

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5866361号  
(P5866361)

(45) 発行日 平成28年2月17日 (2016. 2. 17)

(24) 登録日 平成28年1月8日 (2016. 1. 8)

(51) Int. Cl.

F I

**A 2 3 L 33/10 (2016. 01)**

A 2 3 L 1/30 Z

**A 2 3 L 2/00 (2006. 01)**

A 2 3 L 2/00 A

**A 2 3 L 5/00 (2016. 01)**

A 2 3 L 1/00 C

**C 1 2 N 1/00 (2006. 01)**

C 1 2 N 1/00 N

**A 2 3 K 20/00 (2016. 01)**

A 2 3 K 1/16 3 0 4 B

請求項の数 10 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2013-526212 (P2013-526212)  
 (86) (22) 出願日 平成23年9月6日 (2011. 9. 6)  
 (65) 公表番号 特表2013-537037 (P2013-537037A)  
 (43) 公表日 平成25年9月30日 (2013. 9. 30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/050514  
 (87) 国際公開番号 W02012/027758  
 (87) 国際公開日 平成24年3月1日 (2012. 3. 1)  
 審査請求日 平成26年9月5日 (2014. 9. 5)

(73) 特許権者 502141050  
 ダウ グローバル テクノロジーズ エル  
 エルシー  
 アメリカ合衆国 ミシガン州 4 8 6 7 4  
 , ミッドランド, ダウ センター 2 0 4  
 O  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100102990  
 弁理士 小林 良博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロバイオティックスの貯蔵安定性を高める方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、  
 プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を形成すること、

前記微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に導入すること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分 1 0 % を超える残留水分レベルを有する、及び

前記食品又は飲料を消費前に冷凍せずに少なくとも 6 週間貯蔵すること、  
 を含み、前記静菌剤がラウリン酸である、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法。

【請求項 2】

前記プロバイオティックは、 $1 \log \text{ c f u}$  以下の個体群の減少を経験する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記高分子量ポリマーがエチルセルロースである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記高分子量ポリマーがアルギネートである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記微小球が飲料中に存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記飲料が 5 未満の pH を有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記微小球が、残留水分レベルが水分 20 % を超える食品中に存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記微小球がワックスを含まないことを条件として、前記微小球が多層組成物を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記微小球が 500 ミクロン未満の粒径を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、

プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を用意すること、

前記微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に入れること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分 10 % を超える残留水分レベルを有する、及び

水を前記微小球中に入らせること、

を含み、前記静菌剤がラウリン酸であり、前記プロバイオティックは、前記食品又は飲料を冷凍せずに少なくとも 6 週間貯蔵した後に  $1.5 \log \text{ cfu}$  以下の個体群の減少を経験する、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、プロバイオティックス (probiotics) に関し、より具体的には、食品及び飲料中でプロバイオティックスを安定化する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

プロバイオティックスは、適量で被験体に投与された場合に、当該被験体に健康上の利益をもたらす生きている微生物、好ましくは細菌である。幾つかの健康上の利益は、菌株特異的、すなわち、属及び種によって変わることがあるが、利益のタイプにかかわらず、利益を与えるためには、有効量の細菌が投与時に生きている（又は生存可能である）ことが必要である。当該技術分野でのこの重要な事柄のために、乾燥貯蔵安定性 (dry shelf stability) と、プロバイオティックスが被験体の胃を通過する際にプロバイオティックスを保護する腸溶性コーティングに関する方策についてかなりの研究がなされてきた。安定性は、典型的には、生菌の減少として求められ、例えば、コロニー形成単位 (cfu) の  $1 \log$  の減少は 10 倍の減少である。

【0003】

従来知見に従う貯蔵安定性に関する問題に関し、当業者は、細菌を凍結乾燥し、次に、通常、疎水性コーティングを使用することによってそれらを乾燥した状態に保つことに努力を集中してきた。それにもかかわらず、乾燥環境中であっても、活性は経時的に減少するようである。湿度が水分約 10 % である環境中では、活性は急激に低下する。例えば、米国特許出願第 2005/0266069 号明細書の段落 [0025] には、水分 10 % の環境中にある 1 つの種類のカプセル化されたプロバイオティックについて、37 で 14 日間で  $4 \log$  の減少が報告されている。食品は、典型的には、ドライ（理論的には水分 0 ~ 15 %）、セミモイスト (semi-moist)（水分 15 ~ 70 %）、又はモイスト (moist)（70 ~ 90 %）として記載される。飲料は、明らかに、水分 90 % を超える。理解されるように、乾燥環境に限られている場合に、大きなマーケットセグメントは、プロバイオティックスに対して依然として閉鎖的であるか、又は有効量が生き延びることを期待して非常に過剰のプロバイオティックスを投与することを要求する。

【先行技術文献】

## 【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願第2005/0266069号明細書

## 【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、必要とされているのは、水分が10%を超える食品中又は飲料中でのプロバイオティックスの貯蔵安定性を高める方法である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一実施形態において、本発明は、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を形成すること、微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に導入すること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分10%を超える残留水分レベルを有する、及び、前記食品又は飲料を消費前に冷凍せずに少なくとも6週間貯蔵することを含む、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法を提供する。

【0007】

別の実施形態において、本発明は、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を用意すること、微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に入れること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分10%を超える残留水分レベルを有する、及び、水を微小球中に入らせることを含み、プロバイオティックは、前記食品又は飲料を冷凍せずに少なくとも6週間貯蔵した後に $1.5 \log \text{ cfu}$ 以下の個体群の減少を経験する、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0008】

「貯蔵安定」とは、プロバイオティックが、その健康上の利益を与えるのに十分な生存能を保持することを意味する。かかる量は、プロバイオティックの各菌株について当業者に知られている。好ましい一実施形態において、プロバイオティックは、 $1.5 \log \text{ cfu}$ 未満、好ましくは $1.3 \log \text{ cfu}$ 未満、好ましくは $1.1 \log \text{ cfu}$ 未満、好ましくは $1.0 \log \text{ cfu}$ 未満、好ましくは $0.9 \log \text{ cfu}$ 未満、好ましくは $0.8 \log \text{ cfu}$ 未満の個体群の減少を経験する。

【0009】

これまで、当業者は、安定性を保つためにプロバイオティックを乾燥した状態に保つことは必須であると考えていた。出願人は、後述するように、有効量の静菌剤が含まれることを条件として、半透過性微小球を使用して良好な安定性を達成できることを驚くべきことに見出した。「半透過性」は、水に対して透過性であることを意味する。一実施形態において、透過性は、高分子量ポリマーに応じて変わる。

【0010】

微小球は、様々な従来の方法、例えば、流動床アグロメレーション、ゲルビーズ形成、噴霧乾燥、又はフォーム造粒などにより形成できる。一実施形態において、微小球が平均で500ミクロン未満の粒径を有するように条件が制御される。典型的には、プロバイオティックを、凍結乾燥し、次に、コーティング、分散、又は他の方法で微小球中に取り込ませる。一実施形態において、微小球は多層組成物である。多層の実施形態の一実施形態において、微小球はワックスを含まない。

【0011】

好適なプロバイオティック微生物の例としては、酵母、例えばサッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、デバロマイセス属 (*Debaromyces*)、カンジダ・ピキア (*Candida Pichia*) 及びトルロプシス属 (*Torulopsis*) など、カビ、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、リゾプス属 (*Rhizopus*)、ムコール属 (*Mucor*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*) 及

10

20

30

40

50

びペニシリウム属 (*Penicillium*)、並びに細菌、例えばビフィドバクテリウム属、バクテロイド属 (*Bacteroides*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、紡錘菌属 (*Fusobacterium*)、メリソコッカス属 (*Melissococcus*)、プロピオニバクテリウム属 (*Propionibacterium*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、コクリア属 (*Kocuriaw*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、ペプトストレプトコッカス属 (*Peptostrepococcus*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus*)、ミクロコッカス属 (*Micrococcus*)、リユーコノストック属 (*Leuconostoc*)、ワイセラ属 (*Weissella*)、アエロコッカス属 (*Aerococcus*)、オエノコッカス属 (*Oenococcus*) 及び 乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) などが挙げられる。乳酸桿菌の非限定的例としては、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*)、ラクトバチルス・アリメンタリウス (*L. alimentarius*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*L. amylovorus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*L. crispatus*)、ラクトバチルス・ブレビス (*L. brevis*)、ラクトバチルス・カセ4 (*L. case4*)、ラクトバチルス・クルバタス (*L. curvatus*)、ラクトバチルス・セロピオサス (*L. cellobiosus*)、ラクトバチルス・デルブレッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス (*L. delbrueckii* ss. *Bulgaricus*)、ラクトバチルス・ファルシミニス (*farciminis*)、ラクトバチルス・ファーメンタム (*L. fermentum*)、ラクトバチルス・ガセリ (*L. gasseri*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*L. helveticus*)、ラクトバチルス・ラクチス (*L. lactis*)、ラクトバチルス・プランタラム (*L. plantarum*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*L. johnsonii*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*L. reuteri*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*L. rhamnosus*)、ラクトバチルス・サケイ (*L. sakei*)、及びラクトバチルス・サリバリウス (*L. salivarius*) が挙げられる。

#### 【0012】

好適なプロバイオティックスは、Jarrow Formulasから入手することができ、例えばラクトバチルス・プランタラム 299v (*Lactobacillus plantarum* 299v) (Ideal Bowel Support(登録商標) 299vの活性成分; 100億個の生菌数)であり、又はカスタムプロバイオティックス、例えばラクトバチルス・プランタラム (*L. plantarum*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*L. rhamnosus*)、又はラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*) である。

#### 【0013】

「高分子量ポリマー」は、質量平均分子量が50,000を超える。例えば、ケラチン、カゼイン、アルブミン、コラーゲン、グルテリン、グルカゴン、グルテン、ゼイン、ゼラチンおよびそれらの誘導体、キチンから又はキトサンから誘導されたポリマー、多糖ポリマー、例えばセルロース系ポリマー、例えばエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース及び第四級化セルロース誘導体など、澱粉及びそれらの誘導体、アクリル系ポリマー又はコポリマー、例えばポリアクリレート、ポリメタクリレート及びそれらの共重合体など、ポリビニルアルコール、天然由来のポリマー(必要に応じて第4級化されたものであってもよい)、例えばアラビアガム、グアーガム、キサンタン誘導体又はカラヤガム、アルギネート、カラギーナン、ウルバン及び他の藻類コロイド、グリコアミノグリカン、ヒアルロン酸及びその誘導体、シェラック、サンダラックガム、ダンマル樹脂、エレミガム及びコパール樹脂、デオキシリボ核酸、ムコ多糖類、例えばヒアルロン酸など、コンドロイチン硫酸、カプロラクタム、プルラン、ペクチン、マンナン及びガラクトマンナン、及びグルコマンナン、並びにそれらの混合物及び/又はそれらの誘導体などの、多くの合成、天然又は変性ポリマーが意図される。前述の例示的なリストはともかく、多くの食品グレードの高分子量ポリマーが意図されることが理解されるであろう。

#### 【0014】

好ましい高分子量ポリマーの非限定的な例としては、エチルセルロース及びアルギネートが挙げられる。必要に応じて、2種以上の高分子量ポリマーをブレンドしてもよい。

## 【 0 0 1 5 】

理論に縛られるわけではないが、静菌剤は半透過性微小球の1つの重要な特徴である。添付の実施例から分かるように、少なすぎる静菌剤及び多すぎる静菌剤は両方とも生存率の低下をもたらす。静菌剤は、ナイシン、デカン酸、ラウリン酸、キトサン、安息香酸ナトリウム、フマル酸、ソルビン酸カリウム、PABA、プロピオン酸、トリクロサン、及びリノール酸から選択することができる。

## 【 0 0 1 6 】

一実施形態において、静菌剤はラウリン酸である。静菌剤がラウリン酸である場合、ラウリン酸は、約0.3～約15、好ましくは約0.3～約12、好ましくは約0.4～約11、好ましくは約0.5～約10の質量%範囲（微小球の全質量に対する）で好ましくは存在する。さらに、上記の範囲内の部分的組み合わせが意図される。

10

## 【 0 0 1 7 】

本発明の微小球は、食品又は飲料中に組み込まれた場合、プロバイオティックスを安定化してより長い貯蔵寿命をもたらす。残留水分レベルが水分20%を超える、好ましくは水分30%を超える、好ましくは水分40%を超える、より好ましくは水分50%を超える比較的高湿度の食品中に微小球が存在する状況が特に好ましい。

## 【 0 0 1 8 】

水分活性は、（所与の温度での製品の表面における水蒸気の分圧）/（同じ温度での純水の飽和蒸気圧）である。食品分野では、0.3以上乃至0.5以下の水分活性はセミドライ（semi-dry）と見なされており、0.5超乃至0.7以下の水分活性はセミモイストと見なされており、0.7を超える水分活性はモイストと見なされている。過去において、プロバイオティックスを含むセミモイスト及びモイスト食品は冷凍を必要とすると考えられていた。

20

## 【 0 0 1 9 】

一実施形態において、0.6を超える水分活性、好ましくは0.7を超える水分活性、好ましくは0.8を超える水分活性、より好ましくは0.9を超える水分活性を有する比較的高湿度の食品中に微小球が存在する。

## 【 0 0 2 0 】

一実施形態において、比較的高湿度の食品としては、ペットフード、スナックフード、ヘルスバー及び調理されていない予め包装された混合物、例えば粉ミルクなどが挙げられる。

30

## 【 0 0 2 1 】

一実施形態において、微小球は飲料中に存在する。参考のため、ほとんどの飲料の水分活性は1.0である。一実施形態において、飲料は5未満のpHを有する。かかる飲料の例としては、果汁及び清涼飲料（炭酸飲料）が挙げられる。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 2 2 】

以下の例は例示のためだけのものであり、本発明の範囲を限定することを意図していない。全ての百分率は、特に断らない限り、質量を基準とする。

## 【 0 0 2 3 】

40

## 例 1

本発明の典型的な微小球を、ミシガン州ミッドランドのザ・ダウ・ケミカル・カンパニー（The Dow Chemical Company）から入手可能なETHOCELエチルセルロース（エトキシル含有量48.0%～49.5%、25 でウッペローデ粘度計により5%（80：20トルエン：エタノール）溶液中で測定した溶液粘度12.6～15.4 cP）を3.33%とラウリン酸を含む安定化用材料によりCustom Probiotics Inc製の凍結乾燥されたラクトパチルス・ラムノサス（L. rhamnosus）（出発質量100g）を変換することにより形成した。ラウリン酸及びエチルセルロースを、酢酸エチル80% / エタノール20%の溶剤ブレンド中に分散させて安定化用溶液を形成した。

## 【 0 0 2 4 】

50

上記安定化用溶液をウルスター（Wurster）法を使用して流動床コーターにより細菌に適用した。ウルスター法は、流動床コーターチャンバー中に窒素流により懸濁された固体粒子の流動床の底部にあるスプレーノズルの位置により特徴付けられる。粒子はスプレーノズルの上方の環状流に同伴する。ノズルスプレーは、粒子上に安定化用溶液の噴霧流をスプレーし、これにより均一な微小球が生じる。設定温度は80であった。この温度により、約55のチャンバー温度がもたらされた。流速は0.6g/分であった。プロセス圧は0.8バールであった。ノズル圧は1.8バールであった。このプロセスによって、光学顕微鏡により求めた場合に、粒径の平均が上記の500ミクロンの範囲内にある均一な球状粒子が生じた。

【0025】

10

微小球中に含まれていたラウリン酸の量を、各流動床被覆工程の最後に回復した細菌の量と各工程中にチャンバー中に噴射した安定化用溶液の総量とに基づいて推定した。微小球の組成を計算し、表1に質量％範囲（微小球の総質量に対する）で示す。

【0026】

【表1】

表1

バッチ	プロバイオティック	ポリマー	ラウリン酸
A	61.92	29.28	8.79
B	75.99	18.46	5.54

20

【0027】

例2

本発明の典型的な微小球を、プロバイオティック含有粉末（バッチDは、Ideal Bowel Support（登録商標）299v（活性成分ラクトバチルス・プランタラム（*L. plantarum*）299v；1カプセル当たり100億個の生菌数）のカプセルを開けることにより得たJarrow Formulas製の5.4gのラクトバチルス・プランタラム（*L. plantarum*）299vと不活性成分；バッチEは、Custom Probioticsから入手した7.3gのラクトバチルス・プランタラム（*L. plantarum*）を0.27gのラウリン酸及びココナッツ油（C=21.33g（39.5%）；D=19.43g（36%））とともに噴霧乾燥することにより形成した。ラウリン酸及び油をプロバイオティックと共に高温（40～45）で溶融及び混合した。この混合物27gを100gのSURELEASE（ETHOCELエチルセルローズ分散液（固形分27%））中に分散させることにより調製し、粘度を調整するためにさらなる滅菌水を加えた。分散混合物を、Mobile Minorスプレードライヤーに備え付けられた二液ノズルアトマイザーに送り込んだ。ノズルに対する空気圧を、6kg/時の空気流に等価な50%の流れで1バールに固定した。噴霧乾燥は、窒素環境中で行い、入口温度を140に固定し、混合物の供給速度を調整することにより出口温度を50 ± 1に設定した。サイクロンを使用して微小球を集め、次に、残留水分を除去するために微小球を真空引きした。微小球の組成を計算し、表2に質量％範囲（微小球の総質量に対する）で示す。

30

40

【0028】

## 【表 2】

表 2

バッチ	プロバイオティック	ポリマー	ラウリン酸
C	10.0	50.0	0.5
D	13.5	50.0	0.5

## 【0029】

10

粉末の得られた粒径は、コールターカウンター技術により求めた場合に、平均粒径 4.3 ミクロンであった。

## 【0030】

例 3

本発明の典型的な微小球をゲルビーズ形成 (gel beading) により形成した。ココナッツ油 (バッチごとにそれぞれ 2.85 g、1.5 g、0.75 g 及び 0) とラウリン酸の混合物を 55 でブレンドし溶融させた。各得られた溶融物を細菌粉末 (Ideal Bowel Support (登録商標) 299v (活性成分ラクトバチルス・プランタラム (L. plantarum) 299v; 1 カプセル当たり 100 億個の生菌数) のカプセルを開けることにより得た Jarrow Formulas 製のラクトバチルス・プランタラム (L. plantarum) 299v) と混合した (バッチ E 及び F は 0.25 g の内容物を使用、バッチ G 及び H は 0.20 g の内容物を使用)。

20

## 【0031】

溶融物 / 細菌粉末を次にそれぞれアルギン酸ナトリウム (KELTONE LV、FMC biopolymer、Mw = 50000 - 75000 Da) の 2% 溶液 10.9375 g 中に分散させた。次に、各バッチの数滴をピペットにより別々の 1 M 塩化カルシウム溶液に加えてアルギン酸ナトリウムを架橋させ、アルギネートに基づくゲルビーズ微小球を形成し、当該微小球を即座に脱イオン水中に移し入れた。

## 【0032】

微小球の組成を計算し、表 3 に質量% 範囲 (微小球の総質量に対する) で示す。

30

## 【0033】

## 【表 3】

表 3

バッチ	プロバイオティック	ポリマー	ラウリン酸	ココナッツ油
E	1.76	1.54	1.06	20.09
F	1.76	1.55	10.57	10.57
G	1.41	1.56	15.92	5.31
H	1.41	1.56	21.22	0

40

## 【0034】

微小球の残りは水であった (百分率は形成の比較的直後に求めた)。微小球の得られた粒径は、光学顕微鏡により求めた場合に 1000 ミクロン以上であったが、マイクロピペットにより又は他の従来の方法によって、より小さく作ることができる。

## 【0035】

例 4 (比較)

実質的に例 2 の方法によるが、ラウリン酸を除外し、21.6 g のココナッツ油を使用して、比較用の微小球 (以下、比較用バッチ 1 という) を形成した。

50

## 【 0 0 3 6 】

## 例 5 ( 比較 )

実質的に例 3 の方法によるが、ラウリン酸を除外し、0.25 g のプロバイオティック粉末内容物及び 3.0 g のココナッツ油を使用して、比較用の微小球（以下、比較用バッチ 2 という）を形成した。

## 【 0 0 3 7 】

## 例 6

## 方法

100 mg の微小球を 1 ml の水中に懸濁し、次の方法：1) サンプルを 37 で一晩浸し、激しく渦混合して細菌を遊離させる；2) 粒子を 37 で一晩浸した後に無菌カミソリ刃により細断する；3) 乳鉢と乳棒を使用してサンプルを磨砕する、のうちの 1 つを使用して処理することにより初期細胞数計測生存率を評価した。理解されるように、被覆されていない対照の場合、細菌を遊離させる必要がなかったため、サンプルを水中に一晩浸さなかった。同様に、安定性試験のためにすでに水中に浸した材料についての生存率の試験も、さらに一晩浸すことを必要としなかった。処理後、遊離細菌懸濁液に 4 ml の MRS プロス培地を加えた。次に、段階希釈を行い、100 µl を MRS 寒天に蒔いた。細菌コロニーを数え、生存細胞数を微小球 1 グラム当りで記録した。

## 【 0 0 3 8 】

例 1 に実質的に準じて微小球を作製し、蒸留水中に表 4 A に記載のと通りの期間浸した後のそれらの生存率について試験した。

## 【 0 0 3 9 】

## 【 表 4 】

表 4 A

バッチ	初期生存率 (cfu/g)	4 週間		6 週間	
		cfu/g	log減少量	cfu/g	log減少量
バッチ A	2.70E+10	1.50E+10	0.26	3.20E+9	0.92
バッチ B	1.00E+10	2.10E+9	0.67	9.3E+8	1.03
比較用 未被覆 <i>L. rhamnosus</i>	2.40E+11	2.80E+8	1.9	1.9E+9	2.1

## 【 0 0 4 0 】

例 2 及び 4 に実質的に準じて微小球を作製し、蒸留水中に所定期間浸した後のそれらの生存率について試験した。結果を表 4 B に示す。

## 【 0 0 4 1 】



【表 5】

表 4 B

バッチ	初期生存率 (cfu/g)	4 週間		6 週間	
		cfu/g	log減少量	cfu/g	log減少量
バッチ C	7.70E+9	3.30E+8	1.36	5.50E+8	1.14
バッチ D	4.00E+10	2.40E+9	1.22	3.00E+9	1.12
比較用 バッチ 1	3.4E+10	1.20E+9	1.45	2.50E+7	3.13
比較用 未被覆 <i>L. plantarum</i> 299v	3.50E+10	2.20E+9	1.2	2.50E+8	3.23
比較用 未被覆 <i>L. plantarum</i>	1.33E+11	1.50E+10	0.94	4.20E+8	2.5

10

【0042】

20

例 3 及び 5 に実質的に準じて微小球を作製し、蒸留水中に所定期間浸した後のそれらの生存率について試験した。結果を表 4 C に示す。

【0043】

【表 6】

表 4 C

バッチ	初期生存率 (cfu/g)	4 週間		5 週間		7 週間	
		cfu/g	log減少量	cfu/g	log減少量	cfu/g	log減少量
バッチ E	1.41E+10	3.96E+9	0.55	--	--	9.96E+8	1.15
バッチ F	3.79E+9	6.16E+9	0	--	--	1.77E+9	0.33
バッチ G	**	**	**	**	**	**	**
バッチ H	**	**	**	**	**	**	**
比較用 バッチ 2	1.33E+10	--	--	1.40E+6	3.98	6.95E+6	3.28

30

\*\* 殺菌性

【0044】

例 7 (比較)

40

例 4 に実質的に準じて微小球を作製し、カプセル化されていないラクトバチルス・ラムノサス (*L. rhamnosus*) プロバイオティックに対してそれらの水吸収性について試験した。サンプルが平衡質量に達するまで、両方のサンプルを相対湿度約 30 % の湿度室に入れた。% 質量変化は、サンプルにより吸収された水の量を示す。両方のサンプルが 30 . 4 % の質量変化を示した。結果から、均一な疎水性カプセル化が水の吸収を妨げないことが確認された。

【0045】

本発明は本明細書に具体的に開示及び例示した実施形態に限定されないことが理解されるべきである。本発明の様々な修飾は当業者に明らかであろう。かかる修飾及び変更は、添付の特許請求の範囲に記載の範囲から離れずに行うことができる。

50

## 【 0 0 4 6 】

さらに、各記載の範囲は、本明細書に含まれる特定の数値と範囲の全ての組み合わせ及び部分組み合わせを包含する。さらに、本明細書で引用又は記載した各特許、特許出願及び刊行物の開示は、それらの全内容を引用により本明細書に援用する。

本発明に関連する発明の実施態様の一部を以下に示す。

## [ 態様 1 ]

貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、

プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を形成すること、

前記微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に導入すること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分 1 0 % を超える残留水分レベルを有する、及び

前記食品又は飲料を消費前に冷凍せずに少なくとも 6 週間貯蔵すること、を含む、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法。

10

## [ 態様 2 ]

前記プロバイオティックは、 $1 \log \text{ cfu}$  以下の個体群の減少を経験する、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 3 ]

前記高分子量ポリマーがエチルセルロースである、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 4 ]

前記高分子量ポリマーがアルギネートである、上記態様 1 に記載の方法。

20

## [ 態様 5 ]

前記微小球が飲料中に存在する、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 6 ]

前記飲料が 5 未満の pH を有する、上記態様 5 に記載の方法。

## [ 態様 7 ]

前記微小球が、残留水分レベルが水分 2 0 % を超える、好ましくは水分 3 0 % を超える、好ましくは水分 4 0 % を超える、より好ましくは水分 5 0 % を超える比較的高湿度の食品中に存在する、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 8 ]

前記微小球が、水分活性が 0 . 6 を超える、好ましくは 0 . 7 を超える、好ましくは 0 . 8 を超える、より好ましくは 0 . 9 を超える比較的高湿度の食品中に存在する、上記態様 1 に記載の方法。

30

## [ 態様 9 ]

前記比較的高湿度の食品が、ペットフード、スナックフード、ヘルスバー、及び調理されていない予め包装された混合物を含む、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 1 0 ]

前記微小球がワックスを含まないことを条件として、前記微小球が多層組成物を有する、上記態様 1 に記載の方法。

## [ 態様 1 1 ]

前記微小球が 5 0 0 ミクロン未満の粒径を有する、上記態様 1 に記載の組成物。

40

## [ 態様 1 2 ]

貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法であって、

プロバイオティック、高分子量ポリマー及び有効量の静菌剤を含む半透過性微小球を用意すること、

前記微小球を比較的高湿度の食品又は飲料中に入れること、ここで、前記比較的高湿度の食品は水分 1 0 % を超える残留水分レベルを有する、及び

水を前記微小球中に入らせること、

を含み、前記プロバイオティックは、前記食品又は飲料を冷凍せずに少なくとも 6 週間貯蔵した後に  $1 . 5 \log \text{ cfu}$  以下の個体群の減少を経験する、貯蔵安定なプロバイオティック含有食品又は飲料を提供する方法。

50

## フロントページの続き

- (74)代理人 100128495  
弁理士 出野 知
- (74)代理人 100173107  
弁理士 胡田 尚則
- (72)発明者 ホン リャン  
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 0 , ミッドランド, ウォールデン ウッズ ドライブ 2 8  
1 2
- (72)発明者 キャシー エル. リクテンワルド  
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 2 - 3 8 3 6 , ミッドランド, シャロン コート 2 0 0 4
- (72)発明者 クリシュナ マドゥリ  
アメリカ合衆国, インディアナ 4 6 0 7 4 , ウェストフィールド, ニコラス ドライブ 1 4 1  
5 9
- (72)発明者 シェド エー. シャー  
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 4 3 9 , グランド ブランク, エッジウッド ドライブ 1 0 1  
8 7
- (72)発明者 クリストファー ジェイ. タッカー  
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 0 , ミッドランド, ワネッター 5 4 0 6
- (72)発明者 カロリーヌ ウォールフル  
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 2 , ミッドランド, アボット ロード 2 6 2 2 #エル1  
0

審査官 小石 真弓

- (56)参考文献 特表2 0 1 0 - 5 3 1 1 4 9 ( J P , A )  
特許第2 5 7 3 8 9 2 ( J P , B 2 )  
特許第3 8 2 4 3 1 2 ( J P , B 2 )  
国際公開第2 0 1 1 / 0 9 4 4 6 9 ( WO , A 1 )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
A 2 3 L  
C 1 2 N 1 / 0 0