

(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2018-532378

(P2018-532378A)

(43) 公表日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(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	A 2B150
C 12 P 1/04 (2006.01)	C 12 P 1/04	Z 4B001
A 23 C 9/123 (2006.01)	A 23 C 9/123	4B064
A 61 K 35/747 (2015.01)	A 61 K 35/747	4B065
A 23 K 10/12 (2016.01)	A 23 K 10/12	4C087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-510816 (P2018-510816)	(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28年8月30日 (2016.8.30)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月26日 (2018.4.26)	(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/070398	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87) 國際公開番号	W02017/037052	(74) 代理人	100141977 弁理士 中島 勝
(87) 國際公開日	平成29年3月9日 (2017.3.9)	(74) 代理人	100150810 弁理士 武居 良太郎
(31) 優先権主張番号	15183194.8		
(32) 優先日	平成27年8月31日 (2015.8.31)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

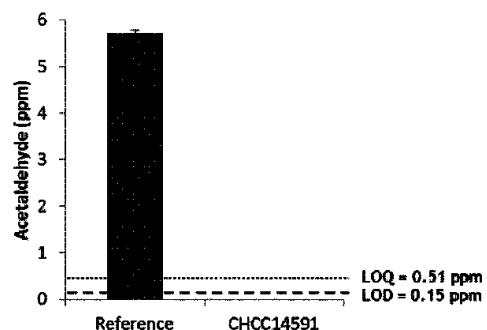
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌

(57) 【要約】

本発明は、発酵後の貯蔵中にラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスターーター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させることを特徴とする。ラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌に関する。関連する実施形態では、本発明は、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品は、25度少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持し、ここで、該発酵乳製品は、少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の前記ラクトバチルス・ファーメンタムとスターーター培養物を有する乳をインキュベートすること；pHが4.6に達するまで発酵すること；発酵産物を攪拌して冷却すること；を含む方法によって得られることを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌も提供する。本発明は、更に、該細菌を含む組成物、該細菌を用いて発酵乳製品を製造する方法、並びに、これらから得られる製品にも関する。

Figure 4



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌であって、
発酵後の貯蔵中に該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスターーター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させることを特徴とする、前記細菌。

【請求項 2】

前記pHの上昇は、少なくとも0.1の値の上昇である、請求項1に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

【請求項 3】

前記pHの上昇は、前記スターーター培養物と少なくとも 10^7 cfu/gの濃度のラクトバチルス・ファーメンタムを用いて発酵させた製品を25℃で21日間保存した後に決定される、請求項1又は2に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

10

【請求項 4】

ラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌であって、
該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品は、25℃で少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持し、

ここで、該発酵乳製品は、

少なくとも 10^7 CFU/gの濃度のラクトバチルス・ファーメンタムスターーター培養物を有する乳をインキュベートすること；

20

pHが4.6に達するまで発酵すること；及び

発酵産物を攪拌して冷却すること；を含む方法によって得られることを特徴とする、前記細菌。

【請求項 5】

前記発酵乳製品の調製に用いられる前記スターーター培養物は、発酵中の乳製品のpHを10時間以内にpH4.6の値まで低下させることができる乳酸菌を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

【請求項 6】

前記スターーター培養物は、ストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカスの混合物を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

30

【請求項 7】

発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%低減する能力を有する、請求項1～6のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

【請求項 8】

前記細菌は、発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも95%又は少なくとも98%低減する能力を有し、

前記アセトアルデヒドの濃度は、

40

(1)

(a) 少なくとも 10^7 CFU/gの濃度のラクトバチルス・ファーメンタムとスターーター培養物を乳に植菌すること、及び

(b) pHが4.6に達するまで発酵すること、により発酵乳製品を調製すること；

(2) 発酵乳製品を 7 ± 1 ℃で14日間保存すること；並びに

(3) 1gの発酵乳製品に対し $200 \mu\text{l}$ の4N H_2SO_4 を添加し、静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィーによってアセトアルデヒドの濃度を決定すること；を含むアッセイで決定される、請求項1～7のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

【請求項 9】

前記細菌は、

50

- (a) DSM32084として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (b) DSM32085として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (c) DSM32086として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (d) DSM32087として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (e) DSM32088として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (f) DSM32089として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (g) DSM32090として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (h) DSM32091として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (i) DSM32096として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；
- (j) DSM22584として寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株；又は

10

(k) (a)～(j)に記載の寄託細菌の1つから得ることができる変異株、ここで、該変異株は、発酵後の貯蔵中に該変異ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスターーター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させることを特徴とする；

からなる群より選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌。

【請求項 1 0】

請求項1～9のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム株の少なくとも1種を含む組成物。

【請求項 1 1】

(a) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM32092で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC15860株；

(b) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM23035で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC5366株；

(c) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24616で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC12697株；

(d) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24651で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC12777株；及び

(e) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM25612で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC14676株；より選択される少なくとも1種の更なる細菌を更に含む、請求項10に記載の組成物。

20

【請求項 1 2】

少なくとも1つの凍結保護化合物を更に含む、請求項10又は11に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記組成物は、冷凍物1gあたり少なくとも 10^9 コロニー形成単位の濃度、又は冷凍物1gあたり少なくとも 10^{10} コロニー形成単位の濃度、又は冷凍物1gあたり少なくとも 10^{11} コロニー形成単位の濃度で乳酸菌を含有する固体凍結又は凍結乾燥スターーター培養物である、請求項10～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

請求項1～9のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム菌又は請求項11～13のいずれか1項に記載の組成物を乳又は乳製品に添加すること、及び、pHが4.6以下に達するまで混合物を約22～約43の温度で発酵することを含む、発酵乳製品を製造する方法。

【請求項 1 5】

前記方法は、

(a) 発酵終了時の発酵乳製品における請求項1に記載のラクトバチルス・ファーメンタム菌の濃度が少なくとも 1×10^6 cfu/g又は少なくとも 1×10^7 cfu/gである；及び／又は

(b) 発酵乳製品の表面における請求項1に記載のラクトバチルス・ファーメンタム菌の濃度が少なくとも 1×10^5 cfu/cm²である；

ように、請求項1～5のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム菌又は請

40

50

求項6～9のいずれか1項に記載の組成物を乳又は乳製品に添加し、混合物を発酵することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記発酵製品は、7℃を超える温度、好ましくは7℃～25℃の温度で保存される、請求項14又は15に記載の方法。

【請求項17】

前記発酵製品は、少なくとも14日間の期間保存され、発酵乳製品のpHが4.0超で維持される、請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

請求項14～17のいずれか1項に記載の発酵乳製品を製造する方法を含む、食料、飼料又は医薬製品を製造する方法。

【請求項19】

請求項18に記載の方法によって得られる食料、飼料又は医薬製品。

【請求項20】

請求項1～9のいずれか1項に記載のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌、並びに；

(a) ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、リューコノストック属、シュードレノコストック属、ペディオコッカス属、プレビバクテリウム属及びエンテロコッカス属の1つ又は複数より選択される少なくとも1種の更なる細菌；

(b) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM32092で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC15860株；

(c) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM23035で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC5366株；

(d) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24616で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC12697株；

(e) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24651で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC12777株；及び

(f) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM25612で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC14676株；の1種又は複数種を含む食料、飼料又は医薬製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、冷蔵温度以上の温度で保存された発酵乳製品で頻繁にみられる現象である後酸性化(post-acidification)を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌に関する。本発明は、更に、該細菌を含む補助培養物(adjunct cultures)、該細菌又は培養物を用いて発酵乳製品を製造する方法、並びに、これらから得られる食料、飼料、医薬製品を含めた発酵乳製品を提供する。

【背景技術】

【0002】

何十年もの間、乳酸菌は、食料の貯蔵寿命を延ばすために使用してきた。発酵中、乳酸菌は、乳酸その他の有機酸を産生するので発酵産物のpHが下がる。酸性pHを有する製品では、病原菌や腐敗生物を含めほとんどの微生物のさらなる増殖が起こりにくい。

【0003】

しかしながら、低いpHの影響を受けずに増殖する酵母やカビが、しばしば発酵乳製品の腐敗を引き起こす。

【0004】

伝統的に、ヨーグルトは、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカスおよびストレプトコッカス・サーモフィルスの2種の乳酸菌の混合物からなる特定のヨーグルトスター培養物を用いて乳を発酵させることによって製造される。ヨーグルトの製造にお

10

20

30

40

50

けるスターの主な役割は、(i) 乳糖を乳酸に変換することによる酸性化、(ii) 粘性のある質感の生成(例えばタンパク質の変性やエキソポリサッカライドの产生による)、および(iii) 典型的なヨーグルトフレーバーの生成によって特徴づけられる(1)。

【0005】

典型的なヨーグルトフレーバーは、酸味があり爽やかな味を与える乳酸、並びに、アセトン、ジアセチルおよびアセトアルデヒドといった種々のカルボニル化合物の混合物(後者は主要なフレーバー成分とみなされる)によるものである(2)。

【0006】

発酵の終了後、ヨーグルトは消費されるまで保存される。この保存期間中に、乳酸菌は、特に冷蔵温度を超えて貯蔵された場合、製品のさらなる酸性化を引き起こすことがある。この現象は後酸性化と呼ばれ、一般に、ほとんどのタイプのヨーグルトにおいて時間の経過とともにみられる望ましくない性質であると考えられている。後酸性化は、離漿、生菌数の減少の増加、製品中の乳酸の蓄積および望ましくない風味の発生といった欠点にもたらし得る。これは主に、低いpH値と冷蔵温度ではラクトバチルス・デルブルッキー亞種ブルガリカスの株の増殖が制御不能なことによるものである(4)。適切な製造を行うことや後酸性化が少ない培養物、例えば、Chr. Hansen Mild 2.0(登録商標)等を使用することによって、影響を限られた程度にできる。この問題を回避するための別の可能な方法として、製造後にヨーグルトを低温殺菌がある。この方法だと、製造業者の取り扱いや配送がしやすいものの、多くの消費者はラクターゼ活性が損なわれていない生きた微生物を含有する発酵乳製品を望んでいるので、ヨーグルトの低温殺菌は一般的には行われない。さらに、ラクトバチルス・アシドフィルスおよびビフィズス菌を含む酸性化が穏やかなヨーグルト関連の培養物は、後酸性化が少ないという利点がある。

10

20

30

【0007】

同時に、抗真菌作用を有するスター培養物、すなわち生物防除性(bioprotective)の細菌スター培養物としても知られる培養物(例えば、Holdbac(登録商標)YM-C plusおよびFreshQ(登録商標)4)は、特に発酵製品が周囲温度で保存されている場合、発酵乳製品を製造する方法において後酸性化を促進する。

【0008】

これらの知見の結果として、発酵乳製品を製造する方法において後酸性化の制御を改善する必要性が依然として存在する。

30

【発明の概要】

【0009】

本発明は、発酵後の貯蔵中にラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させる(つまり、後酸性化に対抗する)ことを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌を提供する。このpHの上昇の程度は任意でよいが、好ましくは少なくとも0.1の値の上昇である。この上昇は、発酵製品を25℃で21日間保存した後に測定することが好ましい。

【0010】

本発明者らは、驚くべきことに、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、後酸性化をもたらさないのみならず、実際にこれらの株を用いて製造した発酵乳製品のpH値を上昇させることによって後酸性化に対抗することを見出した。以下の実施例に示されるように、この効果は、多くの市販のスター培養物を含め顕著な後酸性化を示すスター培養物を用いる発酵方法や特に市販の抗真菌細菌と一緒に使用される場合において特に顕著である。スター培養物の後酸性化を阻害する、合計10種の異なるラクトバチルス・ファーメンタム株が同定された。

40

【0011】

関連する実施形態では、本発明は、以下のことを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌も提供する;該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品は、25℃で少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持する、ここで、該発酵乳製品は、

50

以下の工程を含む方法によって得られる：少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の前記ラクトバチルス・ファーメンタムとスターーター培養物を有する乳をインキュベートすること；及び、pHが4.6に達するまで発酵すること；発酵産物を攪拌して冷却すること。

【0012】

本発明の細菌は、スターーター培養物における他の細菌によって產生されるアセトアルデヒドを低減するという特徴をさらに有してもよい。例えば、本発明の特定のラクトバチルス・ファーメンタム株は、発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%低減する能力を有するという特徴をさらに有してもよい。

【0013】

関連する実施形態では、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、0~5ppmの範囲内のジアセチルを分泌することを更に特徴としてもよい。

【0014】

したがって、本発明は、上述の細菌、該細菌を含む組成物、発酵乳製品を製造するために該細菌を用いる方法、並びに、これらから得られる製品を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、(A)7±1及び(B)25±1で21日間保存した発酵乳製品におけるpHの経時的な変化を示す。これらの製品は、スターーター培養物のみ(基準、○)、又はスターーター培養物をFreshQ(登録商標)4(△)、Holdbac(登録商標)YM-C Plus(○)又はラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591(□)と組み合わせて用いて発酵させた。

【0016】

【図2】図2は、(A)7±1及び(B)25±1で28日間保存した発酵乳製品におけるpHの経時的な変化を示す。これらの製品は、スターーター培養物のみ(基準)、又はスターーター培養物をFreshQ(登録商標)4、Holdbac(登録商標)(登録商標)YM-C Plus、又はラクトバチルス・ファーメンタム株と組み合わせて用いて発酵させた。

【0017】

【図3】図3は、スターーター培養物のみ(基準)、又はスターーター培養物をラクトバチルス・ファーメンタム株と組み合わせて用いて発酵させた発酵乳製品を7±1で14日間保存した後のアセトアルデヒドレベルを示す。LOD:検出限界(Limit of detection)。LOQ:定量限界(Limit of quantification)。

【0018】

【図4】図4は、スターーター培養物のみ(基準)、又はスターーター培養物をラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591と組み合わせて用いて発酵させた発酵乳製品を7±1で14日間保存した後のアセトアルデヒドレベルを示す。LOD:検出限界(Limit of detection)。LOQ:定量限界(Limit of quantification)。

【0019】

【図5】図5は、4種の市販のスターーター培養物、FD-DVS YF-L812、F-DVS YF-L901、F-DVS YoFlex Mild 2.0、及びF-DVS CH-1を乳(1%脂肪及び4.5%タンパク質)において43で培養させた酸化曲線を示す。

【0020】

【図6】図6は、4種の市販のスターーター培養物、FD-DVS YF-L812、F-DVS YF-L901、F-DVS YoFlex Mild 2.0及びF-DVS CH-1のいずれか1つを用いて発酵させたヨーグルトを6で43日間まで保存後の後酸化曲線を示す。

【0021】

【図7】図7は、スターーター培養物、FD DVS YF-L812又はF-DVS CH-1のみ(基準)、又はスターーター培養物を9種のラクトバチルス・ファーメンタム株と組み合わせて用いて発酵させた発酵乳製品を7±1で14日間保存した後のアセトアルデヒドレベルを示す。LOD:検出限界(Limit of detection)。LOQ:定量限界(Limit of quantification)。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明は、発酵後の貯蔵中にラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させることを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌を提供する。このpHの上昇の程度は任意でよいが、好ましくは少なくとも0.1の値の上昇である。この上昇は、発酵製品を25℃で21日間保存した後に測定することが好ましい。

【 0 0 2 3 】

本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、例えば、発酵後の貯蔵中にラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させる（つまり、後酸性化に対抗する）ことを特徴としてもよく、ここでこのpHの上昇は、少なくとも0.1の値の上昇であり、発酵製品を25℃で21日間保存した後に測定し、ここで該発酵乳製品の調製に使用されるスター培養物は、発酵中の乳製品のpHを10時間以内にpH4.6の値まで低下させることができる乳酸菌を含む。例えば、アッセイは、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) とラクトバチルス・デルブルッキー亜種 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) の混合物ベースでもよい。それぞれの混合物は、ヨーグルトの製造に多用され、後酸性化を引き起こすことが知られている。

10

【 0 0 2 4 】

代替的な態様では、本発明は、以下のことを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌も提供する；該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品は、25℃で少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持する、ここで、該発酵乳製品は、以下の工程を含む方法によって得られる：少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の前記ラクトバチルス・ファーメンタムとスター培養物を有する乳をインキュベートすること；pHが4.6に達するまで発酵すること；及び、発酵産物を攪拌して冷却すること。25℃で少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持することができるという本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株の特定事項は、単にこのような効果を決定するのに一般的に使用されるアッセイについての特徴であることが理解されるべきである。本発明の本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株やそれを含む組成物（食料又は飼料製品を含む）が実際にこれらの条件下で貯蔵される必要はなく、必須要件でもない。再度説明すると、一態様では、アッセイは、発酵中の乳製品のpHを10時間以内にpH4.6の値まで低下させることができる乳酸菌を含むスター培養物を用いて実施してもよい。例えば、アッセイは、ストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカスの混合物ベースでもよい。

20

【 0 0 2 5 】

本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、後酸性化のリスクを低減し、これにより該細菌を用いて製造した食料製品の貯蔵安定性、特に冷凍温度を上回る条件下での貯蔵安定性を改善するという特別な利点を有する。

30

【 0 0 2 6 】

実施例に示されているように、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、発酵前の乳に少なくとも 10^7 CFU/gの濃度で添加すると、発酵乳製品のpHを上昇させるという効果が観察された。したがって、本発明は、少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株、それを含む組成物、並びにそれらを含む発酵食料製品を包含する。好ましい濃度範囲は、 10^7 CFU/g ~ 10^{11} CFU/g、 10^7 CFU/g ~ 10^{10} CFU/g、及び 10^7 CFU/g ~ 10^9 CFU/gの濃度を含む。

40

【 0 0 2 7 】

市販のストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカスの混合物といった一般的なスター培養物は、発酵製品の官能特性に大きく影響する揮発性化合物を產生することが知られている。

【 0 0 2 8 】

本発明の一態様によれば、本発明の細菌は、食料製品の官能特性に影響を及ぼす揮発性

50

化合物を低量しか分泌しない又は本質的に分泌しないことをさらに特徴としてもよい。アセトアルデヒド、ジアセチル及びアセトイントは、食料製品の官能特性に影響を及ぼす既知の揮発性化合物である。

【0029】

関連する実施形態では、本発明の細菌は、スターーター培養物中の他の細菌によって產生されるアセトアルデヒドの存在を減少させることを特徴とする。例えば、ある本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%低減する能力を有することをさらに特徴としてもよい。発酵製品中のアセトアルデヒド濃度を決定するための様々なアッセイが該技術分野において知られており、本発明の目的のために使用することができる。発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%を低減する能力は、好ましくは、以下を含むアッセイで決定される：

(1)

(a) 少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の前記ラクトバチルス・ファーメンタムとスターーター培養物を有する乳をインキュベートすること、及び

(b) pHが4.6に達するまで発酵すること、により発酵乳製品を調製すること；

(2) 発酵乳製品を 7 ± 1 で14日間保存すること；並びに

(3) 1gの発酵乳製品に対し $200 \mu\text{l}$ の4N H₂SO₄を添加し、静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィーによってアセトアルデヒドの濃度を決定すること。

【0030】

アセトアルデヒドは、発酵中に乳酸菌によって生成される味成分である。ある用途ではこの成分は望ましいものの、他の用途ではアセトアルデヒドの存在を低減又は回避することが有利である。したがって、発酵乳製品におけるアセトアルデヒドの濃度を低減するラクトバチルス・ファーメンタム菌は、特定の用途、例えば、甘味を加えたヨーグルトを調製する場合に有利である。本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、例えば、発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を、少なくとも75%、少なくとも95%又は少なくとも98%低減してもよい。

【0031】

代替的又は追加的に、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、0~5ppmの範囲内のジアセチルを分泌するという特徴を有しうる。再度説明すると、発酵製品中のジアセチル濃度を決定するための様々なアッセイが該技術分野において知られており、本発明の目的のために使用することができる。発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるジアセチルの濃度を少なくとも50%を低減する能力は、好ましくは、以下を含むアッセイで決定される：

(1)

(a) 少なくとも 10^7 CFU/gの濃度の前記ラクトバチルス・ファーメンタムとスターーター培養物を有する乳をインキュベートすること、及び

(b) pHが4.6に達するまで発酵すること、により発酵乳製品を調製すること；

(2) 発酵乳製品を 7 ± 1 で14日間保存すること；並びに

(3) 1gの発酵乳製品に対し $200 \mu\text{l}$ の4N H₂SO₄を添加し、静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィーによりジアセチルの濃度を決定すること。

【0032】

低濃度のジアセチルを分泌するラクトバチルス・ファーメンタム菌は、これらの菌株を用いた食料製品を製造する方法において有利である。というのは、かかる揮発性化合物を高濃度で產生する菌株では、最終製品の味に影響を及ぼしてしまうので、すべての用途に使用できないからである。本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株は、0~3ppm又は0~2ppmの範囲内のジアセチルを分泌するということを特徴としてもよい。

【0033】

本発明の細菌は、有利には、以下の寄託株の1つに由来してもよい：

(a) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

10

20

30

40

50

Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
084で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC12798 ;

(b) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
085で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC12797 ;

(c) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
086で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC14591 ;

(d) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
087で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC14588 ;

(e) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
088で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15844 ;

(f) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
089で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15865 ;

(g) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
090で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15847 ;

(h) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
091で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15848 ;

(i) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 32
096で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15926 ;

(j) ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH ; DSMZ) . Inhoffenstr. 7B. D-38124 Braunschweigに受託番号 : 22
584で寄託されたラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC2008 ;

(k) (a) ~ (j) に記載の寄託細菌の1つから得ることができる変異株、ここで、該変異
株は、発酵後の貯蔵中に該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該
ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスターー培養物を用いて発酵させた乳
製品に比べて上昇させることを特徴とする。

【 0 0 3 4 】

この変異株によるpHの上昇は任意でよいが、好ましくは少なくとも0.1の値の上昇である。この上昇は、発酵製品を25℃で21日間保存した後に測定することが好ましい。

【 0 0 3 5 】

本出願の文脈において、用語「乳酸菌 (lactic acid bacteria)」又は「乳酸菌 (LAB)」は、糖の発酵の主な代謝最終産物として乳酸を生産する食品グレードの細菌を指す。これらの細菌は、共通の代謝的特徴及び生理学的特徴を有し、通常、グラム陽性、低GC、酸耐性、非胞子形成性、非呼吸性、棒状の桿菌又は球菌である。発酵段階では、これらの細菌による乳糖の消費が乳酸の形成を引き起こし、pHを低下させてタンパク質凝集物の形成をもたらす。したがって、これらの細菌は乳の酸性化及び乳製品の質感に関与する。本明細書で使用される用語「乳酸菌」は、ラクトバチルス属の種 (*Lactobacillus* spp.)、ビフィドバクテリウム属の種 (*Bifidobacterium* spp.)、ストレプトコッカス属の種 (*Streptococcus* spp.)、ラクトコッカス属の種 (*Lactococcus* spp.)といった属の細菌、例えば、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ラクトバチルス・ラクティス (*Lactobacillus lactis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus*

10

20

30

40

50

s. lactis)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、及びリューコノストック属の種 (*Leuconostoc spp.*) に属する細菌を包含するが、これらに限定されない。

【0036】

繁殖する最適温度によるが、乳酸菌は中温性又は好熱性乳酸菌としての特徴を有する。「中温性 (mesophile)」という用語は、中程度の温度で最も良好に繁殖する微生物を指す。用語「中温発酵 (mesophilic fermentation)」は、約22～約35の間の温度での発酵を指す。用語「中温発酵乳製品 (mesophilic fermented milk product)」は、中温性スターーター培養物の中温発酵により調製された発酵乳製品を指し、そのような発酵乳製品として、バターミルク、サワーミルク、カルチャードミルク、スマーナ、サワークリーム及びフレッシュチーズ、例えばクアーカー、トバログ及びクリームチーズが挙げられる。産業上最も有用な中温性細菌として、ラクトコッカス属の種及びリューコノストック属の種が挙げられる。

10

【0037】

用語「好熱性 (thermophile)」は、高温で最も良好に繁殖する微生物を指す。用語「好熱発酵 (thermophilic fermentation)」は、約35～約45で行う発酵方法を指す。用語「好熱発酵乳製品 (thermophilic fermented milk product)」は、好熱性スターーター培養物を用いる好熱発酵により調製された発酵乳製品を指し、そのような発酵乳製品として、セットヨーグルト、スタードヨーグルト、ステインドヨーグルト及び飲用ヨーグルトが挙げられる。産業上最も有用な好熱性細菌として、ストレプトコッカス属の種及びラクトバチルス属の種が挙げられる。

20

【0038】

以下に概説するように、本発明は、中温発酵及び好熱発酵を用いる方法を包含する。

【0039】

真菌、酵母及びカビに関して「阻害する」という用語は、例えば、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム株を含む食料製品内部及び/又は食料製品表面上の真菌、酵母及びカビの増殖又は胞子形成又は胞子数又は濃度が、かかる細菌を含まない食料製品に比べて低減することを指す。本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌によってもたらされる阻害の程度は、好ましくは、ラクトバチルス・ファーメンタム菌の存在下及び非存在下での寒天固化発酵乳における増殖によって決定される。

30

【0040】

本出願の文脈において、用語「変異株 (mutant)」は、遺伝子操作、放射線照射及び/又は化学処理などの手段により作製された本発明の株に由来する株として理解されるべきである。変異株は、本発明の寄託株と比較して機能的に同等の変異株、例えば、特に後酸性化を阻害する効果に関し、実質的に同一、又は改善された特性を有する変異株である。そのような変異株は、本発明の一部である。特に、用語「変異株 (mutant)」は、エタンメタンスルホン酸 (EMS) 又はN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン (NTG) などの化学変異原やUV光などによる処理を含む通常使用される任意の突然変異形成処理に本発明の株を供することにより取得された株、又は自然発生した突然変異株を指す。変異株は、複数の突然変異形成処理 (1つの処理は、1つの突然変異形成処理であって、その後にスクリーニング/選択工程が行われるものとして理解されるべきである) に供されたものでもよいが、好ましくは、20以下、又は10以下、又は5以下の処理 (又はスクリーニング/選択工程) が実施されたものであることが望ましい。好ましい変異株では、親株と比較して、細菌ゲノム中のヌクレオチドの5%未満、又は1%未満、又は0.1%未満が、別のヌクレオチドによりシフトしているか又は欠失している。

40

【0041】

本発明を説明する文脈における（特に以下の特許請求の範囲の文脈における）用語「a」及び「an」及び「the」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中に特に示さない限

50

り、又は文脈と明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を包含するものとして解釈すべきである。

【0042】

本発明は、以下のことを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌を少なくとも1種含む組成物も提供する；該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品は、上述のアッセイにおいて25℃で少なくとも14日間保存された場合pHを4.0超で維持する。

【0043】

それぞれの組成物は、乳酸菌を含め数多くのさらなる細菌を含んでもよい。本発明の好みしい組成物は、ラクトバチル属の種、ビフィドバクテリウム属の種、ストレプトコッカス属の種、ラクトコッカス属の種、例えば、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・ラクティス、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・プランタルム、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、及びリューコノストック属の種の一つ又は複数から選択される少なくとも1種の細菌を更に含むという特徴を有する。

10

【0044】

特に好みしい実施形態では、本発明の組成物は、上述の後酸性化を阻害する少なくとも1種のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌、並びに1種又は複数種の第2の細菌を含む。一実施形態では、本発明の後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌のいくつかの異なる株を組み合わせる。これらの更なる細菌は、例えば抗真菌活性を有する以下(a)～(e)の細菌より選択されてもよい：

20

- (a) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM32092で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC15860株；
- (b) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM23035で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC5366株；
- (c) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24616で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC12697株；
- (d) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24651で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC12777株；及び
- (e) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM25612で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC14676株。

30

【0045】

本発明の組成物は、さらに、1つ以上の凍結保護化合物(cryoprotective compounds)及び香味化合物を含め、多くの追加成分を含んでもよい。

【0046】

乳酸菌は、乳にスターーター培養物の形態で添加するのが最も一般的である。本文脈において使用される用語「スターーター」又は「スターーター培養物」は、乳ベースの酸性化に関する1種以上の食品グレードの微生物、特に乳酸菌の培養物を指す。スターーター培養物は新鮮でもよいが、凍結又は凍結乾燥状態が最も頻繁に見られる。これらの製品は、「ダイレクトバットセット」ト(Direct Vat Set)」(DVS)培養物として知られ、発酵乳製品又はチーズなどの乳製品を製造するための発酵容器又はバットに直接植菌するように生産される。それぞれのスターーター培養物は、多数の製造元から市販されており、その中には、F-DVS YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901、FD-DVS YF-812及びF-DVS CH-1が含まれる。これらの4つの培養物は、ストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカスの混合物を含み、Chr.Hansen社から市販されている。

40

【0047】

したがって、本発明の一態様は、上記のような後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌を含み、冷凍物1gあたり少なくとも 10^9 コロニー形成単位の濃度、又は冷凍物1gあたり少なくとも 10^{10} コロニー形成単位の濃度、又は冷凍物1gあたり少なく

50

とも 10^{11} コロニー形成単位の濃度で乳酸菌を含有する固体凍結又は凍結乾燥スター^ター培養物の形態の組成物を提供する。

【0048】

本発明はさらに、上記の特徴の複数を有することを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム菌及びそれを含む組成物を提供する。例えば、本発明は、発酵後の貯蔵中に該ラクトバチルス・ファーメンタムを含む発酵乳製品のpHを、該ラクトバチルス・ファーメンタムを含まない同じスター^ター培養物を用いて発酵させた乳製品に比べて上昇させることを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム種を提供する：

ここで、このpHの上昇は、少なくとも0.1の値の上昇であり、このpHの上昇は、スター^ター培養物と少なくとも 10^7 cfu/gの濃度のラクトバチルス・ファーメンタムを用いて発酵した製品を25℃で21日間保存した後に測定され、

この細菌は、発酵中の発酵乳製品におけるスター^ター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を少なくとも50%低減する能力を有する。

【0049】

更なる実施形態では、本発明は、上述の後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌又はそれを含む組成物を乳又は乳製品に添加すること、及び、pHが4.6未満に達するまで混合物を約22℃～約43℃の温度で発酵することを含む、発酵乳製品を製造する方法を提供する。

【0050】

本出願の文脈において、用語「乳」は、動物の乳腺又は植物によって產生される液体を指す一般的な意味で広範に使用される。本発明によれば、乳は加工されていてもよく、用語「乳」は、全乳、脱脂乳、無脂肪乳、低脂肪乳、全脂肪乳、低乳糖乳又は濃縮乳を含む。無脂肪乳は、無脂肪又はスキムミルクの製品である。低脂肪乳は、典型的には、約1%～約2%の脂肪を含む乳として定義される。全脂肪乳は2%以上の脂肪を含むことが多い。用語「乳」は、各種哺乳類及び植物由来のミルクを包含する意図である。乳の哺乳類の由来としては、牛、羊、山羊、水牛、ラクダ、ラマ、メア、及びシカが含まれるが、これらに限定されない。乳の植物由来としては、大豆、エンドウ豆、ピーナッツ、大麦、米、オート麦、キヌア、アーモンド、カシュー、ココナッツ、ヘーゼルナッツ、麻、ゴマの種及びヒマワリの種子から抽出された乳が含まれるが、これらに限定されない。本発明の方法及び製品において、牛由来の乳は、発酵のための出発物質として最も好ましく使用される。

【0051】

用語「乳」は、脂肪を低減した及び/又はラクトースを低減した乳製品も含まれる。それぞれの製品は、該技術分野で周知の方法を用いて調製することができ、市販されている（例えば、米国テキサス州Select Milk Producers Inc.から取得できる）。ラクトースを低減した乳は、ラクトースを、ラクトース酵素により、又はナノ濾過、電気透析、イオン交換クロマトグラフィー及び遠心分離によりグルコースやガラクトースに加水分解することを含む、該分野で公知の任意の方法に従って製造することができる。

【0052】

用語「乳製品」又は「乳ベース」は、本出願では、乳酸菌の増殖及び発酵のための培地として使用することができる乳又は乳成分ベースの組成物を指すのに広範に使用される。乳製品又は乳ベースは、乳酸菌を増殖又は発酵させる目的で使用できる乳由来の成分及びその他の成分を含む。

【0053】

発酵乳製品を製造する方法の発酵工程は、乳に乳酸菌を添加することを含む。乳製品の製造に用いられる発酵方法は周知であり、当業者は、温度、酸素、微生物の量及び特性、ならびに発酵時間を含む発酵方法の条件を選択することができる。

【0054】

発酵の前に、該技術分野で公知の方法に従い乳基質は均質化又は殺菌されてもよい。本明細書中、「均質化(homogenizing)」とは、可溶性の懸濁物又は乳液を取得するための

10

20

30

40

50

激しい混合を意味する。均質化を発酵の前に行う場合、乳脂肪が乳から分離しないほど小さなサイズに分散するように均質化してもよい。これは、乳を高圧で小さなオリフィスを通して押し出すことにより達成され得る。本明細書中、「殺菌（pasteurizing）」とは、生きた生物、例えば微生物を減少又は死滅させるために乳基質を処理することを意味する。好ましくは、殺菌は、一定時間、特定の温度で乳基質を維持することにより達成される。該特定の温度は、通常加熱により達成される。温度及び時間は、特定の細菌、例えば有害な細菌を死滅又は不活性化するように選択され得る。急速冷却工程が続いてもよい。

【0055】

特に有利な本発明の方法では、以下の(a)及び/又は(b)であるように、上述の後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌又はそれを含む組成物を乳又は乳製品に添加し、混合物を発酵する：

(a) 発酵終了時の発酵乳製品における後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌の濃度が少なくとも 1×10^6 cfu/g又は少なくとも 1×10^7 cfu/gである；及び/又は

(b) 発酵乳製品の表面における後酸性化を阻害するラクトバチルス・ファーメンタム菌の濃度が少なくとも 1×10^5 cfu/cm²である。

【0056】

この方法は、ラクトバチルス・ファーメンタム菌の後酸性化を阻害する効果を十分に利用できるという利点を有する。

【0057】

本発明は、発酵製品が7℃を超える温度、好ましくは7℃～25℃の温度で保存される方法も提供する。この製品は、任意の時間保存されうるが、好ましくは少なくとも14日間保存され、保存中、発酵乳製品のpHが4.0超で維持される。

【0058】

本発明はさらに、上述の発酵乳製品を製造する方法を含む、食料、飼料又は医薬製品を製造する方法、並びに、この方法によって得られる食料、飼料又は医薬製品を更に提供する。

【0059】

発酵は、食料製品、飼料製品又は医薬品を製造するために行われる。用語「発酵乳製品」、「食品」又は「飼料」製品は、本発明の発酵方法によって得られる製品を指し、チーズ、ヨーグルト、フルーツヨーグルト、ヨーグルト飲料、水切りヨーグルト（ギリシャヨーグルト、ラブネ）、クワルク、フロマージュ・フレ及びクリームチーズを含む。食料という用語は、発酵ソーセージといった発酵肉及び発酵魚製品を含む他の発酵食品をさらに包含する。

【0060】

用語「チーズ」は、以下のタイプのチーズ：カッテージ、フェタ、チェダー、パルメザン、モッツァレラ、エメンタール、ダンボ、ゴーダ、エダム、フェタタイプ、ブルーチーズ、塩漬けチーズ、カマンベール及びブリーチーズなどのハード、セミハード及びソフトチーズを含めたあらゆるチーズを包含すると理解される。当業者は、凝塊をチーズにどのように変換するか知っており、方法は、各文献中に見られる、例えば、Kosikowski, F.V., and V.V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CTを参照のこと。本明細書中に使用されるとき、1.7% (w/w) 未満のNaCl濃度を有するチーズは、「低塩チーズ (low-salt cheese)」と称される。

【0061】

本出願の文脈において、用語「ヨーグルト」は、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・デルブルッキー亜種ブルガリカス、そして場合により他の微生物、例えばラクトバチルス・デルブルッキー亜種ラクティス、ビフィドバクテリウム・アニマリス亜種ラクティス、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・パラカゼイ、又はそれらに由来する任意の微生物を含む製品を指す。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・デルブルッキー亜種ブルガリカ

10

20

30

40

50

ス以外の乳酸菌株も、最終製品に様々な特性、例えば腸内叢の平衡を促進する特性、を付与するために含まれる。本明細書で使用される用語「ヨーグルト」は、セットヨーグルト、スタードヨーグルト、飲用ヨーグルト、プチスイス、熱処理ヨーグルト、高タンパク質量及びヨーグルト風の製品であるという特徴を有する水切りヨーグルト又はギリシャスタイルヨーグルトを包含する。

【0062】

特に、用語「ヨーグルト」は、フランス及びヨーロッパの規制に従って定義される、特定の好熱性乳酸菌（つまり、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリカス及びストレプトコッカス・サーモフィルス）のみによる乳酸発酵によって得られた凝固乳製品であり、これらの菌が同時に培養され最終製品中に少なくとも 10×10^6 CFU（コロニー-形成単位）/gの量で生存しているヨーグルトも包含するが、これらに限定されない。ヨーグルトは場合により、酪農原料（例えば、クリーム）、あるいは砂糖又は甘味剤、1つ又は複数の香味料、果物、穀物、又は栄養物質、特にビタミン、ミネラル及び纖維、ならびに安定剤及び増粘剤といった他の成分を含有してもよい。必要に応じて、ヨーグルトはAFNOR NF 04-600規格及び/又はcodex StanA-IIa-1975規格の発酵乳及びヨーグルトの基準を満たす。AFNOR NF 04-600規格を満たすためには、製品は発酵後に加熱してはならず、酪農原料は完成品の最低70%（m/m）を占める必要がある。

10

【0063】

更なる実施形態では、本発明は、上述の後酸性化を阻害する1種又は複数種のラクトバチルス・ファーメンタム種の細菌、及び以下の(a)～(f)の1種又は複数種を含む食料、飼料又は医薬製品を提供する：

20

- (a) ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、リューコノストック属、シュードレノコストック属、ペディオコッカス属、プレビバクテリウム属及びエンテロコッカス属の1つ又は複数の属より選択される少なくとも1種の更なる細菌；
- (b) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM32092で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC15860株；
- (c) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM23035で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC5366株；
- (d) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24616で寄託されたラクトバチルス・ラムノサス菌CHCC12697株；
- (e) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM24651で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC12777株；及び
- (f) ドイツ微生物細胞培養コレクション(DSMZ)に受託番号DSM25612で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ菌CHCC14676株。

30

【実施例】

【0064】

実施例1：

ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591の後酸性化に対する影響の解析

均質化した低脂肪乳（1.5% w/v）を、 90 ± 1 °で20分間加熱処理し、そして急速に冷却した。市販のスター培養物（F-DVS Mild 2.0）を0.02%（v/w）で植菌し、植菌した乳を200 mlのボトルに分注した。1つのボトルには、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591を 2×10^7 CFU/gの総濃度で植菌し、2つのボトルには、2種類の市販の生物防除培養物（FreshQ（登録商標）4及びHoldbac（登録商標）YM-C Plus）を、推奨される用量で（FreshQ（登録商標）4及びHoldbac（登録商標）YM-C Plusはそれぞれ100U/T及び20DCU/100L）植菌し、そして、1つのボトルには、基準としてスター培養物のみ植菌した。全てのボトルは、 43 ± 1 °の水槽内でインキュベートし、4.60±0.1のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵後、ボトルを激しく振とうして凝塊を破壊し、氷上で冷却した。

40

【0065】

後酸性化に対する影響をモニターするために、4個の発酵乳サンプル（スター培養

50

物単独、並びにFreshQ（登録商標）4、Holdbac（登録商標）YM-C Plus及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591添加）を 7 ± 1 及び 25 ± 1 で21日間保存し、pHを1日目、7日目、14日目及び21日目に測定した。

【0066】

後酸性化に対する影響を図1に示す。図1は、乳の発酵中にラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591を添加すると、スターター培養物単独のみを使用する場合と比べ、特に、いずれも後酸性化をもたらす2種類の市販の生物防除培養物を使用する場合と比べて、後酸性化が低減することを示す。

【0067】

実施例2：10種のラクトバチルス・ファーメンタム株の後酸性化に対する影響の解析

10

均質化した低脂肪乳（1.5% w/v）を、 90 ± 1 で20分間加熱処理し、そして急速に冷却した。市販のスターター培養物（F-DVS YF-L901）を0.02% (v/w) で植菌し、植菌した乳を200 mlのボトルに分注した。10個のボトルには、ラクトバチルス・ファーメンタム株を 1×10^7 CFU/gの濃度で植菌し、そして、1つのボトルには、基準としてスターター培養物のみ植菌した。全てのボトルは、43±1 の水槽内でインキュベートし、4.60±0.1のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵後、ボトルを激しく振とうして凝塊を破壊し、氷上で冷却した。

【0068】

試験したラクトバチルス・ファーメンタム株は、以下の通りである：ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12798、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12797、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14588、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15844、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15865、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15847、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15848、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15926、及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC2008。

20

【0069】

後酸性化に対する影響をモニターするために、11個の発酵乳サンプル（スターター培養物単独、並びに10種のラクトバチルス・ファーメンタム株と組み合わせたスターター培養物）を 7 ± 1 及び 25 ± 1 で28日間保存し、pHを1日目、7日目、14日目、21日目及び28日目に測定した。

【0070】

30

後酸性化に対する影響を図2に示す。図2は、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12798、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12797、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14588、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15844、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15865、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15847、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15848、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15926、及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC2008はそれぞれ後酸性化をもたらさないあるいは基準ヨーグルトと比較して後酸性化を低減すらさせることを示す。

【0071】

先行技術の抗真菌性食品グレードの細菌は、スターター培養物によって引き起こされる後酸性化効果を増大させることが観察されたので、これらの知見は予想外であり、非常に重要である。

40

【0072】

実施例3：10種のラクトバチルス・ファーメンタム株のアセトアルデヒド含量に対する影響

10種のラクトバチルス・ファーメンタム株を、アセトアルデヒド含量を低減する能力について試験した。

【0073】

均質化した低脂肪乳（1.5% w/v）を、 90 ± 1 で20分間加熱処理し、そして急速に冷却した。市販のスターター培養物（F-DVS YF-L901 Yo-Flex（登録商標））を0.02% (v/w) で植菌し、植菌した乳を200 mlのボトルに分注した。10個のボトルには、ラクトバチ

50

ルス・ファーメンタム株を 1×10^7 CFU/gの濃度で植菌し、そして、1つのボトルには、基準としてスターーター培養物のみ植菌した。全てのボトルは、 43 ± 1 の水槽内でインキュベートし、 4.60 ± 0.1 のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵後、ボトルを激しく振とうして凝塊を破壊し、氷上で冷却した。すべてのボトルは 7 ± 1 で14日間保存した。

【0074】

14日目に、複雑なマトリックス中の揮発性物質を分析する高感度な方法である静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィー（HSGC）によりサンプルをアセトアルデヒドについて解析した。セットアップは、FID（Flame Ionization Detector）を備えたガスクロマトグラフに接続された静的ヘッドスペースサンプラーから構成されていた。その目的のために、以下の装置を使用した：

HSオートサンプラー： HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

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

GC： Autosystem XL, Perkin Elmer.

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

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

【0075】

既知の濃度の標準液を用いて応答因子を決定し（較正）、使用した応答因子が分析希釈系内および希釈系間、そして経時的（月）にわたり安定であるよう制御するために対照を使用した。サンプルおよび対照における揮発性物質の濃度（ppm）は、標準液から得た応答因子を用いて決定した。1gのヨーグルトサンプルに $200 \mu\text{l}$ の4N H₂SO₄を添加することによってサンプルを調製し、直ちにHSGCで分析した。

【0076】

結果を図3に示す。図3は、株ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12798、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12797、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14588、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15844、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15865、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15847、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15848、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15926、及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC2008はそれぞれ発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって産生されるアセトアルデヒドの濃度を低減する能力を有することを示す。

【0077】

実施例4：1種のラクトバチルス・ファーメンタム株のアセトアルデヒド含量に対する影響

1種のラクトバチルス・ファーメンタム株を、アセトアルデヒド含量を低減する能力について試験した。

【0078】

均質化した低脂肪乳（1.5% w/v）を、 90 ± 1 で20分間加熱処理し、そして急速に冷却した。市販のスターーター培養物（F-DVS Mild 2.0）を0.02% (v/w) で植菌し、植菌した乳を2つの200mlのボトルに分注した。1つのボトルには、ラクトバチルス・ファーメンタム株を 1×10^7 CFU/gの濃度で植菌し、そして、1つのボトルには、基準としてスターーター培養物のみ植菌した。両方のボトルは、 43 ± 1 の水槽内でインキュベートし、 4.60 ± 0.1 のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵後、ボトルを激しく振とうして凝塊を破壊し、氷上で冷却した。これらのボトルは 7 ± 1 で14日間保存した。

【0079】

14日目に、複雑なマトリックス中の揮発性物質を分析する高感度な方法である静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィー（HSGC）によりサンプルをアセトアルデヒドについて解析した。セットアップは、FID（Flame Ionization Detector）を備えたガスクロマトグラフに接続された静的ヘッドスペースサンプラーから構成されていた。その目的のために、以下の装置を使用した：

HSオートサンプラー： HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

10

20

30

40

50

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

GC： Autosystem XL, Perkin Elmer.

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

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

【0080】

既知の濃度の標準液を用いて応答因子を決定し（較正）、使用した応答因子が分析希釀系内および希釀系間、そして経時的（月）にわたり安定であるよう制御するために対照を使用した。サンプルおよび対照における揮発性物質の濃度（ppm）は、標準液から得た応答因子を用いて決定した。1gのヨーグルトサンプルに200 μlの4N H₂SO₄を添加することによってサンプルを調製し、直ちにHSGCで分析した。

10

【0081】

結果を図4に示す。図4は、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591は発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を低減する能力を有することを示す。

【0082】

実施例5：市販のスターーター培養物の機能的解析

本明細書に記載の3種の市販のスターーター培養物を、異なる酸性化プロファイルに基づいて選択した。3種は冷凍されたF-DVS CH-1、F-DVS YoFlex Mild 2.0及びF-DVS YF-L901であり、1種は凍結乾燥されたFD-DVS YF-L812である。酸性化プロファイルの違いを試験するために、半脂肪乳を脱脂乳粉末で1%脂肪及び4.5%タンパク質に標準化し、85 ± 1で30分間熱処理し、直ちに冷却した。4種の異なる市販のスターーター培養物（F-DVS CH-1、F-DVS YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901又はFD-DVS YF-L812）のうち1種を0.02%（v / w）で植菌し、植菌した乳を200mlのボトルに分注した。これらのボトルは、43 ± 1 の水槽内でインキュベートし、4.5のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵の間中、pHを連続的に測定した。その後、これらのボトルは6 で43日間保存し、pHを7日間の間隔で測定し、後酸性化のレベルを決定した。

20

【0083】

3種の市販のスターーター培養物（F-DVS CH-1、F-DVS YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901又はFD-DVS YF-L812）の酸性化プロファイルを図5に示す。F-DVS CH-1は、4.87時間でpH4.55に達する速い発酵時間を示した。F-DVS YoFlex Mild 2.0は、5.29時間でpH4.55に達する中程度の発酵時間を示した。FD-DVS YF-L812及びF-DVS YF-L901は、それぞれ6.45及び5.87時間でpH4.55に達する遅い発酵時間を示した。後酸性化プロファイルは、FD-DVS YF-L812とF-DVS YoFlex Mild 2.0では非常に低い後酸性化のレベルを示し（6 で43日間の保存後 pH = 0.12及び pH = 0.11）、F-DVS YF-L901では中程度の後酸性化のレベルを示し（6 で43日間の保存後 pH = 0.26）、F-DVS CH-1では高い後酸性化のレベルを示した（6 で43日間の保存後 pH = 0.55）（図6）。

30

【0084】

実施例6：2種の異なるスターーター培養物で発酵させた場合における、9種のラクトバチルス・ファーメンタム株のアセトアルデヒド含量に対する影響

9種のラクトバチルス・ファーメンタム株を、アセトアルデヒド含量を低減する能力について試験した。

40

【0085】

均質化した低脂肪乳（1.5%w / v）を、90 ± 1 で20分間加熱処理し、そして急速に冷却した。2種の市販のスターーター培養物（F-DVS CH-1又はFD-DVS YF-L812）を0.02%（v / w）で植菌し、植菌した乳を2つの200mlのボトルに分注した。9つのボトルには、ラクトバチルス・ファーメンタム株を 1×10^7 CFU / gの濃度で植菌し、そして、1つのボトルには、基準としてスターーター培養物のみ植菌した。全てのボトルは、43 ± 1 の水槽内でインキュベートし、4.55 ± 0.1のpHになるまでこの条件で発酵させた。発酵後、ボトルを激しく振とうして凝塊を破壊し、氷上で冷却した。これらのボトルは7 ± 1 で14日間保存した。

【0086】

50

試験したラクトバチルス・ファーメンタム株は、以下の通りである：ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12798、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12797、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14588、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15844、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15865、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15847、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15926、及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC2008。

【0087】

14日目に、複雑なマトリックス中の揮発性物質を分析する高感度な方法である静的ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(HSGC)によりサンプルをアセトアルデヒドについて解析した。セットアップは、FID(Flame Ionization Detector)を備えたガスクロマトグラフに接続された静的ヘッドスペースサンプラーから構成されていた。その目的のために、以下の装置を使用した：

HSオートサンプラー： HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

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

GC： Autosystem XL, Perkin Elmer.

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

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

【0088】

既知の濃度の標準液を用いて応答因子を決定し(較正)、使用した応答因子が分析希釈系内および希釈系間、そして経時的(月)にわたり安定であるよう制御するために対照を使用した。サンプルおよび対照における揮発性物質の濃度(ppm)は、標準液から得た応答因子を用いて決定した。1gのヨーグルトサンプルに200 μlの4N H₂SO₄を添加することによってサンプルを調製し、直ちにHSGCで分析した。

【0089】

結果を図7に示す。図7は、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12798、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC12797、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14591、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC14588、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15844、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15865、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15847、ラクトバチルス・ファーメンタムCHCC15926、及びラクトバチルス・ファーメンタムCHCC2008のそれぞれの株は、発酵中の発酵乳製品におけるスターーター培養物によって產生されるアセトアルデヒドの濃度を低減する能力を有することを示す。

【0090】

参考文献

1. Tamime, A. Y., and H. C. Deeth. 1980. Yoghurt: technology and biochemistry. J. Food Prot. 43:939-977.
2. A. C. S. D. Chaves, M. Fernandez, A. L. S. Lerayer, I. Mierau, M. Kleerebezem, and J. Hugenholz, 2002, Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *S treptococcus thermophilus*
3. Lees, G. J., and G. R. Jago. 1976. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. J. Dairy Res. 43:75-83.
4. Kurmann, J.A. (1982) Die Obersauerung der Joghurtgallerte, ein häufig auftretender und zu wenig beachteter Produktionsfehler, dessen Entstehung und Bekämpfung. Dt. Molkerei-Zeitung 103, 690-698.

【0091】

寄託と専門家のソリューション

出願人は、下記の寄託された微生物の試料が、特許登録の日まで、専門家のみに利用可能であるべきことを要求する。

【0092】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC12798は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

10

20

30

40

50

; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32084で寄託された。

【0093】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC12797は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32085で寄託された。

【0094】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC14591は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32086で寄託された。

10

【0095】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC14588は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32087で寄託された。

【0096】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15844は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32088で寄託された。

20

【0097】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15865は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32089で寄託された。

【0098】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15847は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32090で寄託された。

30

【0099】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15848は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32091で寄託された。

【0100】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC15926は、2015年7月22日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：32096で寄託された。

40

【0101】

ラクトバチルス・ファーメンタム株CHCC2008は、2009年5月19日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) , Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号：22584で寄託された。

【0102】

ラクトバチルス・ラムノサス株CHCC15860は、2015年7月16日付で、ドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DS

50

MZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweigに、受託番号 : 32092で寄託された。

【0103】

寄託は、特許手続上の微生物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。

【図1】

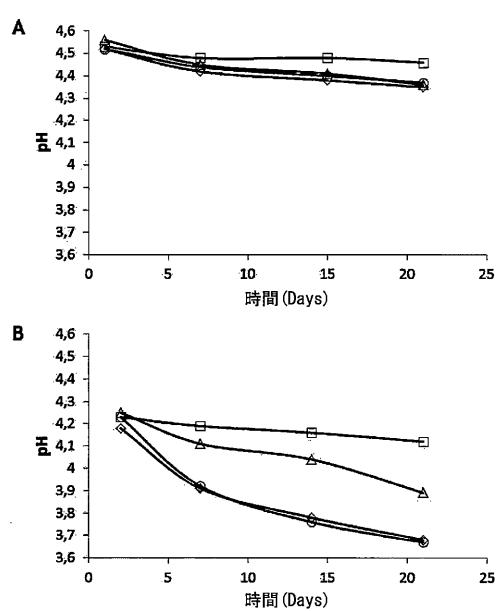


Figure 1

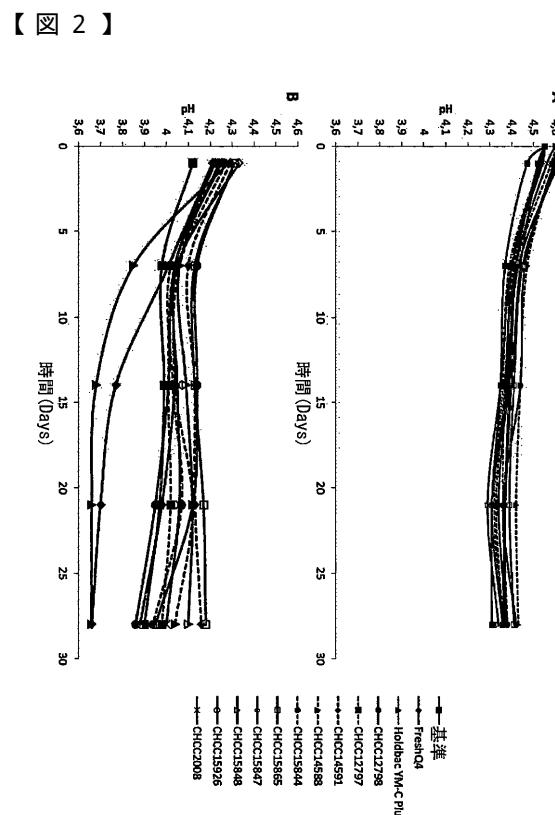


Figure 2

〔 図 3 〕

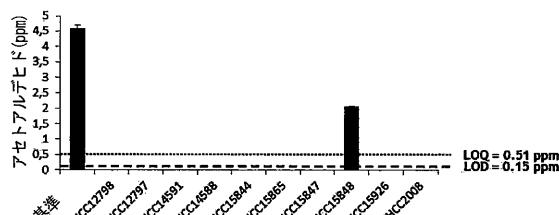


Figure 3

【図4】

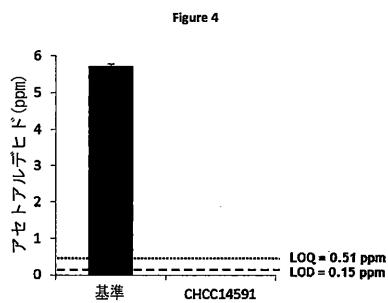


Figure 4

【 図 5 】

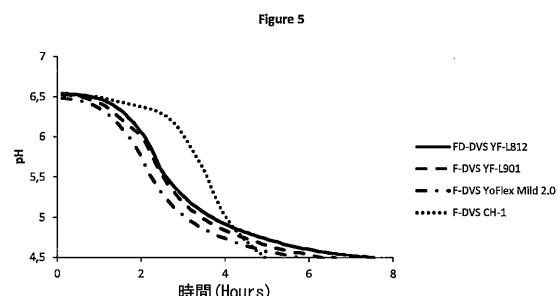


Figure 5

【 図 6 】

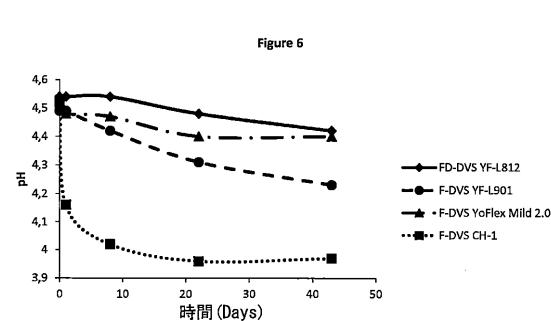
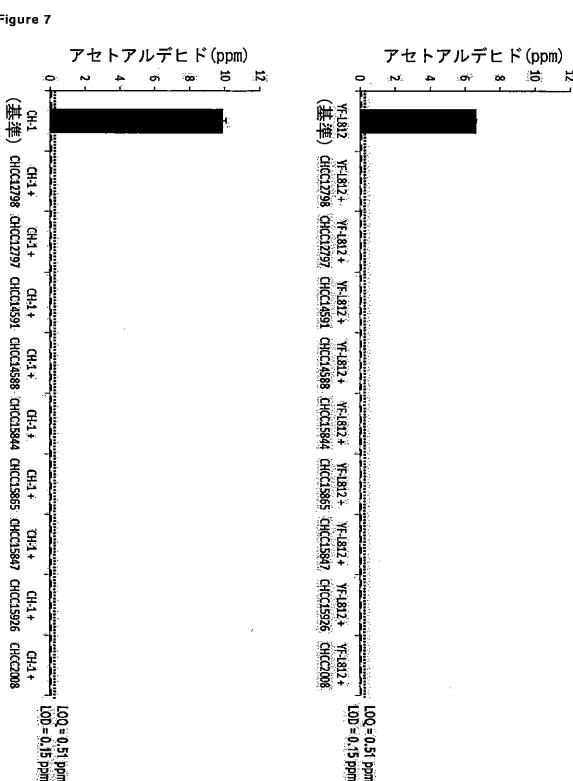


Figure 6

【 四 7 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/070398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23C9/123 C12R1/225
ADD.

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)
A23C C12R

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/000879 A2 (CHR HANSEN AS [DK]; FOLKENBERG DITTE MARIE [DK]; POULSEN LONE [DK]) 6 January 2011 (2011-01-06) claim 21; examples 1, 2; tables 1, 2 -----	1-10, 12-20
Y		11
X	BILGIN B ET AL: "Assessment of novel human origin Lactobacillus isolates for the manufacture of probiotic yoghurt-like product", MILCHWISSENSCHAFT, VV GMBH VOLKSWIRTSCHAFTLICHER VERLAG. MUNCHEN, DE, vol. 65, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 65-69, XP008133925, ISSN: 0026-3788 page 66, paragraph 2.2; table 1 page 67, paragraphs 3.1, 3.2, 3.4; figures 1-3, 6 ----- -/-	1-8,10, 14,15, 17-20

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

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

Date of mailing of the international search report

8 November 2016

16/11/2016

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

Smeets, Dieter

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/070398

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/136830 A1 (CHR HANSEN AS [DK]; HORNBAEK TINA [DK]; LISBERG MAIKE [DK]; DIEMER SIL) 11 October 2012 (2012-10-11) claims -----	11
Y	WO 2013/153074 A1 (CHR HANSEN AS [DK]) 17 October 2013 (2013-10-17) claims -----	11
Y	WO 2013/153070 A1 (CHR HANSEN AS [DK]) 17 October 2013 (2013-10-17) claims -----	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/070398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011000879 A2	06-01-2011	BR	PI1015366 A2	01-09-2015
		CN	102469804 A	23-05-2012
		EA	201270095 A1	29-06-2012
		EP	2448420 A2	09-05-2012
		JP	2012531189 A	10-12-2012
		KR	20120107451 A	02-10-2012
		UA	106381 C2	26-08-2014
		US	2012107451 A1	03-05-2012
		US	2014348980 A1	27-11-2014
		WO	2011000879 A2	06-01-2011
<hr/>				
WO 2012136830 A1	11-10-2012	AR	085943 A1	06-11-2013
		BR	112013025912 A2	20-09-2016
		CN	103596435 A	19-02-2014
		EA	201391500 A1	28-02-2014
		EP	2693885 A1	12-02-2014
		JP	2014512178 A	22-05-2014
		KR	20140026468 A	05-03-2014
		US	2014093487 A1	03-04-2014
		WO	2012136830 A1	11-10-2012
<hr/>				
WO 2013153074 A1	17-10-2013	AR	090631 A1	26-11-2014
		CN	104284975 A	14-01-2015
		EA	201491847 A1	29-05-2015
		EP	2836587 A1	18-02-2015
		HK	1206391 A1	08-01-2016
		JP	2015515273 A	28-05-2015
		KR	20140148479 A	31-12-2014
		US	2015079057 A1	19-03-2015
		WO	2013153074 A1	17-10-2013
<hr/>				
WO 2013153070 A1	17-10-2013	CN	104254599 A	31-12-2014
		EA	201491848 A1	30-01-2015
		EP	2836588 A1	18-02-2015
		HK	1206390 A1	08-01-2016
		JP	2015519042 A	09-07-2015
		KR	20140148480 A	31-12-2014
		US	2015064152 A1	05-03-2015
		WO	2013153070 A1	17-10-2013

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 2 3 K 10/28 (2016.01)	A 2 3 K 10/28	
A 2 3 K 10/18 (2016.01)	A 2 3 K 10/18	

(81) 指定国 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,R0,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,DK,DM,D0,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

(74) 代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72) 発明者 スィスィーリエ ルグ マルビ ニルスン
デンマーク国, 2700 ブレンスホイ, アガスボルバイ 13, 1. テホ

(72) 発明者 ティーナ ホアンベク
デンマーク国, 3460 ビアゲレズ, ループビエア 6

(72) 発明者 ピーア ラスムスン
デンマーク国, 2610 レズオウア, モレロプバイ 5

(72) 発明者 ローネ ポウルスン
デンマーク国, 4340 トゥルーセ, オンルーセ, ホルベクバイ 31

F ターム(参考) 2B150 AC06 AC07

4B001 AC31 BC14 EC99
4B064 AH19 BD03 CA02 CC22 DA01 DA10 DA11
4B065 AA01X AA22X AA30X AA39X AA49X BB24 BC02 CA41 CA42 CA43
CA44
4C087 AA02 BC56 CA10 MA52 NA20 ZC21