



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 290 T2** 2007.06.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 778 885 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 290.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR95/01126**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 929 915.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/006924**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.03.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.06.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 1/20** (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

C12N 9/38 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9410468 **31.08.1994** **FR**

(73) Patentinhaber:

Compagnie Gervais Danone, Levallois-Perret, FR

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BLAREAU, Jean-Pierre, F-59114 Steenvoorde, FR;
LECROIX, Francis, F-59270 Godewaersvelde, FR;
MAERTEN, Bernard, F-59190 Hazebrouck, FR;
PRONNIER, Paul, F-19100 Brive-la-Gaillarde, FR**

(54) Bezeichnung: **HERSTELLUNG VON DURCH STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS FERMENTIERTEN PRODUKTEN MIT HOHEM GEHALT VON GALACTO-OLIGOSACCHARIDEN UND BETA-GALACTOSIDASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von fermentierten Milchprodukten, die sich insbesondere als Babynahrung eignen.

[0002] Es ist bekannt, dass fermentierte Milchprodukte der Art von Joghurt für die Ernährung von Säuglingen von großem Interesse sind. In der Tat weisen die Lactobakterien, die herkömmlicherweise für die Herstellung dieser Produkte verwendet werden, eine relativ hohe β -Galactosidaseaktivität auf, was die Verdaulichkeit von Lactose und damit auch die Toleranz des Lebensmittels verbessert.

[0003] β -Galactosidase ist für die Hydrolyse von Lactose in Glucose und Galactose verantwortlich. Untersuchungen zur Aktivität von β -Galactosidasepräparaten zeigten, dass dieses Enzym ab einer bestimmten Lactosekonzentration parallel zur Lactosehydrolyse, die zur Bildung von Glucose und Galactose führt, auch eine Transgalactosylierungsreaktion katalysiert, die zur Bildung einer Oligosaccharidfamilie (Di- bis Hexasaccharide) führt, die Galactooligosaccharide genannt werden [vgl. zum Beispiel, SMART, Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 495–501 (1991)].

[0004] Es wurde nun gezeigt, dass die Galactooligosaccharide einen Faktor darstellen, der das Wachstum von Bifidobakterien stimuliert, und daher eine Anreicherung der Darmflora mit Bifidobakterien auf Kosten anderer Mikroorganismen, insbesondere pathogener Bakterien, ermöglichen [TANAKA et al., Bifidobacteria Microflora, Vol. 2 (1), 17–24, (1983)].

[0005] Es wurde vorgeschlagen, β -Galactosidasen unterschiedlichen Herkunft für die Erzeugung von Galactooligosacchariden zu verwenden, zum Beispiel um Milchprodukte mit einem erhöhten Gehalt an Galactooligosacchariden, zu erhalten.

[0006] Zu diesem Zweck wurden zwei Arten von Verfahren beschrieben:

1) Die erste Art behandelt ein lactosehaltiges Substrat, wie zum Beispiel Milch, mit gereinigten β -Galactosidasepräparaten aus verschiedenen Mikroorganismen.

[0007] Aus dem Europäischen Patent Nr. 323 201 von YAKULT HONSHA KK ist zudem ein Verfahren bekannt, bei dem tierische Milch mit einem β -Galactosidasepräparat aus *Streptococcus thermophilus* oder *Lactobacillus bulgaricus* behandelt wird, um wenigstens 15% der in der Milch enthaltenen Lactose in Galactooligosaccharide umzuwandeln.

[0008] Ferner wurde vorgeschlagen [Z. MOZAFFAR et al., Journal of Food Science, 50, S. 1602–1606, (1985)] Galactooligosaccharide aus Milch zu erzeugen, indem man einen β -Galactosidaseextrakt aus *Bacillus circulans* verwendet.

[0009] Diese Verfahren haben den Nachteil, dass eine Vorreinigung der β -Galactosidase benötigt wird, und sie haben das Problem der Stabilisierung der Enzymaktivität, das im Allgemeinen bei jedem gereinigten Enzympräparat besteht.

2) Bei einer zweiten Verfahrensart wird vorgeschlagen, Bakterien, die eine β -Galactosidaseaktivität aufweisen, ohne vorherige Extraktion des Enzyms zu verwenden. Jedoch besteht dabei das Problem, wie die β -Galactosidase, die intrazytoplasmatisch vorliegt, für das Substrat zugänglich gemacht werden soll.

[0010] Aus diesem Grund muss entweder ein Lyse der Bakterien oder wenigstens deren Permeabilisierung erfolgen, zum Beispiel durch ein organisches Lösungsmittel oder ein Tensid. Die Permeabilisierung, obgleich weniger drastisch als die Lyse, ist allerdings nachteilig für die Lebensfähigkeit der Bakterien und beeinträchtigt auch die β -Galactosidaseaktivität; daher wurde vorgeschlagen, die permeabilisierten Bakterien zu behandeln, um deren Lebensfähigkeit zu verlängern und die β -Galactosidaseaktivität zu schützen.

[0011] Zu diesem Zweck wurde zum Beispiel die Behandlung mit Glycerol oder Sorbit empfohlen. Eine andere Behandlungsart, die in der Japanischen Patentanmeldung Nr. 3 151 875 im Namen von YAKULT HONSHA KK, veröffentlicht am 28. Juni 1991, beschrieben ist, verwendet ein Verfahren, bei dem die permeabilisierten Bakterien zum Schutz des aktiven Zentrums der β -Galactosidase mit Galactooligosacchariden behandelt werden. Dies erlaubt es, die Inaktivierung dieses Enzyms während der Konservierung der Bakterien und bei der Bildungsreaktion der β -Galactooligosaccharide zu verlangsamen.

[0012] Bei beiden Verfahrensarten bleibt die β -Galactosidaseaktivität in dem verzehrfertigen Produkt nicht er-

halten, selbst wenn eine β -Galactosidaseaktivität nach der Transgalactosylierungsreaktion noch im Produkt vorhanden ist. Tatsächlich hält weder das gereinigte Enzym, noch das Enzym, das in den permeabilisierten Bakterien vorhanden ist, den verschiedenen Behandlungen, die zum Erhalt des Endproduktes führen, stand. Zudem hält die β -Galactosidaseaktivität erst recht nicht der Wirkung der Verdauungssäfte nach der Aufnahme durch den Konsumenten stand.

[0013] Obwohl es insbesondere für die Ernährung von Kindern und Säuglingen wünschenswert wäre, Milchprodukte bereitzustellen, die zugleich mit β -Galactosidase und mit Galactooligosacchariden angereichert sind, wurde bis jetzt nicht vorgeschlagen, ein und denselben Mikroorganismus zu verwenden, um dieses doppelte Ziel zu erreichen.

[0014] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Milchprodukte herzustellen, die sowohl an β -Galactosidase als auch an Galactooligosacchariden angereichert sind.

[0015] Bei dieser Herstellung wird ein Mikroorganismus verwendet, der eine β -Galactosidaseaktivität besitzt, die in einem ersten Schritt unter Bedingungen, unter denen der Mikroorganismus intakt bleibt, für die Herstellung von Galactooligosacchariden verwendet wird, was es in einem zweiten Schritt erlaubt, die β -Galactosidaseaktivität zu schützen, zunächst im Verlauf der verschiedenen Manipulationen, die zu einem verzehrfertigen Nahrungsmittel führen, und dann nach Aufnahme durch den Konsumenten, vor der Wirkung der Verdauungssäfte bis zum Darmbereich.

[0016] Die Erfinder beschlossen, zur Lösung dieser Aufgabe das Bakterium *Streptococcus thermophilus* zu verwenden.

[0017] *Streptococcus thermophilus* ist ein Gram-positives, fakultativ aerob-anaerobes Bakterium. Es bewirkt eine homolaktische Fermentation.

[0018] Dieses Bakterium weist verschiedene Eigenschaften auf, die dessen direkte Einarbeitung in Produkte erlauben, die in frischem Zustand aufbewahrt werden können, ebenso wie in Produkte, die für eine Vielzahl von Behandlungen (zum Beispiel Dehydrierung) vorgesehen sind, und die insbesondere Säuglingen verabreicht werden können.

Streptococcus thermophilus

- erzeugt insbesondere nur L(+)-Milchsäure, und dies nur in geringer Menge, im Gegensatz zu den Mikroorganismen vom Typ *Lactobacillus*, die D(-)-Milchsäure produzieren, die von einem Säugling nicht verstoffwechselt werden kann;
- ist bei erhöhten Temperaturen sehr beständig gegen Austrocknung, was zum Erhalt von Milchpulver sehr praktisch ist;
- weist nur eine sehr geringe proteolytische Aktivität auf, was während der Lagerung des Endprodukts die Gefahr der Bildung von Zusammensetzungen mit einem unangenehmen Geschmack verringert.

[0019] *S. thermophilus* hat unter normalen Kulturbedingungen eine intrazelluläre β -Galactosidase, was zu den oben genannten Problemen bei der Substratzugänglichkeit führt.

[0020] MOLOTOV et al. [*Biotekhnologiya*, 2, 33–37, (1991)] beschreiben im Gegensatz zu den Beobachtungen der meisten Autoren unter bestimmten Kulturbedingungen die Existenz einer von diesen Bakterien sekretierten β -Galactosidaseaktivität. Diese Sekretion stellt jedoch nur ein marginales Phänomen dar, das in gealterten Kulturen oder in Kulturen beobachtet wurde, die in Gegenwart von Glucose anstatt von Lactose kultiviert wurden.

[0021] Zur Verwendung von *S. thermophilus* für die Herstellung von fermentierten Milchprodukten, die mit β -Galactosidase und Galactooligosacchariden angereichert sind, muss man nun ein starkes Bakterienwachstum erreichen, damit einerseits die Fermentation des Substrates ermöglicht wird und andererseits eine ausreichende β -Galactosidaseaktivität im Laufe der Fermentation sichergestellt ist, die eine anschließende Anreicherung des fermentierten Galactooligosaccharidprodukts ermöglicht. Die Bedingungen, unter denen MOLOTOV et al. ihre Beobachtungen machten, sind für ein gutes Bakterienwachstum und für den Erhalt einer erhöhten β -Galactosidaseaktivität nicht sehr günstig und zudem sind sie für die Transgalactosylierungsreaktion, die den Erhalt der Galactooligosaccharide erlaubt, ungünstig.

[0022] Die Erfinder haben nun jedoch entdeckt, dass es möglich ist, bestimmte *S. thermophilus*-Stämme auf einem Lactose-enthaltenden Medium zu kultivieren, insbesondere einem Medium auf Basis eines Milchkonzentrats, so dass die Fermentation des Mediums von einer erhöhten Produktion von Galactooligosacchariden begleitet wird, die 2 bis 6 % der eingangs im Kulturmedium vorhandenen Lactose darstellen, und die erhalten wird, indem man die Zellen intakt hält.

[0023] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines fermentierten Produktes, das mit Galactooligosacchariden angereichert ist. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass es einen Schritt umfasst, bei dem man einen *S. thermophilus*-Stamm in einem Medium kultiviert, dessen Trockenmassekonzentration wenigstens 15 % (in Gewicht) beträgt, und das neben den für das Wachstum von *S. thermophilus* notwendigen Nährstoffen wenigstens 0,1 % (in Gewicht Trockenmasse) eines Hydrolysats von Milchproteinen mit einem Hydrolysegrad zwischen 15 und 50 % und wenigstens 20 % (in Gewicht Trockenmasse) Lactose umfasst.

[0024] Die üblichen Kulturbedingungen von *S. thermophilus*, und die Nährstoffe, die für sein Wachstum notwendig sind, sind dem Fachmann bekannt: es ist zum Beispiel üblich, dieses Bakterium in M₁₇-Medium oder auf rekonstituierter entrahmter Milch mit 10 % Trockenmasse, die mit 0,1 % Hefeextrakt supplementiert ist, zu kultivieren.

[0025] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Trockenmassekonzentration des Mediums zwischen 30 und 50 % und das Medium umfasst, in Gewicht Trockenmasse, zwischen 0,2 und 3 % eines Hydrolysats von Milchproteinen und zwischen 25 und 60 % Lactose.

[0026] Mit "Hydrolysat von Milchproteinen" ist ein Caseinhydrolysat, ein Hydrolysat des Ultrafiltrationsretentats von Milch, oder ein Hydrolysat von vollständigen Milchproteinen gemeint. Wenn gewünscht, kann auch eine durch Ultrafiltration gereinigte Peptidfraktion eines der oben genannten Hydrolysate verwendet werden. In diesem Fall wird eine Fraktion ausgewählt, die Peptide mit einem mittleren Molekulargewicht unter 5000 Da, vorzugsweise unter 2000 Da, umfasst.

[0027] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat das Milchproteinhydrolysat einen Hydrolysegrad von 15 bis 50 %, bevorzugt über 20 %.

[0028] Der Hydrolysegrad (DH) ist als Prozentsatz von Aminstickstoff im Verhältnis zum Gesamtstickstoff definiert.

[0029] Das Hydrolysat wird vorzugsweise durch enzymatische Hydrolyse des Milchproteinpräparats erhalten. Viele Proteasen, zum Beispiel Trypsin (EC 3.4.21.4), Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) oder Proteasemischungen aus beispielsweise Catalase, Pankreatin, usw., können zum Erhalt des Hydrolysats geeignet sein. Die Hydrolysebedingungen werden so gewählt, dass der oben genannte Hydrolysegrad (DH) erreicht wird.

[0030] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kulturmedium, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann.

[0031] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann man von einer Lösung auf Milchbasis ausgehen, der man neben den Bestandteilen, die die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglichen, Inhaltsstoffe zugibt, die für die Realisierung des gewünschten verzehrfertigen Nahrungsproduktes notwendig sind. Wenn man zum Beispiel ein Milchnahrungsmittel für Säuglinge erhalten möchte, fügt man Lactose, Maltodextrine, Mineralstoffe, Vitamine und Fette hinzu, da diese Inhaltsstoffe die Rekonstitution der Zusammensetzung der Muttermilch ermöglichen. Wenn gewünscht, werden Fette eingearbeitet und dann wird mit einer Lösung so homogenisiert, dass eine stabile Emulsion erhalten wird.

[0032] Die Lösung wird dann in einem Trockenextraktbereich von 15 bis 50 %, bevorzugt 30 bis 45 % Trockenmasse konzentriert, bevor sie auf 35 bis 55 °C, bevorzugt auf 37 bis 45 °C, abgekühlt und mit einer *Streptococcus thermophilus*-Kultur, die 10⁷ bis 10⁹ Bakterien/ml enthält, angeimpft wird. Die optimale Kultivierungstemperatur liegt zwischen 40 und 45 °C.

[0033] Die Auswahl des *S. thermophilus*-Stamms, mit dem die besten Resultate erzielt werden können, erfolgt durch Vorselektion durch Kultivierung auf einem erfindungsgemäßen Medium; wenn die β -Galactosidaseaktivität, die in dem fertigen Produkt gewünscht ist, höher als 0,15 U β -Gal/ml, bevorzugt zwischen 0,2 und 0,4 U β -Gal/ml sein soll, wird ein Stamm ausgewählt, dessen Aktivität bei der Kultivierung in dem erfindungsge-

mäßen Medium nach 4,5-stündiger Kultivierung höher als 0,9 U β -Gal/g ist. Eine β -Galactosidaseeinheit entspricht einem Mikromol hydrolysiertem ONPG pro Minute bei einem pH-Wert von 7,3 und bei 37 °C.

[0034] Beispiele für im Handel erhältliche *S. thermophilus*-Stämme, die insbesondere zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind, sind die Stämme ST12 und ST13, vertrieben durch die Firma BOLL (Le Moulin d'Aulnay; BP 64; Saint German les-Arpajon 91292 Arpajon Cedex Frankreich).

[0035] Andererseits wurden *S. thermophilus*-Stämme, die ebenso zur Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, bei der CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) die vom Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, in Paris unterhalten wird, hinterlegt. Der Stamm mit der Bezeichnung LFL-01 wurde am 25. August 1994 unter der Nummer I-1470 hinterlegt, und der Stamm mit der Bezeichnung DN-001065 wurde am 23. August 1995 unter der Nummer I-1620 hinterlegt.

[0036] Bei der Fermentation des Substrats durch *S. thermophilus* entwickelt sich die β -Galactosidaseaktivität im Verlauf der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens parallel zum Säuregehalt. Durch Messung des pH-Wertes unter definierten Bedingungen von Kultur und Medienzusammensetzung kann verfolgt werden, ob die gewünschte β -Galactosidaseaktivität erhalten wurde. Das Produkt wird dann auf 10 bis 25 °C abgekühlt, um die Fermentation zu stoppen.

[0037] Ferner kann das Fermentationsmedium mit Bifidobakterien, wie zum Beispiel *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* inokuliert werden.

[0038] Diese Bakterien können zu Beginn der Fermentation mit *Streptococcus thermophilus* hinzugefügt werden, oder auch in deren Verlauf oder danach.

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F191/110APCT	Internationales Aktenzeichen
---	------------------------------

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13bis PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus , das in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>8</u> Zeile <u>18</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) INSTITUT PASTEUR 25 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS FRANKREICH	
Datum der Hinterlegung 25. August 1994 (25.08.1994)	Eingangsnummer I-1470
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input checked="" type="checkbox"/>	
Bis zu dem Tag, an dem der Hinweis auf die Erteilung des europäischen Patent es bekannt gemacht wird oder bis zu dem Tag an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen worden ist oder als zurückgenommen gilt, soll der Zugang zu dem Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe an einen vom Antragsteller benannten Sachverständigen hergestellt werden.	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	Vom Internationalen Büro auszufüllen
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung <u>28. August 1995</u>	<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter <u>N. SAADA</u>	Bevollmächtigter Bediensteter

Formblatt PCT/RO/134 (Ju.l.i. 1992)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F191/110APCT	Internationales Aktenzeichen
---	------------------------------

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13bis PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus genannt ist auf Seite <u>8</u> Zeile <u>19</u> , das in der Beschreibung	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) INSTITUT PASTEUR 25 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS FRANKREICH	
Datum der Hinterlegung 23. August 1995 (25.08.1994)	Eingangsnummer I-1620
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input checked="" type="checkbox"/>	
Bis zu dem Tag, an dem der Hinweis auf die Erteilung des europäischen Patent es bekannt gemacht wird oder bis zu dem Tag an dem die Anmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen worden ist oder als zurückgenommen gilt, soll der Zugang zu dem Mikroorganismus nur durch Herausgabe einer Probe an einen vom Antragsteller benannten Sachverständigen hergestellt werden.	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)	

<p align="center">Vom Anmeldeamt auszufüllen</p> <input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung <u>28. August 1995</u>	<p align="center">Vom Internationalen Büro auszufüllen</p> <input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter N. SAADA	Bevollmächtigter Bediensteter

Formblatt PCT/RO/134 (Juli 1992)

[0039] Das fermentierte Produkt kann dann unterschiedlichen Behandlungen unterzogen werden, deren Art von dem gewünschten verzehrfertigen Produkt abhängt. Es können zum Beispiel Texturierungsmittel, Geschmacksstoffe, Vitamin- oder Mineralstoffzusätze, Fette usw. hinzugefügt werden, wenn diese nicht schon vor der Fermentation zugefügt wurden.

[0040] Wenn ein dehydratisiertes Produkt gewünscht ist, wird nun eine Trocknung durchgeführt. Die Trocknung kann mit jedem üblichen Verfahren durchgeführt werden, zum Beispiel durch Zerstäuben oder Lyophilisierung.

[0041] Bei der Trocknung durch Zerstäuben, und obwohl die β -Galactosidase von *S. thermophilus* besonders beständig ist, wird eine Austrittslufttemperatur unter 90 °C bevorzugt, wenn man die maximale β -Galactosidaseaktivität erhalten möchte.

[0042] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Herstellung eines an Galactooligosacchariden und/oder β -Galactosidase angereicherten Milchnahrungsmittels, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Durchführung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens eines fermentierten Produktes umfasst.

[0043] In diesem Rahmen umfasst die vorliegende Erfindung insbesondere Herstellungsverfahren für:

- frische Milchnahrungsprodukte;
- dehydratisierte Milchprodukte;
- Milchprodukte, die durch das Zugabe von Wasser zu den erfindungsgemäßen dehydratisierten Milchnahrungsmitteln rekonstituiert werden.

[0044] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren zur Herstellung eines dehydratisierten Milchnahrungsmittels durchgeführt, das eine β -Galactosidaseaktivität zwischen 0,5 und 5 U β -Gal, bevorzugt zwischen 1,5 und 3 U β -Gal, pro Gramm Trockenmasse besitzt und zwischen 0,5 und 5 g, bevorzugt zwischen 0,8 und 2,5 g, Galactooligosaccharide pro 100 g Trockenmasse umfasst.

[0045] Das dehydratisierte Milchnahrungsmittel umfasst bevorzugt ferner ein Lyophilisat von Bifidobakterien. Vorteilhafterweise sind diese Bifidobakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum.

[0046] Die Milchprodukte, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden, sind besser verträglich als die bekannten Milchprodukte, insbesondere von Subjekten mit einem β -Galactosidase-Mangel, da sie β -Galactosidase von lebenden Milchsäurebakterien enthalten, was eine bessere Verdaubarkeit der enthaltenen Lactose sicher stellt; zudem begünstigen Milchprodukte, die reich an Galactooligosacchariden sind, die Entwicklung von Bifidobakterien der Darmflora in situ. Sie sind besonders für die Babynahrung geeignet.

[0047] Die folgende Beschreibung bezieht sich auf Ausführungsbeispiele des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere zur Herstellung von Produkten für Babynahrung.

BEISPIEL 1: HERSTELLUNG EINES FERMENTATIONSMEDIUMS ZUR DURCHFÜHRUNG DES ERFINDUNGSGEMÄSSEN VERFAHRENS

[0048] Zu einer auf 75 °C erwärmten entrahmten Kuhmilch werden pflanzliches Fett und Lecitin gegeben. Homogenisierung erfolgt in zwei Schritten bei der gleichen Temperatur, die erste mit 200 kg/cm², die zweite mit 50 kg/cm².

[0049] Es wird ein dritter Teil zugegeben, der aus einer Vitamine enthaltenden Lösung besteht.

[0050] Die fertige Mischung wird bei 115 °C pasteurisiert und dann durch Eindampfen auf 43 % Trockenmasse konzentriert. Das Konzentrat weist die folgende Zusammensetzung auf (Tabelle 1), ausgedrückt in Gramm pro 100 Gramm Trockenmasse.

Tabelle 1

Pflanzliches Fett	24 g
Davon Lecitin	0,25 g
Milchproteine (davon 80 % Caseine und 20 % Serumproteine)	12,85 g
Lactose	40 g
Maltodextrine	20,4 g
Mineralsalze	2,6 g
Vitamine	0,15 g

BEISPIEL 2: WAHL EINES S. THERMOPHILUS-STAMMES

[0051] Es wurden unterschiedliche S. thermophilus-Stämme getestet.

[0052] Die Stämme werden zuerst mit steriler entrahmter Milch, die mit Hefeextrakt angereichert (1 g/l) ist,

kultiviert, bis eine Kultur erhalten wird, die etwa 10^8 Keime/ml umfasst.

[0053] Ein Milchkonzentrat für Kleinkinder, hergestellt wie in Beispiel 1, wird mit dieser Kultur zu 5% V/V beimpft und dann bei 44 °C inkubiert.

[0054] Der Säuregehalt wird bestimmt und die Fermentation wird bei etwa 110 °D gestoppt oder, wenn der Säuregehalt von 110 °D nicht erreicht wird, nach 6-stündiger Fermentation. Danach wird die β -Galactosidaseaktivität gemessen.

[0055] Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt: Der Säuregehalt wird in Grad Dornic (°D) ausgedrückt: Ein Grad Dornic entspricht 1 mg Milchsäure/10 ml Milch; die β -Galactosidaseaktivität wird in U β -Gal/g Konzentrat ausgedrückt.

Tabelle 2

Stamm	Säuregehalt (°D)				β -Gal
	2 Std.	3,5 Std.	4,5 Std.	6 Std.	Fermentationsende
STB01*	60	95	115	-	0,53
STB05*	58	96	115	-	0,52
TH3*	59	93	110	-	0,42
ST9*	43	50	58	63	nicht geronnen
DPch	61	100	115	-	0,93
ST37*	47	60	86	114	0,55
LFL-01	61	96	112	-	1
DN-001065	43	53	63	92	1,30

*: Im Handel von der Firma BOLL erhältliche Stämme

[0056] Die Stämme ST12 und ST 13 (BOLL) wurden unter denselben Bedingungen getestet und erlaubten es, nach 4,5 Stunden Inkubation jeweils 0,97 und 0,94 U β -Gal/g Konzentrat zu erzielen.

[0057] Die Stämme DPch, LFL-01, DN-001065, ebenso wie die Stämme ST12 und ST 13, besaßen eine Aktivität, die die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zuließ.

BEISPIEL 3: EINFLUSS DER ART DES PROTEINHYDROLYSATS AUF DIE β -GALACTOSIDASEAKTIVITÄT

[0058] Zur Untersuchung des Einflusses der Art des Proteinhydrolysats und des Hydrolysegrades auf die β -Galactosidaseaktivität werden aliquote Fraktionen eines wie in Beispiel 1 erhaltenen und auf 40 konzentrierten Ausgangsmediums mit unterschiedlichen Hydrolysaten mit gleichem Proteinanteil versetzt (entsprechend 1,1 g Protein/l konzentrierte Lösung).

[0059] Die Konzentrate werden zu 5 % (V/V) mit einer Streptococcus thermophilus-Kultur (Stamm LFL-01) in mit Hefeextrakt angereicherter Milch inokuliert.

[0060] Die Inkubationstemperatur liegt bei 44 °C.

[0061] Der Säuregehalt und die β -Galactosidaseaktivität werden nach 4-stündiger Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3

Art des Hydrolysats	Säuregehalt	β Gal
Keines	84 °D	0,11U β -Gal/g
Casein	121 °D	0,95U β -Gal/g
Milchserumproteine	113 °D	0,45U β -Gal/g
Soja	115 °D	0,58U β -Gal/g
Putenfleisch	111 °D	0,36U β -Gal/g
Lactalbumin	118 °D	0,71U β -Gal/g

BEISPIEL 4: EINFLUSS DER ART DES HYDROLYSATS (CASEIN, MILCH ODER MILCHRETENTAT), DAS EINEM MILCHKONZENTRAT FÜR KLEINKINDER HINZUGEgeben WIRD, AUF DIE β -GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT

[0062] Die Kulturen von *S. thermophilus* (Stamm LFL-01) und die Bestimmungen werden wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt.

[0063] Für jedes Hydrolysat werden drei Dosierungen getestet: 0,9 g, 1,5 g, und 3,6 g Hydrolysat pro kg Konzentrat mit 40 %.

[0064] Die Ergebnisse sind untenstehend in Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4

Art des Hydrolysats	Dosis (g/kg)	3 Stunden		4 Stunden	
		Säuregehalt (°D)	β -Gal-Aktivität	Säuregehalt (°D)	β -Gal-Aktivität
Casein	0,9	77	0,62	102	1,15
	1,5	79	0,67	104	1,09
	3,6	82	0,67	103	1,24
Milchretentat	0,9	80	0,63	107	0,95
	1,5	85	0,56	110	1,15
	3,6	93	0,57	112	1,31
Milch	0,9	88	0,59	107	0,93
	1,5	92	0,67	114	0,98
	3,6	95	0,71	114	1,06

[0065] Die Ergebnisse sind einander sehr ähnlich, jedoch kann durch das Caseinhydrolysat bei geringstem Proteinzusatz und minimalem Säuregehalt die höchste β -Galactosidaseaktivität erhalten werden.

BEISPIEL 5: EINFLUSS DES HYDROLYSEGRADS EINES CASEINHYDROLYSATS AUF DIE β -GALACTOSIDASEAKTIVITÄT

[0066] Die Kultivierung von *S. thermophilus* (Stamm LFL-01) und die Bestimmungen erfolgen wie in Beispiel 3 beschrieben.

[0067] Ein Kaliumcaseinat wird in Wasser zu 100 g/l gelöst, bei 92 °C pasteurisiert und auf 50 °C abgekühlt.

[0068] Die Lösung wird in einen Fermenter überführt, der mit einer Steuerung für pH und Temperatur ausgestattet ist. Der Lösung wird dann 1 g/l Pankreatin 3NF (Laboratoire Industriel de Biologie, Soisy-sous-Montmorency, Frankreich) zugegeben. Die Temperatur wird auf 50 °C reguliert und der pH-Wert in der Wärme auf 7,3 eingestellt.

[0069] Es werden regelmäßig Proben entnommen, 20 min bei 85 °C gehalten, um das Enzym zu zerstören, und dann auf 5 °C abgekühlt.

[0070] In den Proben wird dann Gesamtstickstoff und Aminstickstoff bestimmt. Das relative prozentuale Verhältnis von Aminstickstoff/Gesamtstickstoff ergibt den Hydrolysegrad des Proteins.

[0071] Zur Untersuchung des Einflusses des Hydrolysegrads werden aliquote Fraktionen des Konzentrats der Milchformulierung für Kleinkinder aus Tabelle 1 mit einer identischen Menge (Gesamtstickstoff) unterschiedlicher Hydrolyseproben versetzt, die den steigenden Hydrolysegraden entsprechen.

[0072] Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt:
Die gewünschte β -Galactosidaseaktivität ($>0,90$ U/ β -Gal/g) wird für Caseinhydrolysate erhalten, deren Hydrolysegrad über 22 % liegt.

Tabelle 5

Hydrolysegrad NH ₂ /NT	3 Stunden Fermentation		4 Stunden Fermentation	
	Säuregehalt in °D	β -Gal. U β -Gal/g	Säuregehalt in °D	β -Gal. U β -Gal/g
9 %	55	0,16	71	0,24
17,6 %	82	0,60	107	0,70
22,1 %	85	0,70	109	0,96
25 %	85	0,77	110	0,97
29,3 %	88	0,86	110	1,10
32,3 %	88	0,86	110	1,10
34,9 %	94	0,83	108	1,03

BEISPIEL 6: ENTWICKLUNG DER β -GALACTOSIDASEPRODUKTION UND VON GALACTOOLIGOSACCHARIDEN IM VERLAUF DER FERMENTATION EINES MILCHKONZENTRATS FÜR KLEINKINDER

[0073] Ein Milchkonzentrat wird wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt und zu 5 % V/V mit *S. thermophilus* (Stamm LFL-01) angeimpft und dann bei 44 °C inkubiert.

[0074] Die β -Galactosidaseaktivität (U β -Gal/g Konzentrat), die Bildung von Galactooligosacchariden (g pro 100 g Konzentrat), und der Säuregehalt (°D) werden als Funktion der Zeit (in Stunden) gemessen.

[0075] Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6

Dauer	Säuregehalt	Oligosaccharide	β -Gal
0	38		
1	42	0,03	0,06
2	50	0,07	0,20
3	77	0,30	0,62
4	103	0,40	1,15
4,5	107	0,42	1,16

[0076] Alle diese Werte entwickelten sich parallel und erreichten nach einer Fermentation von 4,5 Stunden ein Plateau.

[0077] Die konzentrierte Lösung wurde durch Zerstäuben getrocknet und so rekonstituiert, dass ein Produkt mit 14 % Trockenmasse erhalten wurde.

[0078] Die Werte für die β -Galactosidaseaktivität und die Galactooligosaccharidkonzentration im Konzentrat, im Pulver und im rekonstituierten Produkt sind in der nachfolgenden Tabelle 7 dargestellt: die β -Galactosidaseaktivität wird für das Konzentrat und das Pulver in U β -Gal/g ausgedrückt, und für das rekonstituierte Produkt wird sie in U β -Gal/ml ausgedrückt; die Galactooligosaccharidkonzentration wird für das Konzentrat und das Pulver in g/100 g ausgedrückt und für das rekonstituierte Produkt in g/l.

Tabelle 7

	Konzentrat	Pulver	Rekonstituiertes Produkt
β -Gal	1,16	2,40	0,33U
Oligosaccharide	0,42 g/100g	0,90 g/100g	1,26 g/l

BEISPIEL 7: HERSTELLUNG VON VERZEHRFERTIGEN PRODUKTEN

[0079] Eine wie in Beispiel 1 hergestellte konzentrierte Lösung wird zu 5 Volumen-% mit einer Kultur mit etwa 10^8 Keimen/ml Streptococcus thermophilus LFL-01 angeimpft.

[0080] Die konzentrierte Lösung wird 5,5 Stunden bei 44 °C fermentiert, bis zu einer Säurekonzentration von 106 °D und einer β -Galactosidaseaktivität von 1 U β -gal/g Konzentrat.

[0081] Danach wird die fermentierte konzentrierte Lösung wieder auf 20 °C abgekühlt.

[0082] Das Präparat wird dann bei einer Eintrittstemperatur von 165 °C und einer Austrittstemperatur unter 90 °C durch Zerstäuben getrocknet. Es wird ein Pulver erhalten, das eine β -Galactosidaseaktivität von 2,4 U/g Pulver und einen Restwassergehalt von etwa 2 bis 3 % hat und das 13 Monate bei 20 °C aufbewahrt werden kann, wobei es höchstens 10 bis 15 % des β -Galactosidasegehalts verliert. Mit diesem Pulver kann bei einem Verhältnis von 140 g Pulver auf etwa 900 ml Wasser eine gesäuerte Milch rekonstituiert werden, die insbesondere für Säuglinge geeignet ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines an Galactooligosacchariden und β -Galactosidase angereicherten fermentierten Produkts, wobei das Verfahren **dadurch gekennzeichnet** ist, dass es einen Schritt umfasst, bei

dem man einen *Streptococcus thermophilus*-Stamm in einem Medium kultiviert, dessen Trockenmassekonzentration wenigstens 15 % (in Gewicht) beträgt, und das neben den für das Wachstum dieses Bakteriums notwendigen Nährstoffen wenigstens 0,1 % (in Gewicht Trockenmasse) eines Hydrolysats von Milchproteinen mit einem Hydrolysegrad zwischen 15 und 50 % und wenigstens 20 % (in Gewicht Trockenmasse) Lactose umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Trockenmassekonzentration des Mediums zwischen 30 und 50 % (in Gewicht) liegt, und dadurch, dass das Medium zwischen 0,2 und 3 % (in Gewicht Trockenmasse) Hydrolysat von Milchproteinen und zwischen 25 und 60 % (in Gewicht Trockenmasse) Lactose umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydrolysat von Milchproteinen einen Hydrolysegrad über 20 % hat.

4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium mit einem *S. thermophilus*-Stamm beimpft wird, der nach 4,5 h Kultivierung auf einem Medium gemäß Anspruch 3 in Kultur eine Aktivität über 0,9 U β -Gal/g zeigt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der *S. thermophilus*-Stamm ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- Stamm LFL-01, hinterlegt am 25. August 1994 bei der CNCM unter der Nummer I-1470;
- Stamm DN-001065, hinterlegt am 23. August 1995 bei der CNCM unter der Nummer I-1620.

6. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium ferner mit Bifidobakterien inokuliert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Bifidobakterien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium bifidum*.

8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man das fermentierte Produkt nach Beendigung der Fermentation trocknet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Trocknung durch Zerstäuben erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur der Austrittsluft bei der Trocknung durch Zerstäuben unter 90 C liegt.

11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Trocknung durch Lyophilisation erfolgt.

12. Kulturmedium gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.

13. Verfahren zur Herstellung eines an Galactooligosacchariden angereicherten fermentierten Nahrungsmittels, dadurch gekennzeichnet, dass es die Durchführung eines Verfahrens nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 11 umfasst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Herstellung eines frischen Milchnahrungsmittels durchgeführt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Herstellung eines dehydratisierten Milchnahrungsmittels durchgeführt wird, das eine β -Galactosidase-Aktivität zwischen 0,5 und 5 U β -gal pro Gramm Trockenmasse besitzt und zwischen 0,5 und 5 g Galactooligosaccharide pro 100 g Trockenmasse umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Herstellung eines dehydratisierten Milchnahrungsmittels durchgeführt wird, das eine β -Galactosidase-Aktivität zwischen 1,5 und 3 U β -gal pro Gramm Trockenmasse besitzt und zwischen 0,8 und 2,5 g Galactooligosaccharide pro 100 g Trockenmasse umfasst.

17. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das dehydra-

tisierte Milchnahrungsmittel ferner ein Lyophilisat von Bifidobakterien umfasst.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Bifidobakterien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium bifidum*.

19. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das fermentierte Lebensmittel als Babynahrung vorgesehen ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen