

(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
2016 年 7 月 28 日(28.07.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/117489 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01) *A61Q 13/00* (2006.01)
A23L 27/10 (2016.01) *C12P 1/02* (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01) *C12P 7/62* (2006.01)
A61K 36/062 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/051232
- (22) 国際出願日: 2016 年 1 月 18 日(18.01.2016)
- (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 2015-008129 2015 年 1 月 19 日(19.01.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社ヤクルト本社(KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 伊澤 直樹(IZAWA, Naoki); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 工藤 美有紀(KUDO, Miyuki); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 曽根 俊郎(SONE, Toshiro); 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT

OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CULTURE PRODUCT OF MICROORGANISM BELONGING TO THE GENUS *WICKERHAMOMYCES*

(54) 発明の名称: ウィッカーハモマイセス属微生物培養物

(57) Abstract: Provided is a culture product that contains a large amount of ethyl benzoate and has a more delicate and fresh fruit-like odor than chemically synthesized products. The culture product is obtained by culturing a microorganism belonging to the genus *Wickerhamomyces* in a milk component-containing medium.

(57) 要約: 安息香酸エチルを高含有し、化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の香りを有する培養物の提供。 ウィッカーハモマイセス属に属する微生物を乳成分含有培地で培養して得られる培養物。



WO 2016/117489 A1

明 細 書

発明の名称：ウィッカーハモマイセス属微生物培養物

技術分野

[0001] 本発明は、良好な香気を有する培養物及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 従来、種々の香気成分を生産する酵母、例えばサッカロマイセス・セレビシエ等を用いて、良好な香気を有する培養物を得る方法が知られており、その培養物は飲食品として利用されている（特許文献１～３）。

[0003] 香気成分の一つである安息香酸エチルは化学的には安息香酸とエタノールから合成することができる。この化合物はスターフルーツの香気成分の一つとして知られており、産業的には、果実の香りの人工香料として利用されている。香気成分として安息香酸エチルを含有するサッカロマイセス・セレビシエを用いた培養物も知られているが、その含有量は０．００６～０．００９ppmと少ないものであった（非特許文献１）。

[0004] また、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリ（*Wickerhamomyces pijperi*）は、*Pichia pijperi*から再分類された酵母の一種であり、非特許文献２にはこの酵母をyeast extract-mannitol培地、 yeast-peptone-dextrose（YPD）培地で培養したことが記載されているが、得られた培養物の特性は不明であり、乳成分含有培地で培養できること及びその培養物の香気についても全く知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献１：特開平５－４９４６５号公報

特許文献２：特開２００１－１０３９５９号公報

特許文献３：特開２０１２－５５２８６号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献１：Journal of the institute of Brewing, 116, 190-196, 2010

非特許文献2 : Microbiology, 155, 3142-3148, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の安息香酸エチル等の香気成分の化学合成品は香気が単調であり、香料用組成物として必ずしも満足できるものではなかった。このため、化粧品や飲食品、医薬品に利用可能であり、化学合成品よりも嗜好性に優れた香りを有し、香料用組成物として利用可能な組成物を提供することが求められていた。また、フルーツ様の香りを好む消費者も多く、フルーツ様の新規な香りを提供することが求められていた。

[0008] 本発明の課題は、香料用組成物、化粧品、飲食品および医薬品等に利用することができる新規な組成物であって、安息香酸エチルを多量に含有し、安息香酸エチルの化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の香りを有する組成物及びその利用を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] そこで本発明者は、良好な香気を有する組成物を開発すべく種々検討したところ、全く意外にも、ウィッカーハモマイセス属の微生物を、乳成分を含有する培地で培養した際に、香気成分として知られている安息香酸エチルを多量に含有し、安息香酸エチルの化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の香気を有する培養物が得られ、当該培養物は香料用組成物、化粧品、飲食品、医薬品等に用いることができる培養物として有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔10〕を提供するものである。

[0011] 〔1〕ウィッカーハモマイセス属に属する微生物を乳成分含有培地で培養して得られる培養物。

〔2〕乳成分含有培地が、ホエイ含有培地である〔1〕記載の培養物。

〔3〕ウィッカーハモマイセス属に属する微生物が、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリである〔1〕又は〔2〕記載の培養物。

〔4〕ウィッカーハモマイセス属に属する微生物が、ウィッカーハモマイセ

ス・ピジューペリ NBRC 1290 及び／又はウィッカーハモマイセス・ピジューペリ NBRC 1887 である〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の培養物。

〔５〕 乳成分含有培地が、さらに安息香酸及び／又はその塩を含有するものである〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の培養物。

〔６〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養物を含有する香料用組成物。

〔７〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養物を含有する化粧品。

〔８〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養物を含有する飲食品。

〔９〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養物を含有する医薬品。

〔１０〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の培養物を配合することを特徴とする化粧品、飲食品又は医薬品への香り付与方法。

発明の効果

[0012] 本発明の培養物は、安息香酸エチルを多量に含有し、安息香酸エチルの化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の香りを有することから、香料用組成物や化粧品だけでなく、飲食品や医薬品に用いられる培養物として有用である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の培養物は、ウィッカーハモマイセス属に属する微生物を乳成分含有培地で培養して得られる培養物である。

[0014] ウィッカーハモマイセス属に属する微生物としては、ウィッカーハモマイセス・ピジューペリ(*Wickerhamomyces pijperi*)、ウィッカーハモマイセス・アノマルス(*Wickerhamomyces anomalus*)、ウィッカーハモマイセス・ボビス(*Wickerhamomyces bovis*)、ウィッカーハモマイセス・ラバウレンシス(*Wickerhamomyces rabaulensis*)、ウィッカーハモマイセス・ハンプシレンシス(*Wickerhamomyces hampshirensis*)、ウィッカーハモマイセス・ストラスブルゲンシス(*Wickerhamomyces strasburgensis*)、ウィッカーハモマイセス・シドウィオラム(*Wickerhamomyces sydowiorum*)、ウィッカーハモマイセス・リンフェルディ(*Wickerhamomyces lynferdii*)、ウィッカーハモマイセス・シフェ

リイ(*Wickerhamomyces ciferrii*)、ウィッカーハモマイセス・シャンバルディ(*Wickerhamomyces chambardii*)、ウィッカーハモマイセス・シルビコラ(*Wickerhamomyces silvicola*)、ウィッカーハモマイセス・ビスポラス(*Wickerhamomyces bisporus*)、ウィッカーハモマイセス・アルニ(*Wickerhamomyces alni*)、ウィッカーハモマイセス・カナデンシス(*Wickerhamomyces canadensis*)、ウィッカーハモマイセス・オニチス(*Wickerhamomyces onychis*)、ウィッカーハモマイセス・エダフィカス(*Wickerhamomyces edaphicus*)、ウィッカーハモマイセス・パタゴニクス(*Wickerhamomyces patagonicus*)等が挙げられる。このうち、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリがより好ましい。さらに、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリのうち、NBRC (NITE Biological Resource Center) に寄託されているNBRC 1290、NBRC 1887がさらに好ましい。なお、これらの微生物は単独で用いても良いし、複数組み合わせ用いても良い。なお、旧分類においてピキア・ピジュペリ(*Pichia pijperi*)に分類されていたもので、新たにウィッカーハモマイセス・ピジュペリとして分類され得るものは、本願のウィッカーハモマイセス・ピジュペリに含まれる。

[0015] 本明細書において「乳成分」とは、牛乳、山羊乳、羊乳などの獣乳の生乳、加熱乳、脱脂粉乳、全脂粉乳或いは生クリーム、ホエイ等の乳由来の成分を含有する物を意味する。

[0016] 乳成分含有培地としては、乳成分を含有する培地であればよく、さらに他の成分を含有していてもよい。当該他の成分としては、特に限定されるものではないが、グルコース、ガラクトース、ラクトース、フルクトースなどの糖、安息香酸及び／又はその塩が好ましい。糖としては、微生物に資化される点でグルコースが好ましい。また、添加すると微生物の安息香酸エチルの産生量が向上する点で安息香酸及び／又はその塩が好ましく、安息香酸の塩としては、安息香酸ナトリウム及び安息香酸カリウム等の安息香酸アルカリ金属塩がより好ましく、安息香酸ナトリウムがさらに好ましい。したがって、安息香酸及び／又はその塩としては、安息香酸及び／又は安息香酸ナトリ

ウムを添加することが好ましい。

[0017] 乳成分としては、微生物の安息香酸エチルの産生量が向上するため、ホエイが特に好ましい。「ホエイ」とは、牛乳から乳脂肪分、カゼインを除いたものである。例えば、ホエイは乳成分を微生物で発酵した際の培養上清として得ることができ、ラクトース、ガラクトース等の糖、アミノ酸、乳酸、タンパク質等を含有するものが好ましい。また、ホエイとしては、特に乳成分を乳酸菌及び／又はビフィズス菌で培養して得られた培養上清が好ましい。ここで、乳酸菌及び／又はビフィズス菌としては、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・マリ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・デルブルッキサブスピーシーズ、ブルガリカス、ラクトバチルス・ヘルベティカス等のラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、ラクチス、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、クレモリス等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス等のエンテロコッカス属細菌、あるいは、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロンガム等のビフィドバクテリウム属細菌を挙げることができる。

[0018] 培地中の乳成分の含有量は、特に限定されないが、固形分換算で、1～50質量％（以下、単に「％」という）が好ましく、2～10％がより好ましい。また、安息香酸及び／又はその塩の含有量は、微生物の安息香酸エチルの産生量及び微生物の増殖能の点から、乳成分含有培地中、0.001～0.1％が好ましく、0.01～0.05％がより好ましい。さらに、グルコースの含有量は、微生物の増殖能の点から、0.1～10％が好ましく、1～5％がより好ましい。

[0019] ウィッカーハモマイセス属に属する微生物の培養温度は、特に限定されないが、培養物の香りの点から、15～30℃が好ましく、20～30℃がさらに好ましい。培養時間は、8時間以上が好ましく、24～32時間がさらに好ましい。また、安息香酸及び／又はその塩を培地に添加した場合には、

24～48時間が好ましく、32～48時間がさらに好ましい。培養方法としては、攪拌培養、静置培養、振盪培養、中和培養等が挙げられる。

[0020] 本発明の培養物中には、安息香酸エチルが1.0 ppm以上含まれ、安息香酸エチルの化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の香気を有する。安息香酸エチルの含有量は、1.0～50 ppmが好ましく、1.0～30 ppmがより好ましい。

[0021] また、本発明の培養物中には、安息香酸エチル以外の他の香気成分が含まれていても良い。他の香気成分としては、イソアミルアルコール等の香気成分が挙げられる。

[0022] 本発明の培養物は、安息香酸エチルを多量に含有し、安息香酸エチルの化学合成品よりも複雑でフレッシュなフルーツ様の良好な香気を有するため、香料用組成物、化粧品、飲食品および医薬品等に利用することができる。化粧品分野では工業的に利用可能な生物由来の香料は少なく、合成香料よりも天然香料の需要が高いため、化粧品に好適に利用することができる。

[0023] 本発明の培養物は、培養物をそのまま香料用組成物、化粧品、飲食品および医薬品等に配合しても良いが、ろ過したものを配合することが好ましい。また、培養物を凍結乾燥法あるいは蒸留法等で濃縮し、当該濃縮物を香料用組成物、化粧品、飲食品および医薬品等に配合することもできる。

[0024] 化粧品としては、香水、オーデコロン、オードトワレ等の芳香化粧品、化粧水、乳液、ローション、クリーム、パック、美容液等の基礎化粧品、シャンプーやリンス等の頭髮用化粧品、入浴剤等の浴用化粧品、ファンデーション等のメイクアップ化粧料、日焼け止め等の特殊化粧品等が挙げられる。飲食品としては、各種清涼飲料、発泡酒、ビール、清酒、菓子類、氷菓類、アイスクリーム、はっ酵乳等の乳製品等が挙げられる。また医薬品としては、クリーム、軟膏、ゲル等の外用剤等が挙げられる。これらの化粧品、飲食品、医薬品中の本発明培養物の含有量は、固形分換算で、0.01～10%が好ましく、0.1～1%がより好ましい。

実施例

[0025] 次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

[0026] 実施例 1

(1) 菌株及び前々培養

(i) 使用菌株

Wickerhamomyces pijperi Y I T 8 0 9 5 (NBRC 1290)、*Wickerhamomyces pijperi* Y I T 1 2 7 7 9 (NBRC 1887)

比較例：*Kluyveromyces marxianus* Y I T 1 2 6 1 2 (NBRC 0260)

(ii) 前々培養

前々培養：2mlのYeast and Mold (YM) 培地（1%グルコース、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス）に20%グリセロール凍結保存株を20 μ L接種し、30℃、160rpmで24時間振盪培養した。

[0027] (2) 菌の産生する香気成分の分析

(i) 前培養

前培養：1%グルコースを含む2mlのホエイ含有培地に前々培養で得られた培養液を20 μ L接種し、30℃、160rpmで24時間振盪培養した。

前記ホエイ含有培地としては*Streptococcus thermophilus* Y I T 2 0 8 4 (FERM BP-10879)を3%脱脂粉乳培地で培養して得られた培養物の上清を使用した。この上清を分析した結果、1.1%のラクトース、0.4%のガラクトース、0.4%の乳酸を含み、pHは4.0であった。

[0028] (ii) 培養

培養：1%グルコースを含む5mlのホエイ含有培地に、前培養液を50 μ L接種し、30℃、160rpmで24時間振盪培養した。

(iii) 香気成分の分析

培養終了後、試料は8000rpmで5分間遠心分離し、2mlの上清を20mlのバイアルにとり、培養物中の香気成分をHeadspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS)によって同定した（表1、表2）。ま

た、同定した香気成分の定量は、HS-GC-Flame Ionization Detector (FID)で行った(表3、表4)。結果を表5に示す。また、培養液の香りの官能検査を下記の基準で行った。その結果を表5に示す。

[0029] (官能検査の評価基準)

- 5 : 複雑でフレッシュなフルーツ様の香りが強くする。
- 4 : 複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがする。
- 3 : 複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがわずかにする。
- 2 : 複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがほとんどしない。
- 1 : 複雑でフレッシュなフルーツ様の香りはしない。

[0030] [表1]

HS 条件

装置	MPS 2-x t
シリンジサイズ	2.5 ml
アジテーター温度	50 °C
アジテータースピード	250 rpm
バイアル平衡化時間	15 min
シリンジ温度	100 °C
注入量	1000 μ L
注入速度	200 μ L/s

[0031]

[表2]

GC-MS 条件

装置	MS 700D (JEOL)
カラム	InertCap Pure WAX 30m × 0.25mm i.d. × 0.25μm (GLサイエンス)
オープン温度	40℃ - 250℃ (10℃/min)
キャリアガス	He
流速	0.7ml/min
注入温度	250℃
スプリット比	Splitless
MS 解像度	1000
イオン化電流	300μA
イオン化電圧	70eV
チャンバー温度	250℃
注入量	1μL

[0032] [表3]

HS 条件

装置	Agilent 7697A
ループサイズ (ml)	5
オープン温度 (℃)	50
ループ温度 (℃)	110
トランスファライン温度 (℃)	115
バイアル平衡化 (min)	15
注入時間 (min)	1

[0033]

[表4]

GC 条件	
装置	Agilent 7890B
カラム	InertCap Pure WAX 30m × 0.25mm i.d. x 0.25 μm (GLサイエンス)
オープン温度	40°C (5min) -10°C/min-250°C (3min)
キャリアガス	He
流速	3ml/min
注入温度	250°C
スプリット比	20 : 1
スプリット流量	60ml/min
バイアル平衡化 (min)	5
注入時間 (min)	1

[0034] [表5]

化合物 (ppm)	NBRC1290	NBRC1887	Kluyveromyces marxianus NBRC0260
アルコール類			
イソアミルアルコール	10.07	10.79	29.07
エチルエステル類			
安息香酸エチル	1.14	1.24	0.00
官能検査の評価	5	5	1

[0035] NBRC1290株とNBRC1887株の培養液から複雑でフレッシュなフルーツ様の香りが強く感じられ、香気成分を分析して各化合物の含有量を比較した結果、安息香酸エチルの含有量が多いことに特徴があった。これらの培養液との比較として、別種の酵母 (*Kluyveromyces marxianus* NBRC0260株) をホエイ含有培地で培養させて得た培養液の香気成分を分析・評価した結果、バラ様の香りは強いが、フルーツ様の香りはほとんどせず、安息香酸エチルは含有していなかった。

[0036] NBRC1290株およびNBRC1887株の培養液と、培養液中と同量の安息香酸エチルの化学合成品単独の香りの官能検査を行ったところ、NBRC1290株およびNBRC1887株の培養液では化学合成品には出せない香りの複雑さが感じられ、化学合成品よりも好ましい香りだった。

[0037] (3) 培地による菌の香気成分産生量の違い

NBRC1290株およびNBRC1887株を用いて実験を行った。

(i) 前培養

前培養：１％グルコースを含む２ｍｌのホエイ含有培地、２ｍｌのＹＰＤ培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、２％グルコース）、２ｍｌのＹＭ培地（１％グルコース、０．５％ペプトン、０．３％酵母エキス、０．３％麦芽エキス）に、前々培養で得られた培養液をそれぞれ２０μＬ接種し、３０℃、１６０rpmで２４時間振盪培養した。

(ii) 培養

培養：１％グルコースを含む２ｍｌのホエイ含有培地、２ｍｌのＹＰＤ培地、２ｍｌのＹＭ培地に、前培養で得られた培養液をそれぞれ５ｍｌ接種し、３０℃、１６０rpmで２４時間振盪培養した。

(iii) 香気成分の含有量の分析

培養終了後、培養物中の香気成分の含有量をＨＳ－ＧＣ－ＦＩＤによって分析した（表３、表４）。結果を表６に示す。また、培養物の香りの官能検査を実施例１（２）と同様の基準で行った。その結果を表６に示す。

[0038] [表6]

化合物 (ppm)	NBRC1290			NBRC1887		
	ホエイ	YPD	YM	ホエイ	YPD	YM
アルコール類						
イソアミルアルコール	17.07	242.14	70.07	7.53	235.7	98.31
エチルエステル類						
安息香酸エチル	2.69	0.10	0.09	2.78	0.00	0.11
官能検査の評価	5	2	2	5	1	2

[0039] ホエイ含有培地でNBRC1290株とNBRC1887株を培養した培養液から複雑でフレッシュなフルーツ様の香りが強く感じられ、培養液は安息香酸エチルを多く含有していた。一方、ＹＭ培地、ＹＰＤ培地で上記菌株を培養した培養液においても安息香酸エチルを含有する場合があるが、その含有量は少なく、複雑でフレッシュなフルーツ様の香りはほとんどしなかった。

[0040] (４) 培養条件による菌の香気成分産生量の違い

NBRC1887株を用いて実験を行った。

(i) 前培養

前培養：１％グルコースを含む２ｍｌのホエイ含有培地に前々培養で得られた培養液を２０μＬ接種し、３０℃、１６０rpmで２４時間振盪培養した。

(ii) 培養

培養：１％グルコースを含む１００ｍｌのホエイ含有培地に前培養液を１ｍｌ接種し、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃の培養条件で、１６０rpmで振盪培養した。また、０、２４、３２、４８、５６時間培養した時にサンプルを回収した。

(iii) 安息香酸エチルの含有量の分析

各培養物中の安息香酸エチルの含有量をＨＳ－ＧＣ－ＦＩＤによって分析した（表３、表４）。結果を表７に示す。また、培養物の香りの官能検査を下記の基準で行った。その結果を表７に示す。

[0041] (官能検査の評価基準)

◎：複雑でフレッシュなフルーツ様の香りが強くする。

○：複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがする。

△：複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがわずかにするが、複雑さが弱い。

▲：他の香気成分の香りが強く、香りの特徴が変化し、日本酒様の香りがする。

×：複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがしない。

[0042] [表7]

安息香酸エチル (ppm) / 官能検査の評価	0hr	24hr	32hr	48hr	54hr
15℃	0/×	0.73/△	2.48/△	2.24/△	2.18/△
20℃	0/×	3.04/◎	2.54/○	2.06/▲	1.90/▲
25℃	0/×	2.48/○	1.89/○	1.65/▲	1.67/▲
30℃	0/×	2.23/○	1.72/○	1.26/▲	1.51/▲

[0043] 培養温度が１５℃の場合、微生物の発酵によって安息香酸エチルは産生されるものの、他の香気成分の香りが弱く、培養物の香りの複雑さが弱かった。一方、２０～３０℃で培養した培養物は複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがし、香りが良好であった。また、培養時間が４８時間以上になると、

微生物の発酵によって、安息香酸エチル以外の香気成分の産生量が上昇するため、他の香気成分の香りが強くなり、香りの特徴が変化し、日本酒様の香りがした。このため、培養時間としては、24～32時間が良好であった。

[0044] (5) 安息香酸又はその塩を培地に配合したときの安息香酸エチル含有量の違い

NBRC 1887株を用いて実験を行った。

(i) 前培養

前培養：1%グルコースを含む2mlのホエイ含有培地に前々培養で得られた培養液を20 μ l接種し、30℃、160rpmで24時間振盪培養した。

(ii) 培養

培養：1%グルコースを含む100mlのホエイ含有培地に、安息香酸ナトリウムを0.01%となるように配合した。また同様にして、1%グルコースを含む100mlのホエイ含有培地に、安息香酸が0.01%、フェニルアラニンが0.01%、0.05%、0.1%、パラヒドロキシメチルベンゼンが0.01%、0.05%となるようにそれぞれ配合した。さらに、コントロールとして、添加物を配合しない1%グルコースを含む100mlのホエイ含有培地も用意した。各培地に、前培養液を1ml接種し、30℃、160rpmで振盪培養した。また、0、24、32、48時間培養した時にサンプルを回収した。

(iii) 安息香酸エチルの含有量の分析

各培養物中の安息香酸エチルの含有量をHS-GC-FIDによって分析した(表3、表4)。結果を表8に示す。

[0045]

[表8]

各培養液中の安息香酸エチル含有量 (ppm)

	コントロール	0.01%安息香酸ナトリウム	0.01%安息香酸	0.01%フェニルアラニン	0.05%フェニルアラニン	0.1%フェニルアラニン	0.01%パラヒドロキシメチルベンゼン	0.05%パラヒドロキシメチルベンゼン
0 時間	0	0	0	0	0	0	0	0
24 時間	2.44	3.30	2.41	2.43	2.38	2.66	0.71	0.07
32 時間	3.54	12.59	15.31	3.37	3.39	3.65	2.17	0.34
48 時間	2.89	27.67	23.53	2.48	2.58	2.28	2.78	2.12

[0046] 安息香酸又は安息香酸ナトリウムを配合した場合には、32～48時間培養したときに、培養物中の安息香酸エチルの含有量が顕著に増加した。その他の物質を配合した場合には、培養物中の安息香酸エチルの含有量はほとんど増加しなかった。

[0047] 製造例 1

表9の組成で、(5)と(6)を混合して、これに(1)～(4)を加えて十分に攪拌して化粧水を調製した。この化粧水は複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがした。なお、培養液としては、1%グルコースを含むホエイ含有培地100mlに、実施例1(4)の前培養で得た前培養液を1ml接種し、20℃、24時間、160rpmで振盪培養して得られた培養液をろ過したものを使用した。

[0048] [表9]

	原料	使用量 (%)
(1)	エタノール	5.0
(2)	1,3-ブチレングリコール	2.0
(3)	ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.05
(4)	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
(5)	培養液	10.0
(6)	蒸留水	全体で100となる量

[0049] 製造例 2

表10の組成で、(10)に(7)～(9)を加えて加温し、80℃で(1)～(6)を加えて乳化し、室温まで冷却して乳液を調製した。この乳液

は複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがした。なお、培養液は製造例 1 と同じものを使用した。

[0050] [表10]

	原料	使用量 (%)
(1)	ステアリン酸	2.0
(2)	流動パラフィン	5.0
(3)	スクワラン	2.0
(4)	ソルビタンモノステアレート	0.05
(5)	ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート	2.0
(6)	パラオキシ安息香酸ブチル	0.05
(7)	グリセリン	2.0
(8)	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
(9)	培養液	3.0
(10)	蒸留水	全体で 100 となる量

[0051] 製造例 3

表 11 の組成で、(12) に (9) ~ (11) を加えて加温し、80℃で (1) ~ (8) を加えて乳化し、室温まで冷却してクリームを調製した。このクリームは複雑でフレッシュなフルーツ様の香りがした。なお、培養液は製造例 1 と同じものを使用した。

[0052] [表11]

	原料	使用量 (%)
(1)	流動パラフィン	23.0
(2)	ワセリン	7.0
(3)	セタノール	1.0
(4)	ステアリン酸	2.0
(5)	ミツロウ	2.0
(6)	ソルビタンモノステアレート	3.5
(7)	ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート	2.5
(8)	パラオキシ安息香酸ブチル	0.05
(9)	1,3-ブチレングリコール	1.0
(10)	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
(11)	培養液	3.0
(12)	蒸留水	全体で 100 となる量

請求の範囲

- [請求項1] ウィッカーハモマイセス属に属する微生物を乳成分含有培地で培養して得られる培養物。
- [請求項2] 乳成分含有培地が、ホエイ含有培地である請求項1記載の培養物。
- [請求項3] ウィッカーハモマイセス属に属する微生物が、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリである請求項1又は2記載の培養物。
- [請求項4] ウィッカーハモマイセス属に属する微生物が、ウィッカーハモマイセス・ピジュペリ NBRC1290及び／又はウィッカーハモマイセス・ピジュペリ NBRC1887である請求項1～3のいずれか1項記載の培養物。
- [請求項5] 乳成分含有培地が、さらに安息香酸及び／又はその塩を含有するものである請求項1～4のいずれか1項記載の培養物。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項記載の培養物を含有する香料用組成物。
- [請求項7] 請求項1～5のいずれか1項記載の培養物を含有する化粧品。
- [請求項8] 請求項1～5のいずれか1項記載の培養物を含有する飲食品。
- [請求項9] 請求項1～5のいずれか1項記載の培養物を含有する医薬品。
- [請求項10] 請求項1～5のいずれか1項記載の培養物を配合することを特徴とする化粧品、飲食品又は医薬品への香り付与方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/16(2006.01)i, A23L27/10(2016.01)i, A61K8/99(2006.01)i, A61K36/062(2006.01)i, A61Q13/00(2006.01)i, C12P1/02(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i, C12R1/645(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/16, A23L27/10, A61K8/99, A61K36/062, A61Q13/00, C12P1/02, C12P7/62, C12R1/645

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/FSTA/FROSTI(STN), CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	CHAVES-LOPEZ C. et al., Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk., Int. J. Food Microbiol., 159(2012), p.39-46, ISSN : 0168-1605 particularly, page 39, left column, 9th line from the bottom to 4th line from the bottom, page 39, left column, lines 5 to 8, right column, line 4, page 40, right column, 2.4, page 45, right column, lines 12 to 13, page 46, left column, lines 1 to 3, tables 1 to 3	1-3, 6-10/ 1-3, 5-10/4
Y/A	SURIYARACHCHI V.R., et al., Occurrence and Growth of Yeasts in Yogurts, Appl. Environ. Microbiol., 42(3)(1981), p.574-579, ISSN: 0099-2240 particularly, page 578, right column, lines 35 to 37	1-3, 5-10/4

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 March 2016 (15.03.16)

Date of mailing of the international search report
22 March 2016 (22.03.16)

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/JP2016/051232

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2005-15686 A (Kiyomitsu KAWASAKI), 20 January 2005 (20.01.2005), particularly, claim 36; paragraph [0110] (Family: none)	1-3, 5-10/4
A	SIEBER R., et al., Benzoic Acid as a Natural Compound in Cultured Dairy Products and Cheese., Int. Dairy J., 5(1995), p.227-246, ISSN: 0958- 6946	1-10
A	DMITRELLOU D., et al, Whey-cheese production using freeze-dried kefir culture., J. Appl. Microbiol., 103(2007), p.1170-1183, ISSN : 1364-5072 particularly, Table 2	1-10
A	KHATABIAH J., et al., Efficacy of Benzoate and Sorbate on the Growth Control of Total and Psychrophilic Yeasts in Labneh, Egyptian J. Dairy Sci., 40(2012), p.35-43, ISSN : 0378-2700	1-10
P,X	IZAWA N., et al, Production of aroma compounds from whey using Wickerhamomyces pijperi., AMB Express [online], 5(2015. 4), 23, p.1-9 [retrieved on 2016.3.14], <doi: 10.1186/s13568- 015-0108-5> Retrieved from the Internet :<URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC4397261/ > particularly, page 2, left column, 20th line from the bottom to right column, line 19, tables 1, 2	1-10
P,X	Naoki IZAWA et al., "Effects of fermentation conditions on aroma compounds production by Wickerhamomyces pijperi", Dai 67 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, vol.67(2015.10), page 286, 3P-064, entire text	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/16(2006.01)i, A23L27/10(2016.01)i, A61K8/99(2006.01)i, A61K36/062(2006.01)i, A61Q13/00(2006.01)i, C12P1/02(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i, C12R1/645(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/16, A23L27/10, A61K8/99, A61K36/062, A61Q13/00, C12P1/02, C12P7/62, C12R1/645

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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 (JDreamIII)、PubMed、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/FSTA/FROSTI (STN)、CiNii

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/Y/A	CHAVES-LOPEZ C. et al., Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk., Int. J. Food Microbiol., 159(2012), p.39-46, ISSN : 0168-1605 特に、第 39 頁左欄下から第 9 行一下から第 4 行、第 39 頁左欄第 5 行一第 8 行、右欄第 4 行、第 40 頁右欄 2.4、第 45 頁右欄第 12 行一第 13 行、第 46 頁左欄第 1 行一第 3 行、表 1-3	1-3, 6-10 /1-3, 5-10/4

☒ 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。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

宮岡 真衣

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 0 4 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
Y/A	SURIYARACHCHI V.R., et al., Occurrence and Growth of Yeasts in Yogurts, Appl. Environ. Microbiol., 42(3) (1981), p.574-579, ISSN: 0099-2240 特に、第 578 頁右欄第 35 行ー第 37 行,	1-3, 5-10/4
Y/A	JP 2005-15686 A (川崎 清光) 2005.01.20, 特に、請求項 36、【0110】 (ファミリーなし)	1-3, 5-10/4
A	SIEBER R., et al., Benzoic Acid as a Natural Compound in Cultured Dairy Products and Cheese., Int. Dairy J., 5(1995), p.227-246, ISSN: 0958-6946	1-10
A	DMITRELLOU D., et al, Whey-cheese production using freeze-dried kefir culture., J. Appl. Microbiol., 103(2007), p.1170-1183, ISSN : 1364-5072 特に Table 2	1-10
A	KHATABIAH J., et al., Efficacy of Benzoate and Sorbate on the Growth Control of Total and Psychrophilic Yeasts in Labneh, Egyptian J. Dairy Sci., 40(2012), p.35-43, ISSN : 0378-2700	1-10
P, X	IZAWA N., et al, Production of aroma compounds from whey using Wickerhamomyces pijperi., AMB Express [online], 5(2015. 4), 23, p.1-9 [retrieved on 2016.3.14], <doi: 10.1186/s13568-015-0108-5> Retrieved from the Internet : <URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397261/ > 特に、第 2 頁左欄下から第 20 行ー右欄第 19 行、表 1、表 2	1-10
P, X	伊澤 直樹 他, Wickerhamomyces pijperi を利用した香気成分産生条件の検討, 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, Vol.67(2015.10), p.286, 3P-064, 全文	1-10