組成物に關し、前記組成物は、細胞内に低減された濃度の金属イオンを有する乳酸菌を含み、及び/又は前記組成物は、低減された金属イオンの量を含む。

【0011】

そのような細胞は、以下のような異なる方法で得ることが出来ると考えられる：

・代替案A)：細胞が金属イオンを取り込まないように、又は低速でのみ金属イオンを取り込む、又は細胞が、完全に機能的なイオン結合タンパク質を合成できないような、細胞の遺伝子組換え、 20

・代替案B)：培地への金属イオンキレート剤の添加等によって金属イオンを含まない、又は低濃度の金属イオンを有する増殖培地における細胞の増殖、又は

・代替案C)：例えば、母細胞の突然変異処理（化学的変異原、又はUV光による処理を含む）によって得られる、突然変異細胞の単離。

【0012】

代替案A)に関して、本発明者達は、それらのイオン代謝において攪乱された（例えば、減少された、抑制された等）食感付与化LABの突然変異体が、発酵乳製品において、優れた食感を与えるという発見を記述する。

【0013】

第2の態様において、本発明は、LABで発酵された乳製品の粘度を高める方法に關し、前記方法は、還元鉄（esp Fe²⁺）及び/又はマンガン（esp Mn²⁺）含有量で乳基質を発酵させること、又は前記金属イオンの少なくとも1つが、部分的又は完全にLABに隔離された乳基質を発酵させることを含む。 30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1aは、バチルス、ストレプトコッカス・ゴルドニー（*Streptococcus gordonii*）及びCHCC9844由来のFurボックスのアライメントを示す。3株全てに見出されるヌクレオチドは、赤色で示され、バチルス及びCHCC9844との間で共通のヌクレオチドは、緑色で示され、S.ゴルドニーとの間で共通のヌクレオチドは、青色で示される。

【図1B】図1bは、S.サモフィルスCHCC9844におけるepsA遺伝子のプロモータ領域及び最初の部分を示す。想定されるfurボックスは、青色で示される。プロモータ領域の他の特徴が、図に示される。 40

【図2】図2は、食感付与突然変異体CHCC15712を用いた粘度試験を示す。粘度は、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定された。グラフは、3回の測定の平均を示す。

【図3】図3は、M17プロスにおける排出されたエキソポリサッカライドのモノサッカライド組成を示す。単一のモノサッカライドの濃度は、ppmで示される。

【図4】図4は、fur突然変異体KA509を用いた粘度試験を示す。粘度は、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定された。グラフは、3回の測定の平均を示す。 50

【図5】図5は、CHCC9844由来の4つの亜テルル酸塩(telurite)耐性突然変異体を用いた粘度試験を示す。粘度は、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定された。グラフは、3回の測定の平均を示す。

【図6】図6は、1mMEDTA有り及び無しでの乳中の粘度試験を示す。粘度は、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定された。グラフは、3回の測定の平均を示す。

【図7】図7a、7b、7cは、それぞれ、細胞内のFe、Mg、及びMnの濃度を示す。

【0015】

本特許明細書において引用された全ての文献は、その全体が、出典明記により本明細書に組み込まれる。

10

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、エキソポリサッカライド産生株S.サーモフィルスCHCC9844の突然変異体として単離されたS.サーモフィルス株CHCC15712で発酵させた乳が、ヨーグルト及びヨーグルトタイプ製品の食感付与特性に関連すると考えられている2つの重要な流動学的パラメータである、増加したせん断応力並びに増加したゲル硬度を示したという驚くべき発見に基づく。ホールピペットからの流出時間をモニターすることによって測定された粘度もまた、同様に増加した(実施例1参照)。

【0017】

CHCC9844及びCHCC15712からのEPSの単離株及び特徴付けは、CHCC15712についてのEPS産生の9%増加を示し、これは、粘度の増加とよく相関する(実施例2)。

20

【0018】

突然変異体CHCC15712を分析することで、本発明者達は、驚くべきことに、細胞が、CHCC9844と比較して異常な低濃度のFe²⁺及び他の金属イオンを含有することを明らかにした。本発明者達は、驚くべき発見の根底にある可能性があるメカニズムを調査し、CHCC9844のゲノム配列において、本発明者達は、EpsA遺伝子の上流領域、CHCC9844のepsオペロンの一部、Fur(第二鉄取り込み調節因子)ボックスに高い相同意を有する配列を同定した。これは、Furが、CHCC9844のEPSの発現の調節に関与していることを示す(図1A及び1B)。

【0019】

特定の理論や仮説に縛られることなく、EpsAの発現は、Furの制御下にあり、EpsAの抑制解除は、EPS産生の増加及び食感の増加をもたらすと考えられる。従って、二価金属の取り込みが損なわれている何れかの突然変異体は、正常な取り込みを有する母株と比較して、増加された食感を付与すると予想する。

30

【0020】

CHCC9844と比較したCHCC15712のDNAアレイ(発現マイクロアレイ)分析により、特異的鉄取り込み遺伝子カセット(Fatオペロン)が下方制御されたことが示された。fatABC遺伝子は、CHCC15712において4倍発現が低く、fatDは、CHCC9844と比較して2倍発現が低かった。

【0021】

上記代替案A)に関する調査

本発明者達は、鉄トランスポーターの下方制御が、細胞内のFe²⁺及びFe³⁺の濃度の低下をもたらし、これもまた、Fur調節因子のFurボックスへの結合の減少をもたらすと推測した。Furは、リプレッサーとして作用するため、Furの制御下にある遺伝子は、それ故、減少したFe^{2+ / 3+}濃度により抑制解除される。

40

【0022】

例えば二価金属イオンABC取り込み系(NRAMP)のような鉄の取り込みに関与する他の全ての遺伝子の下方制御もまた、より低い細胞内鉄濃度をもたらし、Fur制御を介して、食感を増加させる。

【0023】

50

前記仮説は、fur遺伝子が不活性化されているCHCC9844の遺伝子操作突然変異体を作製することによって検証された。食感に対する効果は、ピペット流出試験を用いて測定された。wt株CHCC9844は、24±1秒のピペット値を有したが、fur突然変異体KA509は、58%の増加に対して38±0秒と測定された（実施例3）。

【0024】

遺伝子発現に対するfur不活性化の効果もまた、DNAマイクロアレイを用いて評価された。鉄の取り込みに関する遺伝子fatABDCは、Furによって調節されることが知られている。KA509において、これらの遺伝子は、CHCC9844wt株と比較して、4倍下方制御された。KA509を10mMのFe²⁺の存在下で増殖させた場合、脂肪族遺伝子クラスターの発現に実質的な変化はなかった。反対に、母株CHCC9844を鉄の存在下で増殖させる場合、fatC及びfatD遺伝子が、4倍誘導された。

10

【0025】

上記代替案B)に関する調査

前記仮説は、金属キレート剤であるEDTAの存在下で、乳の酸性化実験を行うことによって検証された。EDTAの添加は、利用可能な鉄の量を減少させるはずであり、それ故、EpsAの脱抑制をもたらし、その結果、食感が増大する。実際に、乳に1mMのEDTAを加えると、CHCC15712で発酵させた乳の食感が、25%増加することが観察された（実施例5）。

【0026】

上記代替案C)に関する調査

CHCC9844由来の突然変異体が、鉄の取り込みに関する遺伝子の発現減少を示したという知見に基づいて、亜テルル酸塩耐性突然変異体が、CHCC9844から単離された。

20

【0027】

ピペット試験を用いた流出時間、及びこれにより測定された粘度は、亜テルル酸塩耐性突然変異体に関して増加した。47%の最も高い増加は、突然変異体9844-K2で観察された（実施例4）。

【0028】

この実験では、亜テルル酸塩耐性突然変異体の単離によって、さらに、eps陽性S.サモフィルス株の食感付与特性を高めることが可能であることが実証された。本発明は、当該実施形態も含む。

30

【0029】

上記の驚くべき発見に基づき、本発明は、第1の態様において、細胞内に全部で4200ppm（百万分率、mg/Kg乾燥重量）未満の全二価金属イオン、例えば4100ppm未満、4000、3000又は2000ppm未満の全二価金属イオンを含む、乳酸菌（LAB）等の細菌細胞に関する。そのような細菌細胞の興味深い実施形態は、以下の通りである：

- 合計で4200ppm未満、例えば4100ppm未満、4000ppm未満、3000ppm未満、2000ppm未満又は1000ppm未満のFe²⁺、Mg²⁺及びMn²⁺を含有するLAB。

- 4200ppm未満、例えば4100ppm未満、4000ppm未満、3000ppm未満、2000ppm未満又は1000ppm未満のMg²⁺を含有するLAB。

- 10ppm未満、例えば9ppm未満、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満のFe²⁺を含有するLAB。

40

- 6ppm未満、例えば、5.5ppm未満、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のMn²⁺を含有するLAB。

- 合計で16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺を含有するLAB。

- 凍結乾燥形態において、2000ppm未満の何れかの二価金属イオン、特にMgイオンを含有するLAB。

40

- 凍結乾燥形態において、4000ppm（w/w）未満の二価金属イオンを含有するLAB。

- 乾燥形態において、10ppm（w/w）未満、例えば、9ppm未満又は8ppm未満の鉄を含有するLAB。

50

- 凍結乾燥形態において、8ppm（w/w）未満の鉄を含有するLAB。

【0030】

本発明の第1の態様の細菌細胞は、乳基質を発酵させる際、乳基質に食感付与することが出来る。従って、さらに興味深い実施形態は、本発明の乳酸菌に関し、これは、乳に1m¹当たり10E8 CFU(コロニー形成単位)を接種した際、乳中で、約50Pa.s(例えば、60又は70Pa.s超)の粘度を生じ、37°で9.5%の還元脱脂粉乳中でバクテリウム属を16時間増殖させた後のせん断応力として測定される。

【0031】

さらに興味深い実施形態は、以下の通りである：

- 攪乱された二価金属イオン代謝(DMIM)を有する乳酸菌(LAB)。
- 攪乱された二価金属イオン代謝(DMIM)を有するLAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、DMIMにおける減少である、LAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、fur遺伝子の発現の変化によって引き起こされる、LAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、二価金属イオンの取り込みに関連する遺伝子の突然変異によって引き起こされる、LAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、mntH遺伝子の発現低下によって引き起こされる、LAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、fatc遺伝子又は鉄の取り込みに関与する何れか他の遺伝子の発現低下によって引き起こされる、LAB。
- 前記攪乱されたDMIMが、細菌が亜テルル酸塩に耐性があることによって引き起こされる、LAB。
- 前記二価金属イオンが、Fe²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Te²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺及びCu²⁺からなる群から選択される、LAB。
- 前記二価金属イオンが、Fe²⁺、Mg²⁺、及びMn²⁺からなる群から選択される、LAB。
- 前記二価金属イオンが、Fe²⁺である、LAB。
- 前記二価金属イオンが、Mn²⁺である、LAB。
- 突然変異誘発によって、遺伝子操作によって、及び/又は0.1% (w/v)未満の濃度の二価金属イオン(Fe等)を有する培地中での増殖によって得られた、LAB。
- ストレプトコッカス・サーモフィルス及びラクトバチルス・ブルガリカスからなる群から選択される種に属する、LAB。
- ストレプトコッカス・サーモフィルス種に属する、LAB。
- 亜テルル酸塩に耐性のある、LAB。
- ストレプトコッカス・サーモフィルスCHCC15712株(DSM25955)、又はこの株の突然変異体若しくは変異体。

10

20

30

【0032】

第2の態様において、本発明は、第1の態様のLABを含む組成物に関する。

【0033】

第3の態様において、本発明は、LABを含む組成物に関し、前記組成物は、金属イオンキレート剤(例えば、EDTA又はシデロフォア又はイオノフォア)を、好ましくは1ppm以上の濃度でさらに含む。

【0034】

第2及び第3の態様の興味深い実施形態は、以下の通りである。

40

- 種菌である、組成物。
- 少なくとも10E9 CFUの本発明のLABを含む組成物。
- 少なくとも10E11(10exp11)CFUの本発明のLABを含む組成物。
- 10E10 CFU～10E14 CFUの本発明のLABを含む組成物。
- 種菌として使用可能である、及び/又は凍結乾燥等の凍結又は乾燥形態である、組成物。
- 合計で4200ppm未満、例えば、4100ppm未満、4000ppm未満、3000ppm未満、2000ppm未満又は1000ppm未満の全二価金属イオンを含む組成物。
- 合計で4200ppm未満、例えば、4100ppm未満、4000ppm未満、3000ppm未満、2000ppm未満又は1000ppm未満のFe²⁺、Mg²⁺及びMn²⁺を含む組成物。

50

- 4200ppm未満、例えば、4100ppm未満、4000ppm未満、3000ppm未満、2000ppm未満又は1000ppm未満のMg²⁺を含む組成物。
- 10ppm未満、例えば、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満のFe²⁺を含む組成物。
- 6ppm未満、例えば、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のMn²⁺を含む、組成物。
- 合計で16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺を含む組成物。
- 2つの異なるLAB株を含む組成物。
- 2つの異なるLAB株が、異なる種に属する、組成物。

【0035】

第4の態様において、本発明は、本発明のLAB、本発明の株/細胞、又は本発明の組成物を用いて乳基質を発酵させることを含む、発酵乳製品/乳製品の製造方法に関する。 10

【0036】

第6の態様において、本発明は、本発明の方法によって、得られる発酵乳製品（例えば、ヨーグルト又はバターミルク）又はチーズ（例えば、フレッシュチーズ又はパスタフィラータ）等の乳製品に関する。当該乳製品は、果実濃縮液、シロップ、プロバイオティックス細菌培養物、着色剤、増粘剤、香味剤及び保存剤からなる群から選択される成分を任意で含み；及び/又は任意で、攪拌タイプ製品、又は飲用製品の形態である。

【0037】

別の態様において、本発明は、乳基質に接種した際に、以下：

- i) LAB株（母株）を提供する工程、
- ii) 遺伝子工学又は突然変異誘発によって、母株のfur遺伝子に突然変異を導入する工程、及び
- iii) 母株と比較して向上した食感付与特性を有する突然変異体をスクリーニングする工程、

を含む食感を付与するLAB株を製造する方法に関する。

【0038】

- 本発明の他の興味深い態様（請求態様）を以下に列挙する。
1. 10ppm（百万分率、mg/kg乾燥重量）未満、例えば9ppm未満、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満の鉄イオン（例えば、Fe²⁺）を含有する乳酸菌（LAB）。
 2. 6ppm（百万分率、mg/kg乾燥重量）未満、例えば5.5ppm未満、5.2ppm未満、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のマンガンイオン（例えば、Mn²⁺）を含有するLAB。
 3. 合計で16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、13ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺を含有する、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 4. 攪乱された二価金属イオン代謝（DMIM）を有する、上記請求態様の何れかに記載の乳酸菌（LAB）。
 5. 攪乱された二価金属イオン代謝（DMIM）を有する乳酸菌（LAB）。
 6. 前記攪乱されたDMIMが、減少したDMIMである、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 7. 前記攪乱されたDMIMが、fur遺伝子の変化した発現、例えば前記遺伝子の（部分的又は完全な）不活性化、前記遺伝子又はその一部の欠失及び/又は前記遺伝子への追加のDNAの挿入によって引き起こされる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。 40
 8. 前記攪乱されたDMIMが、ノックアウト突然変異等の二価金属イオンの取り込みに関連する遺伝子の変異によって引き起こされる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 9. 前記攪乱されたDMIMが、mntH遺伝子の発現の減少によって引き起こされる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 10. 前記攪乱されたDMIMが、fatc遺伝子又は鉄の取り込みに関与する何れか他の遺伝子の発現の減少によって引き起こされる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 11. 前記攪乱されたDMIMが、バクテリウム属（bacterium）が、亜テルル酸塩（tellurite）に耐性があることによって引き起こされる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
 12. 前記二価金属イオンが、Fe²⁺、Mg²⁺、及びMn²⁺からなる群、好ましくは、Fe²⁺、

10

20

30

40

50

及びMg²⁺の群から選択される、上記請求態様の何れかに記載のLAB。

13. 前記二価金属イオンが、Fe²⁺である、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
14. 前記二価金属イオンが、Mn²⁺である、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
15. 突然変異により、及び/又は遺伝子工学により得られた、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
16. 0.25 μg/g未満、例えば、0.2 μg/g未満のFe²⁺及びMn²⁺からなる群から選択される二価金属イオンの濃度を有する培地で増殖することによって得られる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
17. ラクトバチルス・ブルガリカス種 (species *Lactobacillus bulgaricus*) に属する、上記請求態様の何れかに記載のLAB。 10
18. ストレプトコッカス・サーモフィルス種 (species *Streptococcus thermophilus*) に属する、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
19. 例えば、向上したEPS産生を有する突然変異株又は変異株等のストレプトコッカス・サーモフィルスCHCC15712 (DSM25955)、又は当該株の突然変異株又は変異株。
20. 亜テルル酸塩に耐性である、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
21. 乳に1ml当たり10E8 CFUで接種した際、37℃で9.5%の還元脱脂粉乳におけるバクテリウム属の16時間後の増殖のせん断応力として測定される、乳中で、約50Pa.sより大きい(例えば、60又は70Pa.sより大きい)粘度を生じる、上記請求態様の何れかに記載のLAB。
22. 上記請求態様の何れかに記載のLAB (lactic acid bacterium) を含む組成物。 20
23. 種菌である、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
24. LABを含む組成物であって、前記組成物が、金属イオンキレート剤(例えば、EDTA)を、好ましくは1ppm以上濃度でさらに含む、組成物。
25. 1mg当たり少なくとも10E9 CFU(細胞形成単位 (cell forming unit))の前記LABを含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
26. 1mg当たり少なくとも10E11 CFUの前記LABを含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
27. 1mg当たり10E10 CFU～10E14 CFUの前記LABを含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
28. 凍結又は凍結乾燥等の乾燥形態である、上記請求態様の何れかに記載の組成物。 30
29. 10ppm未満、例えば9.5ppm未満、9ppm未満、8ppm未満、6ppm未満又は3ppm未満のFe²⁺を含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
30. 6ppm未満、例えば5.5ppm未満、5.2ppm未満、5ppm未満、4ppm未満又は2ppm未満のMn²⁺を含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
31. 16ppm未満、例えば、15ppm未満、14ppm未満、13ppm未満、10ppm未満又は7ppm未満のFe²⁺及びMn²⁺の合計量を含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
32. 少なくとも2種類、例えば少なくとも3種類、少なくとも5種類、又は少なくとも10種類の異なるLAB株を含む、上記請求態様の何れかに記載の組成物。
33. 少なくとも2種類の異なるLAB株が、異なる種に属する、上記請求態様の何れかに記載の組成物。 40
34. 乳製品(例えば、発酵乳(例えば、ヨーグルト)又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等)の製造方法であって、上記請求態様の何れかに記載のLAB、上記請求態様の何れかに記載の株、上記請求態様の何れかに記載の組成物を用いて、乳基質を発酵させることを含む、製造方法。
35. 乳製品(例えば、発酵乳(例えば、ヨーグルト)又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等)の製造方法であって、前記方法が、0.25 μg/g未満(例えば、0.20 μg/g未満又は0.15 μg/g未満等)のFe²⁺濃度を有する乳基質を、例えば、上記請求態様の何れかに記載のLABを用いて発酵させることを含む、製造方法。
36. 乳製品(例えば、発酵乳(例えば、ヨーグルト)又はチーズ)の製造方法であって、前記方法が、0.025 μg/g(例えば、0.020 μg/g未満又は0.015 μg/g未満)のMn²⁺の濃度を有する乳基質を、例えば、上記請求態様の何れかに記載のLABを用いて発酵させることを含む、製造方法。 50

度を有する乳基質を、例えば、上記請求態様の何れかに記載のLAB等のLABを用いて発酵させることを含む、製造方法。

37. 乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）の製造方法であって、活性furタンパク質を含まないLABを用いて乳基質を発酵させることを含む、製造方法。

38. 前記LABが、ストレプトコッカス・サーモフィルスの株である、上記請求態様の何れかに記載の方法。

39. 前記LABが、ラクトバチルス・ブルガリカスの株である、上記請求態様の何れかに記載の方法。

40. 上記請求態様の何れかに記載の方法によって得ることが出来る、例えば、発酵乳製品（例えば、発酵乳（例えば、ヨーグルト）又はチーズ、例えば、パスタフィラータ若しくはフレッシュチーズ等）等の乳製品。 10

41. 果実濃縮物、シロップ、プロバイオティック細菌培養物、着色剤、増粘剤、香味剤、及び保存剤からなる群から選択される成分を任意で含み；及び/又は任意で搅拌タイプ製品、セットタイプ製品、又は飲用製品の形態である、上記請求態様の何れかに記載の乳製品。

45. 乳基質に接種した際、食感を与える（又は母株と比較して増加した食感を与える）LAB株の製造方法であって、

- LAB株（母株）の前記fur遺伝子に突然変異を導入すること、すなわち、遺伝子工学又は突然変異誘発によって導入すること、及び 20

- 母株と比較して向上した食感特性を有する突然変異株をスクリーニングすること、を含む、製造方法。

46. LAB株（EPSを産生することができる）のEPS産生を向上させるための方法であって、前記方法が、株の接種前、接種中又は接種後に培地（例えば、産生培地又は乳基質）からFe2+イオンの除去を含む、方法。

47. 結果として生じる培地が、0.25 μg/g未満（例えば0.20 μg/g未満又は0.15 μg/g未満等）のFe2+濃度未満のFe2+濃度を有する、上記請求態様の何れかに記載の製造方法。

48. LAB株のEPS産生を向上させるための方法であって、前記方法が、株の接種前、接種中又は接種後に培地からMn2+イオンの除去をさらに含む、上記請求態様の何れかに記載の方法。 30

49. 結果として生じる培地が、0.025 μg/g未満（例えば、0.020 μg/g未満又は0.015 μg/g未満）のMn2+濃度を有する、LAB株のEPS産生を向上させる、上記請求態様の何れかに記載の方法。

50. 増殖が、少なくとも5時間行われる、上記請求態様の何れかに記載の方法。

51. 前記fur遺伝子の不活性化（部分的又は完全な）を含む、LAB株（EPS産生可能）の製造方法。

【 0 0 3 9 】

定義

本明細書で使用される際、用語「乳酸菌（lactic acid bacterium）（略してLAB）」は、主に產生される酸として乳酸、酢酸及びプロピオン酸を含む、酸の產生を伴って糖を発酵させるグラム陰性、微好気性又は嫌気性細菌を指す。工業的に最も有用な乳酸菌は、ラクトコッカスspp. (Lactococcus spp.)、ストレプトコッカスspp. (Streptococcus spp.)、ラクトバチルスspp. (Lactobacillus spp.)、ロイコノストックspp. (Leuconostoc spp.)、シユードロイコノストックspp. (Pseudoleuconostoc spp.)、ペディオコッカスspp. (Pediococcus spp.)、ブレビバクテリウムspp. (Brevibacterium spp.)、エンテロコッカスspp. (Enterococcus spp.)及びプロピオニバクテリウムspp. (Propionibacterium spp.)を含む「ラクトバチルス目 (Lactobacillales)」の内で見出される。さらに、厳密な嫌気性細菌、ビフィドバクテリア、すなわち、ビフィドバクテリウムspp. (Bifidobacterium spp.)の群に属する乳酸菌は、一般に乳酸菌の群に含まれる。これらは、単独又は他の乳酸菌と組み合わせて食品の発行の培養物として頻繁に使用される。ラクト 40

50

バチルスsp.種及びストレプトコッカス・サーモフィルス種の細菌を含む乳酸菌は、通常、バルクスターの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、例えば発酵乳製品の生産用の発酵容器若しくはバットへの直接接種を意図した、いわゆる（ダイレクトバットセット（Direct Vat Set）（DVS））培養物として、乳業産業に供給される。そのような培養は、一般に「種菌（starter culture）」又は「スター（starter）」と称される。一部の乳業においては、培養物が乳等に接種する前にその場で増殖する「バルクスター」も採用される。

【0040】

本明細書において、用語「乳基質（milk substrate）」は、本発明の方法に従って発酵に供することが出来る生及び/又は加工された何れかの材料であり得る。従って、有用な乳基質としては、限定されないが、乳又は例えば全脂肪又は低脂肪乳、脱脂乳、バターミルク、還元乳粉末、コンデンスマルク、粉乳、ホエー、ホエー透過物、乳糖、乳糖の結晶化からの母液、濃縮ホエータンパク質、又はクリーム等のタンパク質を含む乳様製品の何れかの溶液/懸濁液を含む。明確に、乳基質は、何れかの哺乳動物、例えば実質的に純粋な哺乳動物の乳、又は還元乳粉末に由来し得る。好ましくは、乳基質中のタンパク質の少なくとも一部は、カゼイン又はホエータンパク質等の乳中に天然に存在するタンパク質である。しかしながら、タンパク質の一部は、乳中に天然には存在しないタンパク質であり得る。発酵の前に、乳基質は、当該分野で公知の方法に従って、均質化及び低温殺菌され得る。

【0041】

用語「乳（milk）」は、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー又はラクダ等の何れかの哺乳動物を搾乳することによって得られる乳状分泌物として理解される。好ましい実施形態において、乳は、牛乳である。用語「乳」は、豆乳等の植物材料で作られた乳も含む。任意で、乳は、例えば酸（クエン酸、酢酸又は乳酸等）の添加によって酸性化されるか、又は例えば水と混合される。乳は、生の状態でもよく、例えば、濾過、殺菌、低温殺菌、均質化等によって加工され得、又は還元乾燥乳であり得る。本発明による「ウシの乳（bovine milk）」の重要な例は、低温殺菌牛乳である。乳は、細菌の接種の前、最中及び/又は後に酸性化、混合又は加工され得る。

【0042】

牛乳は、100g当たり約0.03mg = 0.3 μg/g = 0.3ppmの濃度で鉄を含む。牛乳は、0.03 μg/g = 0.03ppmの濃度でマンガンを含む。

【0043】

本明細書において、用語「突然変異体」は、例えば、遺伝子工学、放射線及び/又は化学的処理、及び/又は選択、適応、スクリーニング等の手段によって本発明の株から誘導された株として理解されるべきである。当該用語はまた、ファージ硬化突然変異体（phage hardened mutant）等のファージ耐性が向上した又は変更された突然変異体を含む。突然変異体は、機能的に同一の突然変異体、例えば、母株と実質的に同じ、又は向上した特性（例えば、収量、粘度、ゲル硬度、口腔コーティング、風味、ポスト酸性化（post acidification）、酸性化速度、及び/又はファージの堅牢性に関して）を有する変異体であることが好ましい。本明細書において、本発明の突然変異体は、EPS産生に関して同一又は向上した特性を有し、及び/又は乳基質が発酵された際、粘性を生じる突然変異体が好ましい。そのような突然変異体は、本発明の一部である。特に、用語「突然変異体」は、本発明の株を、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）等の化学的変異原による処理、UV光又は自然に発生する突然変異体を含む何れかの現在用いられている突然変異処理に供することによって得られる株を指す。突然変異体という用語は、亜テルル酸塩耐性突然変異体も含む。亜テルル酸塩耐性突然変異体という用語は、0.1mM K₂TeO₃を含むM17アガープレートで増殖する（コロニーを形成する）ことが可能な突然変異体と理解される。突然変異体は、いくつかの突然変異誘発処理に供されてもよいが（单一の処理は、1つの突然変異誘発工程とそれに続くスクリーニング/選択工程と理解されるべきである）、現在のところ、1000以下、100以下、20以下、10

10

20

30

40

50

以下、又は5以下の処理が行われることが好ましい。現在好ましい変異体において、細菌ゲノム中の5%未満、又は1%未満、さらには0.1%未満のヌクレオチドが、母株と比較して(置換、挿入、欠失又はそれらの組合せ等により)変化している。

【0044】

本明細書において、用語「変異体」は、本発明の株と機能的に同等な株、例えば、粘度、ゲル硬度、口腔コーティング、ポスト酸性化、酸性化速度、及び/又はファージ堅牢性に関して等の実質的に同一、又は向上した特性を有する株として理解されるべきである。適切なスクリーニング技術を用いて同定され得るそのような変異体は、本発明の一部である。

【0045】

遺伝子の不活性化とは、その遺伝子(そのプロモータ及び他の調節領域を含む)が、その遺伝子又はその産物がその活性を(部分的又は完全に)失うように改変されたことを意味する。不活性化は、例として、その遺伝子の欠失(部分的又は完全に)、その遺伝子の突然変異(例えば、遺伝子工学又は突然変異誘発による)、ノックアウト突然変異の供給、例えば、ストップコドン等の挿入等のフレームシフトの導入、であり得る。

【0046】

本発明を説明する明細書部分において(特に以下の特許請求の範囲の部分において)、用語「a」及び「an」及び「the」並びに類似の指示対象の使用は、特に定めが無い限り、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈され、そうでなければ、本明細書に示されるか、又は明細書の内容中に明らかに否定される。用語「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」及び「含有する(containing)」は、特に定めが無い限り、制限の無い用語として解釈されるべきである(すなわち、「を含むが、これに限定されない」の意味)。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段の指定が無い限り、単にその範囲内に含まれる各別々の値を個々に指す簡潔な方法として役立つことを意味しており、各別々の値は、本明細書に個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書に別段の定めがない限り又は内容によって明らかに矛盾しない限り、何れかの適切な順序で実行することが出来る。本明細書で提供される一切の例、又は例示的な専門語(例えば、「例えば等(such as)」)の使用は、単に本発明をより明らかにすることを意図しており、特に請求の無い限り本発明の範囲を制限しない。本明細書中のいかなる専門語も、何れかの特許請求されていない要素を本発明の実施に必須であると示すものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0047】

実験

実施例1: 従来の突然変異誘発による攪乱されたイオン代謝を有するストレプトコッカス・サーモフィルス突然変異体の単離

【0048】

S.サーモフィルスCHCC15712は、エキソポリサッカライド産生株であるS.サーモフィルスCHCC9844の突然変異体として単離された。CHCC15712で発酵された乳は、ヨーグルトタイプ製品の食感付与特性に関連すると考えられる2つの重要なレオロジーパラメータである、ゲル硬度の増加と同様にせん断応力の増加を示した。ホールピペットからの流出時間をモニターすることによって測定された粘度も同様に増加した。

【0049】

粘度は、乳に1ml当たり10E8 CFUで接種した際、37℃、9.5%還元脱脂乳中でバクテリウム属を16時間増殖させることにより調製された25mlの発酵乳で満たされた、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定される。

【0050】

試料のレオロジー特性は、C25同軸測定システムを備えたレオメーター(StressTech、Reologica Instruments、スウェーデン)で評価された。粘度測定試験は、21段階で0.27~3001/秒まで変化するせん断速度で行われた。せん断速度を増加させた後に減少させ、せ

10

20

30

40

50

ん断応力及び見かけの粘度の上方及び下方曲線を記録した。遅延時間と統合時間は、それぞれ、5秒及び10秒であった。さらなる分析のために、300 s-1でのせん断応力が選択された。

【0051】

レオメーターの結果は、CHCC15712が、CHCC9844と比較して20%増加したせん断応力及びゲル硬度を有することを示した。

【0052】

粘度はまた、25mlのホールピペットからの流出時間を計算することによって測定された。CHCC15712では、野生型株CHCC9844と比較して9%の粘度の増加が測定された(図2参照)。流出時間は、35秒から38秒に増加し、これは、9%の粘度の増加に関連する。

10

【0053】

実施例2: M17プロス中のエキソポリサッカライドの產生

【0054】

CHCC9844及びCHCC15712の2つの株を、1%ラクトースを含むM17プロス中で37 16時間増殖させた。細胞を遠心分離によって除去し、EPSを、96%トリクロロ酢酸溶液(TCA)を用いてタンパク質を沈殿させ、その後96%エタノールを用いてEPSを沈殿させることによって上清から抽出した。次いで、EPS試料は、4で少なくとも24時間MilliQ水に対して透析された(Slide-A-lyzer dialysis cassette、0.5~3ml、MWCO 10000、Thermo scientific)。次いで、EPSは、4M TFA(トリフルオロ酢酸)で加水分解され、HPLCによりモノサッカライドの組成及び量が分析された。

20

【0055】

HPLC分析は、CHCC9844及びCHCC15712のEPS中にラムノース、ガラクトサミン、ガラクトース及びマンノースの存在を明らかにした(図3参照)。炭水化物ラムノース、ガラクトサミン、ガラクトース及びグルコースの濃度は、増加するように見えた。合計でEPS炭水化物は、13%増加した(1868ppmから2114ppm)。この数は、CHCC15712について測定された粘度の増加とよく関連する(実施例1)。

【表1】

	ラムノース	ガラクトサミン	グルコサミン	ガラクトース	グルコース	マンノース	合計
CHCC9844	174	238	28,7	421,4	511,35	495	1868
CHCC15712	210	305	17	482	597	502	2114

30

【0056】

実施例3: 食感形成が増加したGMO fur不活性化突然変異体

【0057】

KA509株は、fur遺伝子が遺伝的に不活性化されているCHCC9844の突然変異体である。これは、CHCC9844 fur遺伝子の2~385の塩基を含有する内部フラグメントを有するプラスミドベクターの単一交差によって行われた。得られた突然変異体は、485bp長のfur CDS(コドン配列)の最初のヌクレオチドの後に挿入されたベクターを有する。これは、遺伝子の破壊をもたらし、それによって不活性化される。正しい挿入は、ベクター中に配置された1つのプライマー及び内部フラグメントのfur遺伝子の下流に配置された1つを用いてPCRによって確認された。

40

【0058】

食感に対する効果は、ピペット流出試験を用いて確認された。wt株CHCC9844は、24±1秒のピペット値を示したが、fur変異体は、58%の増加に相当する38±0秒の値が測定された(図4)。

【0059】

遺伝子発現に対するfur不活性化の効果はまた、DNAマイクロアレイを用いて評価された。KA509において、fatABDC遺伝子は、CHCC9844wt株と比較して4倍下方制御された。KA509を、10mMのFe2+の存在下で増殖させた場合、fat遺伝子クラスターの発現の実質的な変化

50

はなかった。反対に、母株CHCC9844を鉄の存在下で増殖させると、*facC*及び*fatD*遺伝子が4倍誘導された。

【0060】

実施例4: 増加した粘度パラメータを有するS. サーモフィルスCHCC9844からの亜テルル酸塩耐性突然変異体の単離

【0061】

CHCC9844からの突然変異体が、鉄の取り込みに関連する遺伝子の発現の現象を示したという発見に基づき、亜テルル酸塩耐性突然変異体が、CHCC9844から単離された。

【0062】

突然変異体は、0.1mMのK2TeO3を含有するM17アガープレート上で直接スクリーニングされた。安定な亜テルル酸塩耐性の表現型を示す、4つの突然変異体を純化した。4つのCHCC9844突然変異体は、乳中1%の0.1mMのK2TeO3を含有するM17—晩培養物を摂取し、37℃で24時間インキュベートした。次いで、発酵乳の粘度は、25mLピペットからの流出時間を測定することによって決定された。流出時間が長くなればなるほど、試験培地の粘度は高くなる。各株について流出時間は、3回の測定の平均として示される(図5参照)。

10 【0063】

流出時間、これによる粘度は、4つの亜テルル酸塩耐性突然変異体について増加した。47%の最も高い増加は、突然変異体9844-K2で測定された。

【0064】

この実験において、亜テルル酸塩耐性突然変異体の単離によって、さらに、eps陽性S. サーモフィルス株の食感付与特性を高めることができることが実証された。

【0065】

実施例5: 食感に対する金属キレート剤(EDTA)の添加の効果

【0066】

鉄濃度の減少が粘度を改変するという仮説は、金属キレート剤であるEDTAの存在下で乳の酸性化を行うことによって試験された。EDTAの添加は、利用可能な鉄の量を減少させるはずであり、それ故、EpsAの脱抑制をもたらし、その結果、食感が増加する。実際、乳への1mMのEDTAの添加は、CHCC15712の食感を25%増加させることができることが観察された(図6)。

【0067】

実施例6: 二価金属イオンの含有量を測定する方法

【0068】

攪乱された二価金属イオン代謝を有しないストレプトコッカス・サーモフィルスの株は、細胞内二価イオン濃度の含有量について分析されている。

【0069】

細胞内イオン濃度の決定のために、細胞をM17-2%ラクトース中で一晩増殖させた。

【0070】

5000rpmで10分間、50mLの遠心分離後、細胞は、50mLのM17-2%ラクトース培地で洗浄された。全てのチューブを、5000rpmで10分間遠心分離し、上清を捨て、次いで細胞は、5mLのPBS緩衝液(1リットルの緩衝液中、10gのChelexで一晩処理したもの)で洗浄された。全チューブは、5000rpmで10分間遠心分離され、次いで5mLのPBS緩衝液で洗浄され、5000rpmで10分間遠心分離され、1mLのPBS緩衝液中で洗浄/再懸濁され、2mLのエッペンドルフチューブに移された。次にチューブは、15,000×gで15分間遠心分離され、上清が可能な限り捨てられた。

【0071】

チューブは、RT(室温)でスピードバック中、一晩乾燥された。全てのペレットは秤量された。

【0072】

秤量後、0.1%Triton X-100を含む200μLの濃硝酸(65%)を加え、95℃で10分間チューブを振盪し、その後、チューブを20秒間ボルテックスしてペレットを可溶化した。

【0073】

50

20

40

50

ボルテックスした後、チューブを15,000×gで5分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。

【0074】

試料の金属イオン濃度は、ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析）によって決定された。

【0075】

結果（図7a、7b及び7c参照）は、細胞の乾燥重量1kg当たりのmg単位のイオン濃度として表される。従って、本内容の前後関係において、用語ppm（百万分率）は、細胞質の乾燥重量Kgあたりに測定されるmgイオンとして理解されるべきである。

【0076】

本発明を実施するために本発明者達が知っている最良の形態を含み、本発明の好ましい実施形態を本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の説明を読むことによって当業者に明らかになるだろう。本発明者達は、当業者がそのような変形を適切に使用することを期待し、及び本発明者達は、本明細書に具体的に記載されたものとは別 の方法で本発明を実施することを意図する。従って、本発明は、適用法律によって許容されるように、本明細書に添付の特許請求の範囲に列挙されている課題の全ての変形形態及び均等物を含む。さらに、そのすべての可能な変形形態における上記の要素の何れかの組み合わせは、本明細書中に別段の定めが無い限り又は前後関係によって明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

【0077】

寄託及びエキスパートソリューション（expert solution）

ストレプトコッカス・サーモフィルスCHCC15712株は、2012年4月27日に、受託番号DSM25955としてDSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany）に寄託された。

CHCC4895は、2007年3月29日に、受託番号DSM19242としてDSMZに寄託された。

CHCC8833は、2006年1月11日に、受託番号DSM17876としてDSMZに寄託された。

寄託は、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。

出願人は、寄託された微生物の試料が、出願人によって承認された専門家のみに利用可能にされることを要求する。

10

20

【図1A】

FURボックス パチルス GATAATGATAAT CATTATC
 FURボックス S. ゴルドニー GCTATAGAAAAT GATAGTT
 FURボックス CHCC9844 TT TGAAAAAAAT GACAATT

Fig. 1A

【図1B】

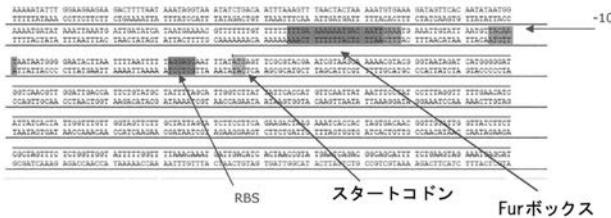


Fig. 1B

【図2】

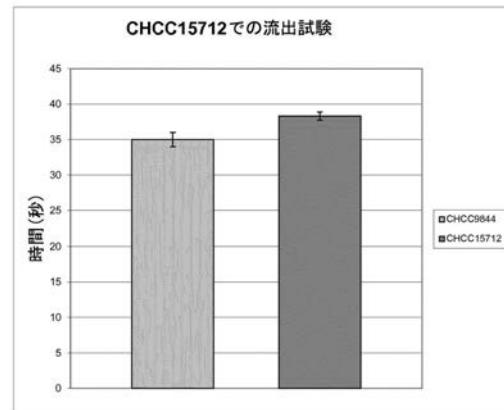


Fig. 2

【図3】

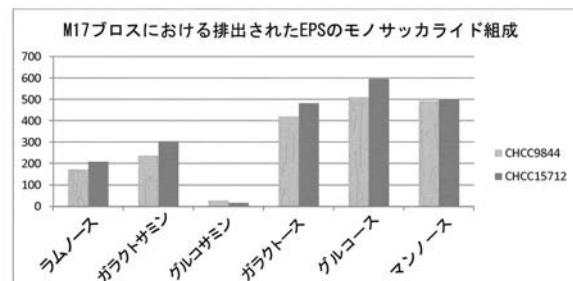


Fig. 3

【図4】

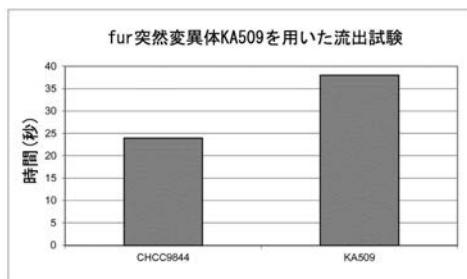


Fig. 4

【図5】

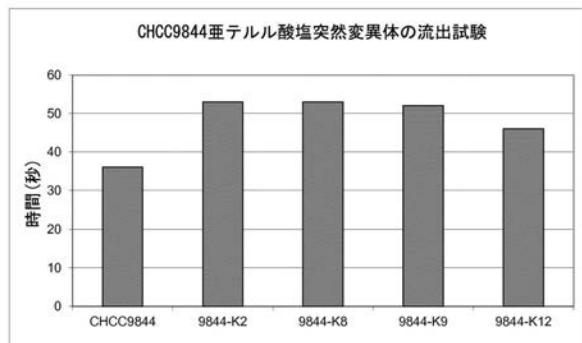


Fig. 5

【図6】

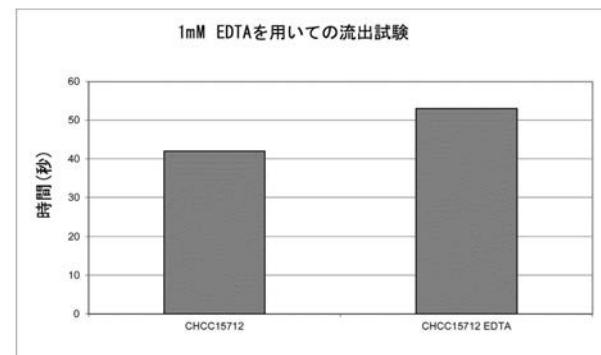


Fig. 6

【図7a】

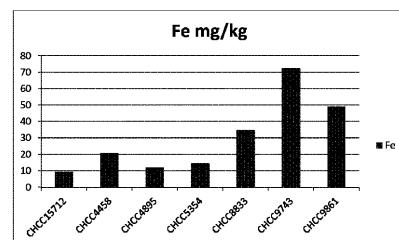


Fig. 7a

【図 7 b】

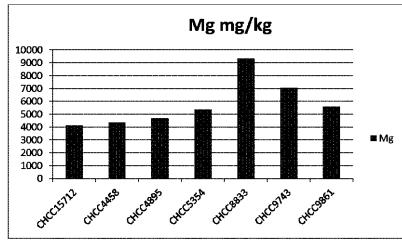


Fig. 7b

【図 7 c】

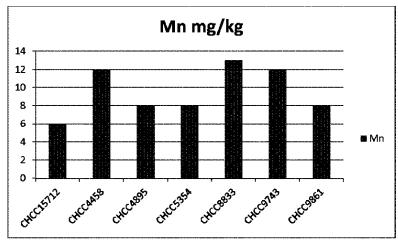


Fig. 7c

【配列表】

2019531713000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2017/071352						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N1/20 A23C9/123 C07K14/315 ADD. C12R1/46								
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) C12R C07K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> L. HERVE-JIMENEZ ET AL: "Postgenomic Analysis of <i>Streptococcus thermophilus</i> Cocultivated in Milk with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 7, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2062-2073, XP055422417, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01984-08 abstract page 2065, right-hand column, paragraph 5 - page 2067, left-hand column, paragraph 1 page 2071, right-hand column, paragraph 3 - page 2072, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1,3,4,6, 7,12,13, 16-18, 20-23, 25-34</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	L. HERVE-JIMENEZ ET AL: "Postgenomic Analysis of <i>Streptococcus thermophilus</i> Cocultivated in Milk with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 7, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2062-2073, XP055422417, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01984-08 abstract page 2065, right-hand column, paragraph 5 - page 2067, left-hand column, paragraph 1 page 2071, right-hand column, paragraph 3 - page 2072, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-/	1,3,4,6, 7,12,13, 16-18, 20-23, 25-34
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	L. HERVE-JIMENEZ ET AL: "Postgenomic Analysis of <i>Streptococcus thermophilus</i> Cocultivated in Milk with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 7, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2062-2073, XP055422417, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01984-08 abstract page 2065, right-hand column, paragraph 5 - page 2067, left-hand column, paragraph 1 page 2071, right-hand column, paragraph 3 - page 2072, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-/	1,3,4,6, 7,12,13, 16-18, 20-23, 25-34						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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								
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 24 November 2017		Date of mailing of the international search report 23/01/2018						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sonnerat, Isabelle						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/071352

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. SIEUWERTS ET AL: "Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ", <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , vol. 76, no. 23, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 7775-7784, XP055282830, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01122-10 abstract page 7782, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 -----	1,3,4,6, 7,12,13, 16-18, 20-23, 25-34
X	M. S. TURNER ET AL: "Inactivation of an Iron Transporter in <i>Lactococcus lactis</i> Results in Resistance to Tellurite and Oxidative Stress", <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , vol. 73, no. 19, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 6144-6149, XP055427707, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00413-07 abstract page 6146, right-hand column page 6148, right-hand column, paragraph 2 -----	1,3,4,6, 7,11-18, 20-23, 25-34
X	J. M. BRUNO-BARCENA ET AL: "Role of Antioxidant Enzymes in Bacterial Resistance to Organic Acids", <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , vol. 76, no. 9, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 2747-2753, XP055329035, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02718-09 abstract page 2749, left-hand column, paragraph 3 -----	1,12,13, 15,16,18
X	WEINBERG E D: "The <i>Lactobacillus</i> anomaly: total iron abstinence", <i>PERSPECTIVES IN BIOLOGY AND MEDICINE</i> , UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, US, vol. 40, no. 4, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 578-583, XP009501662, ISSN: 0031-5982, DOI: 10.1353/PBM.1997.0072 the whole document -----	1,12,13
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/071352

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ARCHIBALD F: "MANGANESE ITS ACQUISITION BY AND FUNCTION IN THE LACTIC-ACID BACTERIA", CRITICAL REVIEWS IN MICROBIO, CRC PRESS, vol. 13, no. 1, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 63-109, XP009146235, ISSN: 1040-841X, DOI: 10.3109/10408418609108735 abstract -----	1,12,13
A	WO 2004/085607 A2 (RHONE POULENC CHIMIE [FR]; HORVATH PHILIPPE [FR]; MANOURY ELISE [FR];) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document -----	1,3,4,6, 7,11-18, 20-23, 25-34
A	WO 2011/026863 A1 (CHR HANSEN AS [DK]; JANZEN THOMAS [DK]; CHRISTIANSEN DITTE ELLEGAARD []) 10 March 2011 (2011-03-10) the whole document -----	1,3,4,6, 7,11-18, 20-23, 25-34
A	Esteban Garate ET AL: "Distribution of Fur family of transcriptional regulators in species belonging to the Lactobacillales order", 1 April 2012 (2012-04-01), XP055427269, Retrieved from the Internet: URL: https://www.researchgate.net/profile/Angelica_Reyes-Jara/publication/266159271_Distribution_of_Fur_family_of_transcriptional_regulators_in_species_belonging_to_the_Lactobacillales_order/links/54c156a00cf2d03405c53693/Distribution-of-Fur-family-of-transcriptional-regulators-in-species-belonging-to-th [retrieved on 2017-11-21] the whole document -----	1,3,4,6, 7,11-18, 20-23, 25-34
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/071352

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 3, 4, 6, 7, 11-18, 20-23, 25-34 (all partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2017/071352

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3, 4, 6, 7, 11-18, 20-23, 25-34(all partially)

Lactic acid bacterium which contains less than 10 ppm of iron ions and which has a perturbed divalent metal ion metabolism caused by a changed expression of the fur gene.

2. claims: 1, 3, 4, 6, 8, 11-18, 20-23, 25-34(all partially)

Lactic acid bacterium which contains less than 10 ppm of iron ions and which has a perturbed divalent metal ion metabolism caused by a mutation in a gene related to the uptake of divalent metal ion.

3. claims: 1, 3, 4, 6, 9, 11-18, 20-23, 25-34(all partially)

Lactic acid bacterium which contains less than 10 ppm of iron ions and which has a perturbed divalent metal ion metabolism caused by reduced expression of an mmnH gene.

4. claims: 1, 3, 4, 6, 10-18, 20-23, 25-34(all partially)

Lactic acid bacterium which contains less than 10 ppm of iron ions and which has a perturbed divalent metal ion metabolism caused by a changed expression of the falc gene.

5. claims: 2(completely); 3, 4, 6-18, 20-23, 25-34(partially)

Lactic acid bacterium which contains less than 6 ppm of manganese ions.

6. claims: 5(completely); 6-18, 20-23, 25-34(partially)

Lactic acid bacterium which has a perturbed divalent metal ion metabolism.

7. claims: 19(completely); 20-23, 25-34(partially)

Streptococcus thermophilus CHCC15712 (DSM25955).

8. claims: 24(completely); 25-34(partially)

Composition comprising a lactic acid bacterium and a metal ion chelator.

International Application No. PCT/ EP2017/ 071352

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. claims: 35(completely); 38-41(partially)

Method for producing a dairy product comprising fermenting a milk substrate having a Fe²⁺ concentration below 0.25 microg/g with a lactic acid bacterium.

10. claims: 36(completely); 38-41(partially)

Method for producing a dairy product comprising fermenting a milk substrate having a Mn²⁺ concentration below 0.025 microg/g with a lactic acid bacterium.

11. claims: 37, 45, 51(completely); 38-41, 47-50(partially)

Method for producing a lactic acid bacterium strain that provides texture when inoculated into a milk substrate comprising introducing a mutation in the fur gene of a lactic acid bacterium strain and screening for mutants which have improved texturizing properties compared to the parent strain; method for production of a LAB strain comprising the inactivation of the fur gene; use of a LAB which does not contain an active fur protein for the production of a dairy product.

12. claims: 46(completely); 47-50(partially)

Method for improving the EPS production of a lactic acid bacterium strain comprising the removal of Fe²⁺ ions from the medium before, during or after inoculation with the strain.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/071352

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004085607	A2 07-10-2004	AR 043607 A1 AU 2004223691 A1 CN 1761752 A CN 102409004 A DK 1604025 T3 EP 1604025 A2 ES 2329470 T3 FR 2852604 A1 JP 4669835 B2 JP 2006520590 A NZ 542597 A RU 2376367 C2 US 2006240539 A1 WO 2004085607 A2	03-08-2005 07-10-2004 19-04-2006 11-04-2012 02-11-2009 14-12-2005 26-11-2009 24-09-2004 13-04-2011 14-09-2006 28-03-2008 20-12-2009 26-10-2006 07-10-2004
WO 2011026863	A1 10-03-2011	BR 112012004706 A2 CN 102695420 A DK 2473058 T3 EA 201270351 A1 EP 2473058 A1 ES 2644220 T3 JP 5944824 B2 JP 2013503604 A KR 20120073238 A MX 344042 B US 2012164275 A1 US 2017298457 A1 WO 2011026863 A1	08-09-2015 26-09-2012 18-09-2017 30-08-2012 11-07-2012 28-11-2017 05-07-2016 04-02-2013 04-07-2012 02-12-2016 28-06-2012 19-10-2017 10-03-2011

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 2 3 C	9/133	(2006.01)	A 2 3 C 9/133
A 2 3 C	9/137	(2006.01)	A 2 3 C 9/137
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N 15/31

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, G, T, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許序注:以下のものは登録商標)

1. TRITON

(72)発明者 パトリク デークス

デンマーク国, 3080 ティクーブ, スーゴーズバイ 1

(72)発明者 トマス ヤンセン

デンマーク国, 2700 ブレンスホイ, ビューバンゲン 4

(72)発明者 キム イブ サアアンスン

デンマーク国, 3520 ファーロム, ビーレベクブンゲ 6 6

F ターム(参考) 4B001 AC06 AC31 BC01 EC04

4B065 AA30X AA49X AB01 AB10 AC14 AC20 BA02 BB24 BD22 CA22
CA42 CA60