

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2018年2月15日(15.02.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/030505 A1

- (51) 国際特許分類:  
A23G 1/00 (2006.01) A23G 1/30 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/029046
- (22) 国際出願日: 2017年8月10日(10.08.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2016-158335 2016年8月11日(11.08.2016) JP
- (71) 出願人: 日東薬品工業株式会社 (NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6170006 京都府向日市上植野町南開35-3 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 芦谷 浩明 (ASHITANI, Hiroaki); 〒3360027 埼玉県さいたま市南区沼影3-1-1 株式会社ロッテ 中央研究所内 Saitama (JP). 小山 寿之 (KOYAMA, Toshiyuki); 〒3360027 埼玉県さいたま市南区沼影3-1-1 株式会社ロッテ 中央研究所内 Saitama (JP). 宇佐美クランク 陽子 (USAMIKRANK, Yoko); 〒3360027 埼玉県さいたま市南区沼影3-1-1 株

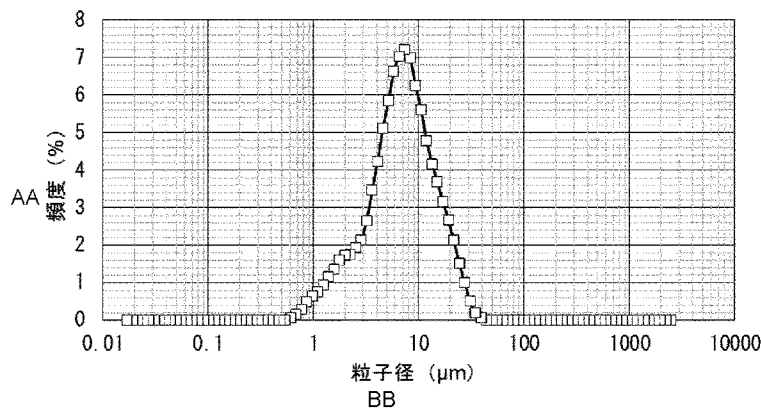
式会社ロッテ 中央研究所内 Saitama (JP). 蕪木 祐介 (KABUKI, Yusuke); 〒3360027 埼玉県さいたま市南区沼影3-1-1 株式会社ロッテ 中央研究所内 Saitama (JP). 米島 靖記 (YONEJIMA, Yasunori); 〒6170006 京都府向日市上植野町南開35-3 日東薬品工業株式会社内 Kyoto (JP). 久 景子 (HISA, Keiko); 〒6170006 京都府向日市上植野町南開35-3 日東薬品工業株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

(54) Title: LACTOBACILLUS-CONTAINING CHOCOLATE AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: 乳酸菌含有チョコレートおよびその製造方法



AA Frequency  
BB Particle size

(57) Abstract: The present invention provides lactobacillus-containing chocolate and a manufacturing method therefor, wherein the lactobacillus-containing chocolate contains live lactobacillus, and the average particle size of solid particles in said lactobacillus-containing chocolate is greater than 1 μm and less than 9 μm.

(57) 要約: 本発明は、生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートであって、該乳酸菌含有チョコレート中の固体粒子の平均粒子径が1 μmより大きく9 μm未満である、乳酸菌含有チョコレート及びその製造方法を提供する。



WO 2018/030505 A1

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,  
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：乳酸菌含有チョコレートおよびその製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は生きた状態の乳酸菌を安定化した状態で含有する乳酸菌含有チョコレートおよびその製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 乳酸菌は糖から乳酸を生産する細菌である。糖を乳酸発酵させる細菌として、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus*)、ロイコノストク属 (*Leuconostoc*) などの属が知られる。また、糖を分解して乳酸と酢酸をつくる細菌として、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium*) が知られている。ビフィドバクテリウム属の細菌はビフィズス菌として乳酸菌と別に分類される場合もあるが、本明細書中では、ビフィドバクテリウム属の細菌も乳酸菌に含むものとする。

ヒトの腸内には多種の微生物が生息し、ほぼすべてのヒトの腸内からは、ラクトバチルス属やビフィドバクテリウム属の乳酸菌が検出される。

[0003] プロバイオティクスは、英国の微生物学者 Fuller により「腸内フローラのバランスを改善することにより人に有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義されており、生きて腸まで届き、腸内環境で増殖可能となる必要がある。乳酸菌は、腸内の菌叢を整える他、免疫系、内分泌系、神経系などを調節するものもあり、プロバイオティクスとして注目されている。

[0004] 健康増進、維持のために、乳酸菌を摂取することが望ましく、乳酸菌を含有する食品としては、ヨーグルト、乳酸菌飲料などが一般的である。しかし、これらに加え、より、手軽で、嗜好性の高いプロバイオティクスとしての乳酸菌含有食品は、健康、利便性、嗜好性の全てを求める現代人のニーズに合致するものである。

特許文献1は、生菌状態のビフィズス菌を含む乳酸菌を含有するチョコレートを開示し、製造時からの安定性改善についての技術を開示するものであるが、乳酸菌含有チョコレートに含まれる固体粒子の粒子径に関する検討は行っていない。

[0005] 本願発明者らは、乳酸菌を生きて腸に届ける事を特徴とした乳酸菌含有チョコレート及びその製造方法について特許文献2を出願している。ただし、ここでも、乳酸菌含有チョコレートに含まれる固体粒子の粒子径に関する検討は行っていない。

[0006] 健康増進効果の期待できる乳酸菌として、ラクトバチルス属、エンテロコッカス属、ビフィドバクテリウム属、ロイコノストック属の乳酸菌が知られ、それらの例として、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス ガッセリ (*Lactobacillus gasseri*)、エンテロコッカス フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、ビフィドバクテリウム ロンガム (*Bifidobacterium longum*) あるいはロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) などが知られる。

[0007] ラクトバチルス ブレビスとしては、*Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* (通称「ラブレ菌」) 等が知られている。また、ラクトバチルス ブレビスは、免疫賦活作用や、抗インフルエンザウイルス活性を有し、体重増加の抑制、肝脂肪重量増加の抑制、血中コレステロール増加の抑制などにも効果があると言われ、様々な健康効果を期待することのできる乳酸菌である。ロイコノストック メセンテロイデスは免疫賦活作用を有し、健康効果を期待することのできる乳酸菌である。ラクトバチルス アシドフィルス、ラクトバチルス ガッセリ、エンテロコッカス フェカリスあるいはビフィドバクテリウム ロンガムは、いずれもヨーグルトなどの乳製品の製造に用いられており、健康増進効果が期待され

るものである。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0008] 特許文献1：特開平08-126473号公報

特許文献2：特願2016-543748号

### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 48(9) pp. 656-663 (2001)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の課題は長期間生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレート及びその製造方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0011] 乳酸菌を、固体粒子の粒子径が小さいチョコレートに添加することにより、乳酸菌の生存率の高い、乳酸菌含有チョコレートを製造することに成功した。

### 発明の効果

[0012] 本発明の乳酸菌含有チョコレートは、長期間、乳酸菌を生きた状態で含有することができる。

[0013] さらに、本発明の乳酸菌含有チョコレートは、保存、輸送、店舗の陳列といった物流において有利であり、年間を通じて乳酸菌含有チョコレートを安定して提供することを可能とする。

また、おどろくべきことに、チョコレートの粒子径を小さくし、粒度の分布をそろえることにより、水分活性が高いチョコレートであっても長期間生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートが製造できることを見出し、長期間生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートの提供に至った。

## 図面の簡単な説明

- [0014] [図1]実施例1の乳酸菌含有チョコレート1の固体粒子の粒子径分布である。
- [図2]チョコレート生地1～4の固体粒子の粒子径分布である。
- [図3]チョコレート生地1～4の経時的なERH変化量(%)である。
- [図4A]乳酸菌含有チョコレートの製法を説明する図である。
- [図4B]乳酸菌含有アーモンドチョコレートの製法を説明する図である。
- [図4C]乳酸菌含有油脂組成物の製法を説明する図である。
- [図5] (a) (b) (c) のいずれも乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験の結果を示す図である。
- [図6]乳酸菌含有チョコレートと乳酸菌末の人工胃液耐性の試験結果を示す図である。

## 発明を実施するための形態

- [0015] 本発明の一実施形態は、生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートであり、チョコレート中の固体粒子の平均粒子径が $9\mu\text{m}$ 未満である乳酸菌含有チョコレートである。さらに好ましくは、チョコレート中の固体粒子の平均粒子径は $7\mu\text{m}$ 未満である。

また、チョコレート中の固体粒子の平均粒子径の下限は、好ましくは $1\mu\text{m}$ より大きく、より好ましくは $5\mu\text{m}$ より大きい。

チョコレート中の固体粒子の平均粒子径の好ましい範囲は、 $1\mu\text{m}$ より大きく $9\mu\text{m}$ 未満、より好ましくは $5\mu\text{m}$ より大きく $7\mu\text{m}$ 未満である。

- [0016] さらに乳酸菌を長期間生きて安定に保つためには、チョコレート生地に含まれる固体粒子の粒子径をそろえることが好ましく、乳酸菌含有チョコレートの固体粒子の粒子径は、単一の分布ピークを有することが好ましい。

- [0017] 本明細書中でチョコレートとは、規約(チョコレート類の表示に関する公正競争規約)または法規上の規定に限定するものではなく、主にカカオ由来の原料からなり、必要により糖類、乳製品、他の食用油脂、香料、乳化剤等を加えたものをいう。

- [0018] チョコレート中の固体粒子とは、 $50^{\circ}\text{C}$ で溶かしたチョコレートを目開き

150 $\mu$ m (JIS試験篩の100メッシュ)の篩に通し、これを通過した固体粒子をいう。当該固体粒子には、通常カカオ、ミルク、糖類等の粒子が含まれている。なお、乳酸菌含有チョコレートにおいては、乳酸菌も固体粒子に含まれるが、本願発明においては、乳酸菌が乳酸菌含有チョコレートに占める割合は小さいため、乳酸菌含有チョコレートの粒子径分布には、ほとんど(実質的に)影響を及ぼさない。

[0019] 本願明細書中では、チョコレート中、あるいは乳酸菌含有チョコレート中に分散している固体粒子を単に粒子と呼ぶことがあり、また、これらの固体粒子の粒子径のことを指して、単に粒子径と呼ぶ場合がある。

[0020] 本明細書のチョコレートとしては、ダークチョコレート、ミルクチョコレート、ホワイトチョコレート、さらにホワイトチョコレートをベースに所望の色をつけたカラーチョコレート等も含まれる。

[0021] 例えば、ミルクチョコレートは、カカオマス：0～70重量%、全粉乳：0～20重量%、ココアバター：0～25重量%、植物油脂：0～20重量%、砂糖：0～45重量%を配合して調製することができる。乳化剤、香料、乳酸菌末も適宜配合することができる。更に、食物繊維：0～15重量%、オリゴ糖0～10重量%も配合することができる。

[0022] また本発明のチョコレートは、シュガーレスチョコレートとすることもできる。その場合の配合は、乳酸菌末に加えて、糖アルコール：0～50重量%、カカオマス：0～70重量%、乳等を主原料とする食品：0～25重量%、植物油脂：0～25重量%、ココアバター：0～25重量%の範囲内で適宜変更できる。また、高甘味度甘味料、乳化剤、香料などの副原料も適宜追加することができ、それらの配合量も適宜調整することができる。さらに、食物繊維：0～15重量%、オリゴ糖0～10重量%を配合することができる。なお、使用できるオリゴ糖は、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、大豆オリゴ糖などがあるが、これらに限られない。

[0023] チョコレートは、原料であるカカオ豆を、選別、分離、焙炒、磨砕してカカオマスとし、カカオマスと、砂糖、粉乳、植物油脂、ココアバターおよび

乳化剤の一部を原料混合機で混合し、リファイナーにより粒子が所定の大きさになる様に均一に微粒化し、精練（コンチング）し、精練の後半の段階で、香料と、残りの油脂類および乳化剤を添加してチョコレート生地を調製する。調製されたチョコレート生地には、乳酸菌を適宜加えることができる。

[0024] 乳酸菌の例として、ラクトバチルス ブレビス、ラクトバチルス カゼイ シロタ、ラクトバチルス アシドフィルス L-9 2、ラクトバチルス クレモリス、ラクトバチルス ヘルベティカス、ラクトバチルス サリバリウス、ラクトバチルス ガッセリ OLL 2716、ラクトバチルス ガッセリ PA-3、ラクトバチルス ガッセリ SBT 2055、ラクトバチルス ブルガリカス OLL 1073R-1、ラクトバチルス ファーメンタム、ラクトバチルス ロイテリ、ラクトバチルス クリスパートラス、ラクトバチルス ユーグルティ、ラクトバチルス デルブルッキー サブスピーシーズ ブルガリカス 2038、ラクトバチルス デルブルッキー サブスピーシーズ デルブルッキー、ラクトバチルス ジョンソニー、ラクトバチルス プランタラム、などのラクトバチルス属菌、ストレプトコッカス サーマフィルス 1131などのストレプトコッカス属菌、ビフィドバクテリウム ロンガム BB536、ビフィドバクテリウム ロンガム SBT 2928、ビフィドバクテリウム ラクティス GCL 2505、ビフィドバクテリウム ブレーベ、ビフィドバクテリウム インファンティス、ビフィドバクテリウム アドレスセンティス、ビフィドバクテリウム ビフィダム、ビフィドバクテリウム カテヌラータム、ビフィドバクテリウム シュードカテヌラータム、ビフィドバクテリウム アングラータム、ビフィドバクテリウム ガリカム、ビフィドバクテリウム アニマリス、などのビフィドバクテリウム属菌、エンテロコッカス フェカリス、エンテロコッカス フェシウム、エンテロコッカス ヒラエ、などのエンテロコッカス属菌、ラクトコッカス ラクチス サブスピーシーズ ラクチス、ラクトコッカス ラクチス サブスピーシーズ クレモリス、ラクトコッカス プランタラム、ラク



トコッカス ラフィノラクチス、などのラクトコッカス属菌、ペディオコッカス ペントサセウス、ペディオコッカス ダムノサス、などのペディオコッカス属菌、ロイコノストック デキストラニウム、ロイコノストック シトロボラム、ロイコノストック メセンテロイデス、ロイコノストック ラクティスなどのロイコノストック属菌、などを挙げることができる。

[0025] 中でも、本発明における乳酸菌として好ましくは、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属、エンテロコッカス属、ロイコノストック属であり、さらに好ましくは、ラクトバチルス ブレビス、ラクトバチルス アシドフィルス、ラクトバチルス ガッセリ、エンテロコッカス フェカリス、ビフィドバクテリウム ロンガム、ロイコノストック メセンテロイデスであるが、乳酸を生産する細菌であればこれに限定されない。

[0026] 本実施形態の乳酸菌含有チョコレートは、好ましくは、生きた状態の乳酸菌を  $1 \times 10^4$  個/グラム以上含有し、さらに好ましくは、  $1 \times 10^4$  個/グラム以上  $1 \times 10^{12}$  個/グラム以下で含有し、さらに好ましくは、  $1 \times 10^6$  個/グラム以上  $1 \times 10^{12}$  個/グラム以下、さらには  $1 \times 10^7$  個/グラム以上  $1 \times 10^{12}$  個/グラム以下含有することが好ましい。

[0027] 本実施形態の乳酸菌含有チョコレートは、  $28^\circ\text{C}$  で2ヶ月間保存後の乳酸菌の生菌率が50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上である。

[0028] 本実施形態の乳酸菌含有チョコレートは、  $25^\circ\text{C}$ 、相対湿度75%で98時間保存後のERHの変化率が5%以下、好ましくは3%以下、より好ましくは1%以下である。

[0029] また、本発明の一実施形態は、乳酸菌含有チョコレートの製造方法であって、原料の微粒化の際に平均粒子径を  $9 \mu\text{m}$  未満、より好ましくは  $7 \mu\text{m}$  未満まで微粒化することを特徴とする乳酸菌含有チョコレートの製造方法である。この際、固体粒子の平均粒子径の下限は特に限定されないが、好ましくは  $1 \mu\text{m}$  より大きく、より好ましくは  $5 \mu\text{m}$  より大きい。通常平均粒子径は、ロールリファイナーの制御や原料中の油脂量の調整により制御される。

本発明においては、目的の粒子径にできるのであれば、微粒化行程は特に限定されないが、リファイナー等の装置を使用した微粒化工程が挙げられる。

[0030] 乳酸菌含有チョコレートにおいて、乳酸菌を加える工程は限定されない。たとえば、テンパリングの後であって、成型前のチョコレート生地に、乳酸菌末を加えることができる。また、乳酸菌末を高濃度でチョコレートと混合した乳酸菌高濃度含有チョコレートを製造し、乳酸菌高濃度含有チョコレートを、テンパリングの後であって、成型前のチョコレート生地に加えることができる。センター材を被覆する乳酸菌含有チョコレートの製造では、調温されたチョコレート生地に乳酸菌末を加え、これでセンター材を被覆することができる。

[0031] また、本発明の一実施形態は、本発明の乳酸菌含有チョコレートを含む食品である。その例として、フルーツ、ナッツ、穀類、グミ、キャンディなどを加えた乳酸菌含有チョコレート菓子、乳酸菌含有チョコレートを含む焼き菓子、スナック菓子、クッキー、ケーキ、アイスクリーム、飲料などを挙げることができる。

[0032] また本発明の乳酸菌含有チョコレートは、例えば、それ自体、又はそれに適当な風味を加えてドリンク剤、例えば清涼飲料、粉末飲料とすることもできる。具体的には、ジュース、牛乳、菓子、ゼリー等に混ぜて飲食することができる。また、このような食品を保健機能食品として提供することも可能である。この保健機能食品には、ビフィズス菌増殖や腸内フローラ改善等の用途に用いるものであるという表示を付した飲食品、特に、特定保健用食品、栄養機能食品等も含まれる。

[0033] [実施例1]

#### 1. 乳酸菌末の調製

乳酸菌末は *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (ラブレ菌) を使用することとした。通常の乳酸菌培養培地 (MRS培地等) を用いてラブレ菌を培養し、遠心分離等により集菌した

ものを凍結乾燥し粉砕する等して粉末にしたものにデンプンを加え、ラブレ乳酸菌末とした。

[0034] 2. 乳酸菌含有チョコレート製造

砂糖、カカオマス、ココアバター、全粉乳又は牛乳、乳化剤、香料等を含むチョコレート生地1~4を用意した。各チョコレート生地を40℃で溶解して、乳酸菌末を高濃度に加えた、乳酸菌高濃度含有チョコレート1~4を製造した。テンパリングが終了した各チョコレート生地1~4に、対応する乳酸菌高濃度含有チョコレート1~4を加えて混合し、冷却・固化し、それぞれ乳酸菌の数量が $5 \times 10^7$ 個~ $5 \times 10^8$ 個/グラムとなるように乳酸菌含有チョコレート1~4を製造した。

[0035] 4種類の乳酸菌含有チョコレート1~4について、平均粒子径及び水分活性を表1に示す。なお、平均粒子径は島津製作所製レーザ回折式粒子径分布測定装置を用いて測定を行い、水分活性はロトロニック社製水分活性測定システムAW-ラボを用いて測定を行った。

[0036] 水分活性として示されるERH (Equilibrium Relative Humidity: 平衡相対湿度) は測定対象物を入れた密閉容器内にて対象物と環境間で平衡に達した時の水蒸気圧とその温度における飽和水蒸気圧の比であり、食品の保存性の指標とされる水分活性 (AW) の100倍の値となる。

[0037] 平均粒子径の具体的な測定方法は乳酸菌含有チョコレート0.5gをイソプロパノール10mLに入れ、50℃の湯煎で10分間攪拌しながら溶かし、測定波長680nmの吸光度が0.1~0.2になるようにイソプロパノールで希釈したサンプルを、レーザ回折式粒子径分布測定装置にて測定する。なお、ラブレ菌は乳酸菌含有チョコレート中において、粒子径約2~4 $\mu$ mの棍棒状の形状をとっているが、チョコレート1gあたりに配合する菌数では粒子径分布にほとんど影響を及ぼさない(図1及び2参照)。

[0038]

[表1]

	平均粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	水分活性 ERH (%- $^{\circ}\text{C}$ )
乳酸菌含有チョコレート1	6.744	37.9-19.3
乳酸菌含有チョコレート2	6.940	24.5-19.3
乳酸菌含有チョコレート3	7.026	38.4-20.1
乳酸菌含有チョコレート4	9.211	49.4-20.5

[0039] 乳酸菌含有チョコレート1～4について、28 $^{\circ}\text{C}$ の恒温室に保管し、製造時から2ヶ月間の安定性試験を実施した。製造時、1ヶ月時、2ヶ月時の乳酸菌の生菌数試験を実施した結果を表2に示す。また、製造時の生菌数を100%とした生菌残存率を表3に示す。

[0040] [表2]

	製造時	1ヶ月時	2ヶ月時
乳酸菌含有チョコレート1	$5.86 \times 10^7$	$5.74 \times 10^7$	$4.05 \times 10^7$
乳酸菌含有チョコレート2	$9.42 \times 10^7$	$9.31 \times 10^7$	$7.98 \times 10^7$
乳酸菌含有チョコレート3	$1.22 \times 10^8$	$7.14 \times 10^7$	$7.27 \times 10^7$
乳酸菌含有チョコレート4	$1.04 \times 10^7$	$5.74 \times 10^6$	$2.19 \times 10^5$

[0041] [表3]

	製造時	1ヶ月時	2ヶ月時
乳酸菌含有チョコレート1	100%	98.0%	69.1%
乳酸菌含有チョコレート2	100%	98.8%	84.7%
乳酸菌含有チョコレート3	100%	58.5%	59.6%
乳酸菌含有チョコレート4	100%	55.2%	2.1%

[0042] この結果より、チョコレートが含有する固体粒子の平均粒子径が、比較的小さい乳酸菌含有チョコレート1～3は、粒子径の大きい乳酸菌含有チョコレート4に比べ、格段に乳酸菌の残存率が高くなっていることがわかる。

[0043] 乳酸菌の安定性はその食品に含まれる水分の影響が大きく、通常、水分活性が高い食品中では乳酸菌を生きた状態で長期間保つことは困難である。乳酸菌含有チョコレート1及び3については、水分活性ERHが約40%と高い状態にもかかわらず、乳酸菌の残存率は高かった。チョコレートの水分活性は原料や製法によってはコントロールすることが難しいことが知られてい

る。

[0044] 本実施例により、チョコレートの粒子径を小さくすることにより、水分活性が比較的高いチョコレートであっても長期間生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートを製造できるといえる。

[0045] [実施例2]

乳酸菌チョコレートの固体粒子の粒子径分布の検討

実施例1で作成した乳酸菌含有チョコレート1の固体粒子の粒子径分布を図1に示す。図1の粒子径分布は、単一のピークになっている。

[0046] チョコレート生地の固体粒子の粒子径分布と、水分活性の相関について検討を行った。粒子径分布が異なるチョコレート生地を4種類用意した(チョコレート生地1~4)。それぞれの生地中の固体粒子の粒子径分布は図2のとおりであった。これらのチョコレート生地を25℃75%RH(Relative Humidity: 相対湿度)の条件で98時間保管した際の経時的な水分活性の上昇を観察した。経時的なERH変化量(%)の結果を図3に示す。チョコレート生地1、2は粒子径分布が単一の分布ピークを示し、一方、3、4は2つのピークを示した。また、チョコレート生地3、4はチョコレート生地1、2と比較して、ERH変化量が大きかった。

[0047] この結果から、チョコレート生地に含まれる固体粒子の粒子径分布が1つのピークになっているチョコレート生地はERHの上昇スピードが遅いことがわかる。乳酸菌の安定性はERHが高くなるにつれて悪くなり、チョコレート生地自体のERH上昇を抑えることは、生きた状態の乳酸菌を保つ上で重要である。本実施例から、チョコレートに含まれる固体粒子の粒子径分布を単一の分布ピークにすることで、より安定した乳酸菌含有チョコレートとなることが示された。

[0048] 以降は、乳酸菌含有チョコレートの製造の例と、その有用性について示す参考例であって、本発明の一部を構成するものではない。

[0049] [参考例1] 乳酸菌含有チョコレート(ラブレ菌)

1. 乳酸菌末の調製

乳酸菌末はラクトバチルス属 ブレビス種の *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (ラブレ菌) を使用した。一般的な乳酸菌培養培地 (MRS 培地等) を用いてラブレ菌を培養し、遠心分離等により集菌したものを凍結乾燥し粉砕する等して粉末にしたものにデンプンを加え、乳酸菌末とした。なお、この乳酸菌末は、生きた状態の乳酸菌を、 $1 \times 10^5$  個/グラム以上  $1 \times 10^{13}$  個/グラム以下で含有することが望ましく、さらには、 $1 \times 10^7$  個/グラム以上  $1 \times 10^{13}$  個/グラム以下、さらには  $1 \times 10^8$  個/グラム以上  $1 \times 10^{13}$  個/グラム以下含有することが好ましい。

#### [0050] 2. 乳酸菌含有チョコレート製造

一般的にチョコレートは、原料であるカカオ豆を、選別、分離、焙炒、磨砕してカカオマスとし、カカオマスと、砂糖、粉乳、植物油脂、ココアバターおよび乳化剤の一部を原料混合機で混合し、リファイナーにより粒子が所定の大きさになる様に均一に微細化し、精練 (コンチング) し、精練の後半の段階で、香料、乳酸菌末と、残りのココアバターおよび乳化剤を添加してチョコレート生地を調製する。このチョコレート生地は場合により、 $45 \sim 50^\circ\text{C}$  程度で、平均4日程度タンクに貯蔵される。この貯蔵は、製造ラインの稼働の都合により生じる、いわば待ち時間である。その後、 $28 \sim 30^\circ\text{C}$  程度に調温しテンパリングされ、その後に、成型用の型に充填し、冷却・固化させ、型抜き、得られたチョコレートを包装・検査し、熟成を経て出荷される。

[0051] この製造方法を元に、従来製法 (香料などの添加と同じタイミングで乳酸菌末を添加する)、製法1、製法2により、乳酸菌末を添加して、乳酸菌含有チョコレートを製造した。それぞれの製法について、図4Aに概略を示す。

#### [0052] 従来製法

精練ののち  $45 \sim 50^\circ\text{C}$  になったチョコレート生地に乳酸菌末を加え、その後、4日間の貯蔵を経て、テンパリング、成型などを行った。

## [0053] 製法 1

テンパリングが終了したチョコレート生地（27～31℃）に、乳酸菌末を加えた。なお、この乳酸菌含有チョコレート中には、生きた状態の乳酸菌を、 $1 \times 10^5$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下含有させることが好ましく、さらには $1 \times 10^7$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下、さらには $1 \times 10^8$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下含有させることが好ましい。

## [0054] 製法 2

あらかじめ、チョコレート生地を40℃で溶解して、乳酸菌末を高濃度に加えた、乳酸菌高濃度含有チョコレートを製造した。なお、この乳酸菌高濃度含有チョコレート中には、生きた状態の乳酸菌を、 $1 \times 10^5$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下含有させることが好ましく、さらには $1 \times 10^7$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下、さらには $1 \times 10^8$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下含有させることが好ましい。テンパリングが終了したチョコレート生地を27～31℃にし、乳酸菌高濃度含有チョコレートを加えて混合した。

[0055] 上記のいずれの製法においても、表4のミルクチョコレートの配合に従って製造を行った。

## [0056] [表4]

	重量%
カカオマス	17
全粉乳	20
ココアバター	12
植物油脂	10
砂糖	40
乳化剤	0.4
香料	0.1
乳酸菌末	0.5
計	100

[0057] 上記いずれの製法でも、乳酸菌含有チョコレートを製造することができた。なお、製法2を用いた場合、製造ラインにおいて乳酸菌が飛散し汚染され

てしまうのを防ぐことができるため、製造管理の観点からは製法2はより好ましい。また、製法2の方法によれば、乳酸菌をより短時間で均一にチョコレート生地混合することができる。

[0058] なお、乳酸菌含有チョコレートの配合は、乳酸菌末に加え、カカオマス：0～70重量%、全粉乳：0～20重量%、ココアバター：0～25重量%、植物油脂：0～20重量%、砂糖：0～45重量%の範囲内で適宜変更することができる。また、乳化剤、香料などの副原料も適宜追加することができる。さらに、食物繊維：0～15重量%、オリゴ糖0～10重量%を配合することもできる。

[0059] 3. 乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験

製法2に基づいて乳酸菌末が0.25重量%となるように乳酸菌含有チョコレートを作製した。すなわち、配合は表4に従い、乳酸菌末の含有割合のみ変更した。これを試料として、以下の手順に基づいて人工胃液耐性試験を行った。

[0060] (1) 所定のpHに調整し、0.04%ペプシンを添加したMRS培地を人工胃液とした（非特許文献1に従った）。培地は300mlとした。上記の人工胃液を希塩酸でpH2.5に調整した。胃酸の主成分は塩酸のため、それ以外の酸は使用していない。

[0061] (2) チョコレート1粒（2グラム）を37℃に保温した人工胃液に浸し、液面が軽くゆれる程度に振盪し、30分、1時間、2時間後に、人工胃液1mlを取り、含まれる生菌数を測定した。生菌数の測定方法は、乳酸菌生菌数の経時試験と同様である。なお、最大で2時間としたのは、通常、胃内の消化物が完全に十二指腸に移送されるのにかかる時間が約2時間であるためである。また、対照として、ラブレ菌を含有する乳酸菌含有飲料についても、人工胃液内添加時の生菌数が乳酸菌含有チョコレートと同程度になるように添加量を適宜調整し、同様に実験を行った。

[0062] (3) 結果

異なる日時に、3回同様の実験を行ったので、それらの結果を表5に示す



。これらをグラフで示した結果を図5に示す。なお、第3回目の実験においては、ラブレ菌を含有する乳酸菌含有飲料を2種類用いて比較対照とした。

[0063] [表5]

## 1日目実施の結果

	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有 チョコレート	8.62E +07	3.24E +06	6.90E +05	2.82E +04
ラブレ菌を 含有する乳酸菌 含有飲料	5.60E +07	4.71E +04	1.47E +04	4.50E +03

## 2日目実施の結果

	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有 チョコレート	8.62E +07	2.13E +07	6.18E +06	7.77E +04
ラブレ菌を 含有する乳酸菌 含有飲料	5.60E +07	5.58E +05	2.88E +04	8.70E +03

## 3日目実施の結果

	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有 チョコレート	8.62E +07	1.47E +07	3.81E +05	6.30E +04
ラブレ菌を 含有する乳酸菌 含有飲料	4.25E +07	9.60E +03	6.30E +03	3.90E +03
ラブレ菌を含有す る乳酸菌含有飲 料(他種製品)	5.00E +07	1.20E +05	2.46E +04	1.20E +03

[0064] 乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験の結果から、おどろくべきことに、製法2により作製した乳酸菌含有チョコレートは、人工胃液中での乳酸菌の生存率が非常に高く、その生存率は、対照としている乳酸菌飲料よりもはるかに高いことが分かった。

## [0065] 4. 乳酸菌含有チョコレートと乳酸菌末の人工胃液耐性の比較試験

乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験と同様に、製法2に基づいて乳酸菌末が0.25重量%となるように作製された乳酸菌含有チョコレートと、乳酸菌末そのものを用いて、乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験と同様に、人工胃液耐性試験を行った。

ただし、対照として、乳酸菌末を用い、人工胃液内添加時の生菌数が乳酸菌含有チョコレートと同程度になるように適宜調整し、同様に実験を行った。

結果を表6に示す。グラフで示した結果を図6に示す。

[0066] [表6]

	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有チョコレート	8.75E+07	1.89E+07	1.71E+07	1.56E+07
乳酸菌末	6.21E+07	1.10E+06	2.82E+04	0.00E+00

[0067] 本参考例の人工胃液耐性試験においては、本発明の乳酸菌含有チョコレートにおける、30分、1時間、2時間経過時の乳酸菌の生存率、すなわち人工胃液耐性が、乳酸菌末よりも、はるかに高いことが分かった。

[0068] 5. 乳酸菌含有チョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験

乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験と同様に、製法2に基づいて、チョコレート中に乳酸菌末が0.25重量%となるような乳酸菌含有チョコレートを作製した。

[0069] この乳酸菌含有チョコレートの製造直後、あるいは、室温（約18℃）で1ヶ月から14ヶ月保存した試料中の乳酸菌生菌の数を以下の方法により調べた。対照として、乳酸菌を含有したソフトキャンディについても同様の実験を行った。

[0070] (1) 試料を1欠片もしくは約1gをとり、質量を精密に量り、希釈液100mlに入れて強く振り混ぜ、均一に懸濁したものを試料原液とした。試料原液1mlを別に分注した希釈液9ml中に加えて10倍希釈した。同様の操作を繰り返し、試料溶液とした。

(2) 試料溶液1ml以下の適量を2枚のペトリ皿に分注し、50℃に保ったMRS寒天培地を加えて混和し、固化させた。

(3) 固化後、35～37℃で48～72時間嫌気培養して、出現した集落数を数え、平均集落数を求めた。

(4) 試料 1 g 中の生菌数 (CFU) を下記の計算式より求めた。

$$\text{生菌数 (CFU/g)} = \text{平均集落数 (CFU)} \times \text{希釈倍率} \times \text{試料原液 (ml)} / \text{試料溶液添加量 (ml)} / \text{試料採取量 (g)}$$

(5) 結果

実験は室温 (約 18°C) で行われた。結果を表 7 に示す。

[0071] [表7]

	製造直後	1ヶ月	2ヶ月	6ヶ月	12ヶ月	14ヶ月
生菌数 (CFU/g)	1.04E +08	1.16E +08	1.60E +08	9.08E +07	8.08E +07	6.62E +07
残存率	100%	111%	153%	87%	77%	63%

[0072] なお、乳酸菌含有ソフトキャンディについて、同様に乳酸菌数の経時試験を行ったところ、表 8 の通りであった。

[0073] [表8]

	製造直後	1ヶ月	2ヶ月
生菌数(CFU/g)	2.18E+07	3.43E+03	5.95E+01

[0074] ソフトキャンディでは、製造後 1 ヶ月後で大部分の乳酸菌が死滅しており、2 ヶ月後には生菌がほとんどいなかった。残存率は製造から 1 ヶ月、2 ヶ月後いずれも、ほぼ 0% といえる。それと比較し、乳酸菌を含有するチョコレートでは、極めて安定的に乳酸菌の生菌状態を維持することができた。また、室温 (約 18°C) 下で製造 14 ヶ月後のサンプルの結果を見ると、乳酸菌の安定性が良好なことから、室温下にて、1 年間は、乳酸菌の生菌状態を保証できる。

[0075] 6. 各製法で作製された乳酸菌含有チョコレートに含まれる乳酸菌数の比較  
従来製法、製法 1、製法 2 でそれぞれ製造された、乳酸菌含有チョコレートの 1 グラム当たりの乳酸菌数を測定した。添加した乳酸菌末に含まれる乳酸菌数から算出される乳酸菌理論値と、実測値を表 9 に示す。

[0076]

[表9]

	従来製法	製法1	製法2
理論値 (CFU/g)	9.24E+07	9.24E+07	9.24E+07
実測値 (CFU/g)	2.40E+07	1.04E+08	9.88E+07

[0077] 従来製法の菌数は製造工程による菌の失活により乳酸菌数が低下した。製法1および製法2では、工程における失活を防ぐことができ、従来製法と比較すると約5倍の乳酸菌数の差が出ることから、生きて腸に届く菌数を増加させる優れた製法であると言える。なお、製法2の製造過程で製造された、乳酸菌末を約 $1.4 \times 10^9$ 個/グラム含有する乳酸菌高濃度含有チョコレートについて、45℃下で2日間放置した後の乳酸菌の生菌数を、同様の方法にて測定した結果、約 $1.3 \times 10^9$ 個/グラム、とほとんど変化していなかった。このことから、従来製法における乳酸菌数の減少は、単に熱によるものとは言えず、貯蔵時における長時間の攪拌や、テンパリング操作などが菌数の減少に影響していることが考えられる。

[0078] 7. 各製法で作製された乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験

従来製法、製法1、製法2に基づき作製した乳酸菌含有チョコレートを用いて、乳酸菌含有チョコレートの人工胃液耐性試験と同じ手順で人工胃液耐性試験を行った。

[0079] 結果

各製法により、製造時菌数が異なることから、各製法の製造時菌数を100%とし、残存率として表した結果を表10に示す。

[0080] [表10]

	製造時菌数	30分	1時間	2時間
従来製法	100%	37.5%	20.2%	17.6%
製法1	100%	33.3%	29.6%	23.1%
製法2	100%	38.3%	38.3%	32.1%

[0081] 以上の結果より、おどろくべきことに、製法1、製法2で作られた乳酸菌

含有チョコレートは人工胃液耐性試験において、従来製法よりも乳酸菌の残存率が高い結果が得られた。従って、製法1、製法2は胃酸に対する耐性においても、優れた製造方法であることが分かった。

[0082] 以上、本参考例における結果から、おどろくべきことに、本発明による乳酸菌含有チョコレートの製造方法は、簡便な方法でありながらも製造時における菌数を高く維持することに非常に優位な方法であり、乳酸菌飲料等よりも胃酸に対する耐性が高く、さらに従来の製法により製造される乳酸菌含有チョコレートよりも耐酸性が高い非常に優れた製造方法であることが分かった。また、その製造方法によりつくられる乳酸菌含有チョコレートは、プロバイオティクスの効果をより高めたチョコレートであり、嗜好性が高く、かつ健康を維持する有用性の高い食品になることが分かった。

[0083] [参考例2] 乳酸菌含有チョコレート（ラブレ菌以外の乳酸菌）

#### 1. 乳酸菌含有チョコレートの製造

表4の配合で製法2に基づいて、ラブレ菌を、その他の乳酸菌、すなわち、ラクトバチルス アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス ガッセリ (*Lactobacillus gasseri*)、エンテロコッカス フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、ビフィドバクテリウム ロンガム (*Bifidobacterium longum*) あるいはロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) に変えて、乳酸菌末がロイコノストック メセンロイデスは0.5重量%、その他の4種の菌は0.25重量%となるように乳酸菌含有チョコレートを製造した。

[0084] 2. 乳酸菌含有チョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験

製造された乳酸菌含有チョコレートについて、参考例1の乳酸菌含有チョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験と同様に、乳酸菌含有チョコレートの製造直後、あるいは、室温約18℃～約25℃で1ヶ月から3ヶ月保存した試料中の乳酸菌生菌の数を調べた。結果は次の表11のとおりであった。各種菌を含有するチョコレートにおける製造後3ヶ月後の各種菌について、極めて安定的に生菌状態を維持できることが分かった。

[0085] [表11]

	製造直後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
ラクトバチルス アシドフィルス ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	4.43E+07	4.62E+07	6.00E+07	4.43E+07
ラクトバチルス ガッセリ ( <i>Lactobacillus gasseri</i> )	5.88E+07	5.43E+07	7.52E+07	6.87E+07
エンテロкокカス フェカリス ( <i>Enterococcus faecalis</i> )	3.89E+07	3.56E+07	4.39E+07	3.45E+07
ビフィドバクテリウ ム ロンガム ( <i>Bifidobacterium longum</i> )	4.66E+07	4.21E+07	4.32E+07	4.89E+07
ロイコノストック メセンテロイデス ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	1.28E+08	1.27E+08	—	1.22E+08

## [0086] 3. 乳酸菌含有チョコレート的人工胃液耐性試験

製造された乳酸菌含有チョコレートについて、参考例1と同様に乳酸菌含有チョコレート的人工胃液耐性試験を行った。また、対照として、それぞれの菌末についても、同様に実験を行った。結果は次の表12のとおりであった。乳酸菌末と比較して、各種菌含有チョコレートにおける乳酸菌の人工胃液耐性がはるかに高いことが分かった。

[0087]

[表12]

		添加時	30分	1時間	2時間
ラクトバチルス アシドフィルス ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	含有チョコレート	1.02E+08	7.14E+07	4.32E+07	4.68E+07
	菌末	6.67E+07	2.26E+07	1.69E+07	1.83E+07
ラクトバチルス ガッセリ ( <i>Lactobacillus gasseri</i> )	含有チョコレート	1.27E+08	5.43E+07	4.14E+07	6.24E+07
	菌末	5.98E+07	1.33E+07	6.96E+06	6.90E+05
エンテロコッカス フェカリス ( <i>Enterococcus faecalis</i> )	含有チョコレート	8.34E+07	7.86E+07	3.57E+07	3.00E+07
	菌末	5.15E+07	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
ビフィドバクテリ ウム ロンガム ( <i>Bifidobacterium longum</i> )	含有チョコレート	1.02E+08	3.18E+07	1.05E+07	9.30E+05
	菌末	6.76E+07	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
ロイコノストック メセンテロイデス ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	含有チョコレート	5.42E+08	1.44E+08	7.20E+07	8.58E+07
	菌末	5.08E+08	2.40E+03	0.00E+00	8.40E+03

## [0088] [参考例3] 乳酸菌含有アーモンドチョコレート

## 1. 乳酸菌含有アーモンドチョコレートの製造

乳酸菌としてラブレ菌を使用し、ラブレ菌末は参考例1と同様に調製した。配合割合は以下の表13のとおりである。製法の概略は図4Bに示すとおり、42℃から43℃で貯蔵されたチョコレート生地を37℃から38℃に調温したところに、乳酸菌末を加え、アーモンドのチョコ掛けに用いた。なお、乳酸菌含有アーモンドチョコレートの配合は、乳酸菌末に加え、砂糖：0～45重量%、全粉乳：0～20重量%、カカオマス：0～70重量%、ココアバター：0～25重量%、植物油脂：0～20重量%の範囲内で適宜

変更することができる。また、乳化剤、香料などの副原料も適宜追加することができ、それらの配合量も適宜調整することができる。さらに、食物繊維：0～15重量%、オリゴ糖0～10重量%を配合することもできる。センター材の種類はアーモンドに限られず適宜変更でき、またセンター材の配合量も適宜調整することができる。

[0089] [表13]

	重量%
砂糖	3.2
アーモンド	2.5
全粉乳	1.5
カカオマス	1.4
ココアバター	8
植物油脂	5
光沢剤	0.5
乳化剤	0.4
香料	0.1
乳酸菌末	0.4
計	100

[0090] 2. 乳酸菌含有アーモンドチョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験

製造された乳酸菌含有アーモンドチョコレートについて、参考例1の乳酸菌含有チョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験と同様に、乳酸菌含有アーモンドチョコレートの製造直後、あるいは、室温（約18℃）で3ヶ月から7ヶ月保存した試料中の乳酸菌生菌の数を調べた。結果は次の表14のとおりであり、極めて安定的に生菌状態を維持できることが分かった。

[0091] [表14]

	製造直後	3ヶ月	5ヶ月	7ヶ月
生菌数 (CFU/g)	3.70E+07	2.20E+07	8.10E+06	6.00E+06

[0092] 3. 乳酸菌含有アーモンドチョコレートの人工胃液耐性試験

製造された乳酸菌含有アーモンドチョコレートについて、参考例1と同様に乳酸菌含有アーモンドチョコレートの人工胃液耐性試験を行った。結果は



次の表15のとおりである。対照として、乳酸菌末についても、同様に実験を行った。乳酸菌末と比較して、乳酸菌含有アーモンドチョコレートにおける乳酸菌の人工胃液耐性ははるかに高いことが分かった。

[0093] [表15]

	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有 アーモンドチョコレート	2.62E+08	9.60E+07	8.10E+07	9.60E+07
乳酸菌末	2.94E+08	3.84E+04	1.14E+04	0.00E+00

[0094] [参考例4] 乳酸菌含有シュガーレスチョコレート

本参考例では、製法2に基づいて、次の表16の配合で、乳酸菌含有シュガーレスチョコレートを製造した。

[0095] [表16]

	重量%
糖アルコール	34
カカオマス	31
粉乳	16
植物油脂	16
ココアバター	2
乳化剤	0.5
香料	0.2
高甘味度甘味料	0.1
乳酸菌末	0.5
計	100

[0096] 乳酸菌含有シュガーレスチョコレートにおいても、乳酸菌の経時変化試験、人工胃液耐性試験において、参考例1とほぼ同様の経時安定性および人工胃液耐性を示した。

なお、乳酸菌含有シュガーレスチョコレートの配合は、乳酸菌末に加え、糖アルコール：0～50重量%、カカオマス：0～70重量%、乳等を主原料とする食品：0～25重量%、植物油脂：0～25重量%、ココアバター

: 0～25重量%の範囲内で適宜変更できる。また、高甘味度甘味料、乳化剤、香料などの副原料も適宜追加することができ、それらの配合量も適宜調整することができる。さらに、食物繊維: 0～15重量%、オリゴ糖: 0～10重量%を配合することができる。なお、使用できるオリゴ糖は、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、大豆オリゴ糖などがあるが、これらに限られない。

[0097] [参考例5] 乳酸菌含有油脂組成物

1. 乳酸菌含有油脂組成物の製造

参考例1と同様に調製されたラブレ菌末を用い、乳酸菌含有油脂組成物を製造した。配合量は以下の表17のとおりである。製法の概略は図4Cに示す。この乳酸菌含有油脂組成物は、常温(25℃)付近では固体であるが、ヒトの体温付近(35℃～40℃)では液状になり、ハンドクリームのような物性をもつ。

なお、乳酸菌含有油脂組成物の配合は、乳酸菌末に加え、砂糖: 0～80重量%、植物油脂: 20～99重量%、全粉乳: 0～40重量%、乳糖: 0～20重量%の範囲内で適宜変更できる。また、高甘味度甘味料、乳化剤、香料などの副原料も適宜追加することができ、それらの配合量も適宜調整することができる。さらに、食物繊維: 0～15重量%、オリゴ糖: 0～10重量%を配合することができる。なお、この乳酸菌含有油脂組成物は、ホワイトチョコレート、もしくはホワイトチョコレートに類似した組成物であり、焼き菓子やチョコレートなどの食品へのコーティングやトッピング、デコレーション用材料などとして使用することができるが、これに限らない。

[0098]

[表17]

	重量%
砂糖	40
植物油脂	34
全粉乳	19
乳糖	7
乳酸菌末	0.5
計	100

## [0099] 2. 乳酸菌含有油脂組成物中の乳酸菌生菌数の経時試験

製造された乳酸菌含有油脂組成物について、参考例1の乳酸菌含有チョコレート中の乳酸菌生菌数の経時試験と同様に、乳酸菌含有油脂組成物の製造直後、あるいは、室温（約25℃）で1ヶ月から2ヶ月保存した試料中の乳酸菌生菌の数を調べた。結果は次の表18のとおりであり、極めて安定的に生菌状態を維持できることが分かった。

[0100] [表18]

	製造直後	1ヶ月	2ヶ月
生菌数 (CFU/g)	4.48E+07	4.36E+07	4.32E+07

## [0101] 3. 乳酸菌含有油脂組成物の人工胃液耐性試験

製造された乳酸菌含有油脂組成物について、参考例1と同様に乳酸菌含有油脂組成物の人工胃液耐性試験を行った。結果は次の表19のとおりであった。対照として、乳酸菌末についても、同様に実験を行った。乳酸菌末と比較して、乳酸菌含有油脂組成物における乳酸菌の人工胃液耐性が高いたことが分かった。

[0102]

[表19]

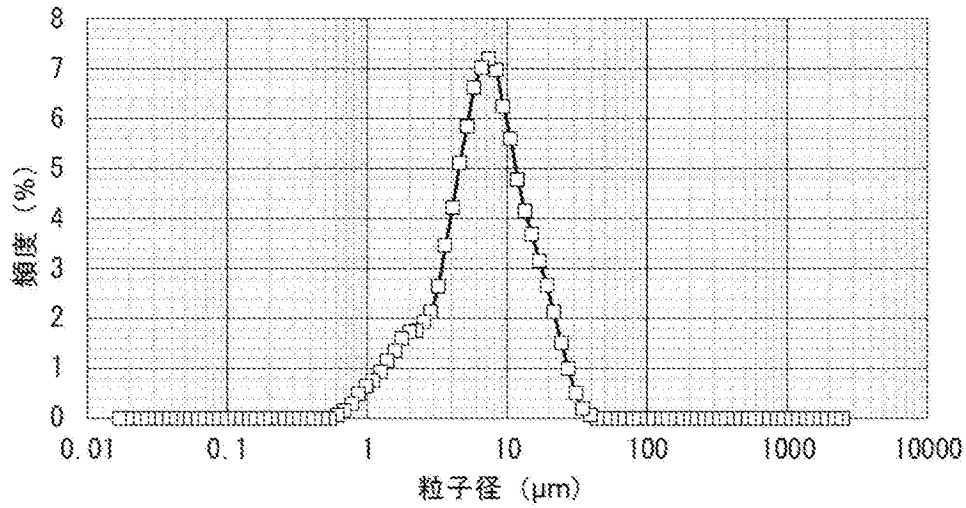
	添加時	30分	1時間	2時間
乳酸菌含有 油脂組成物	2.10E+08	2.55E+07	2.46E+07	3.45E+07
乳酸菌末	2.29E+08	5.46E+05	3.63E+04	0.00E+00

[0103] 本出願は、日本で出願された特願2016-158335（2016年8月11日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

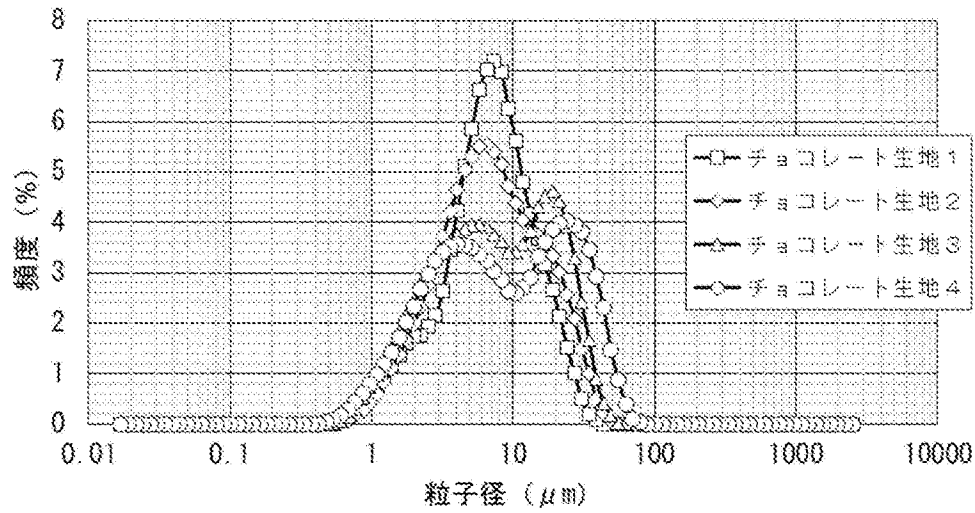
## 請求の範囲

- [請求項1] 生きた状態の乳酸菌を含有する乳酸菌含有チョコレートであって、該乳酸菌含有チョコレート中の固体粒子の平均粒子径が $1\ \mu\text{m}$ より大きく $9\ \mu\text{m}$ 未満である、乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項2] 該乳酸菌含有チョコレート中の固体粒子の平均粒子径が $7\ \mu\text{m}$ 未満であることを特徴とする請求項1に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項3] 粒子径が、単一の分布ピークを有することを特徴とする請求項1または2に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項4] 乳酸菌が、ラクトバチルス属、エンテロコッカス属、ビフィドバクテリウム属及びロイコノストック属からなる群から選ばれるいずれか1種以上である、請求項1から3のいずれか1項に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項5] 乳酸菌がラクトバチルス属ブレビス種である請求項1から4のいずれか1項に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項6] 乳酸菌を $1 \times 10^4$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下で含有することを特徴とする請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項7] 乳酸菌を $1 \times 10^6$ 個/グラム以上 $1 \times 10^{12}$ 個/グラム以下で含有することを特徴とする請求項1から6のいずれか1項に記載の乳酸菌含有チョコレート。
- [請求項8] 請求項1から7のいずれか1項に記載の乳酸菌含有チョコレートを含む食品。
- [請求項9] 原料の微粒化の際に平均粒子径を $9\ \mu\text{m}$ 未満まで微粒化することを特徴とする乳酸菌含有チョコレートの製造方法。
- [請求項10] 原料の微粒化の際に平均粒子径を $7\ \mu\text{m}$ 未満まで微粒化することを特徴とする請求項9に記載の乳酸菌含有チョコレートの製造方法。

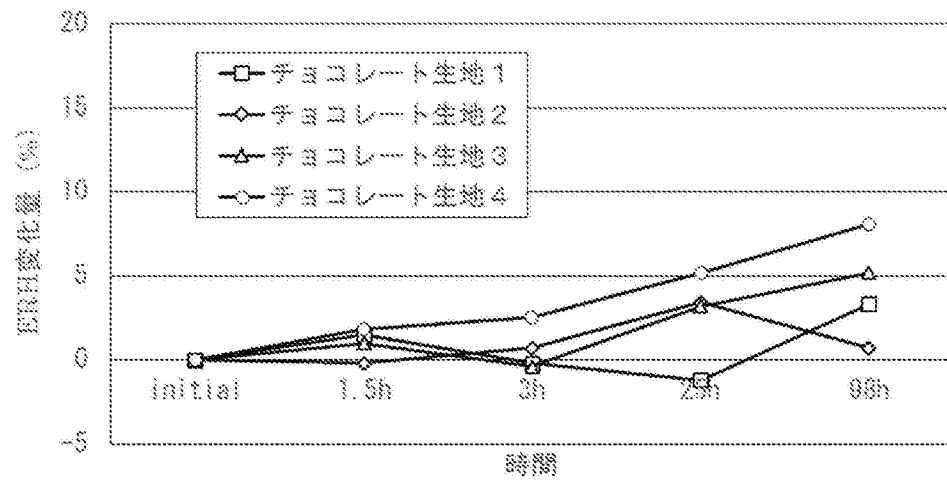
[図1]



[図2]

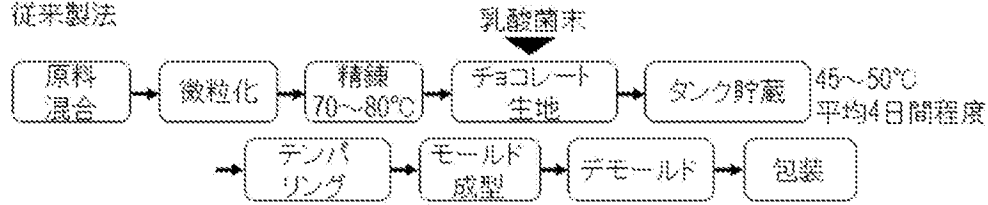


[図3]

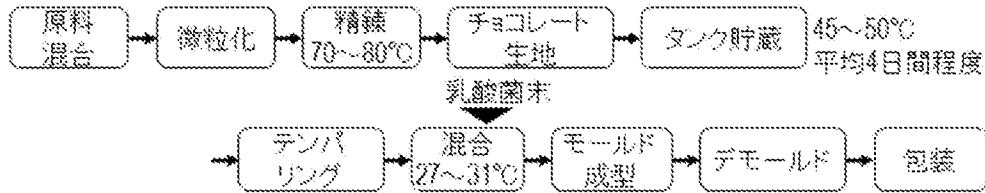


[図4A]

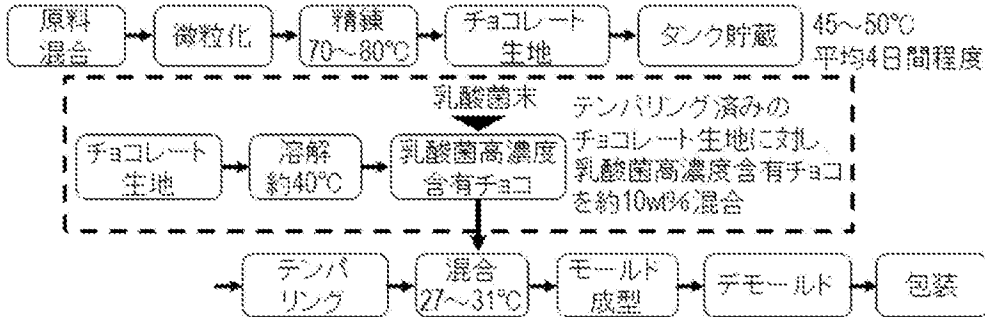
従来製法



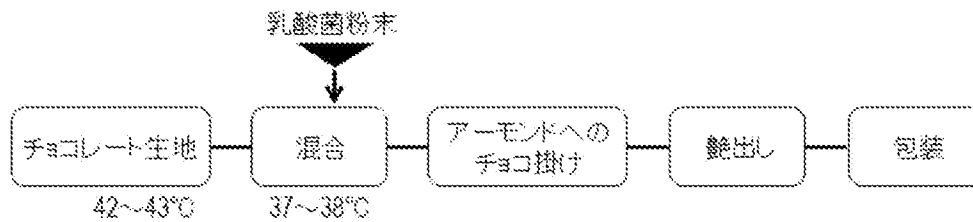
製法1



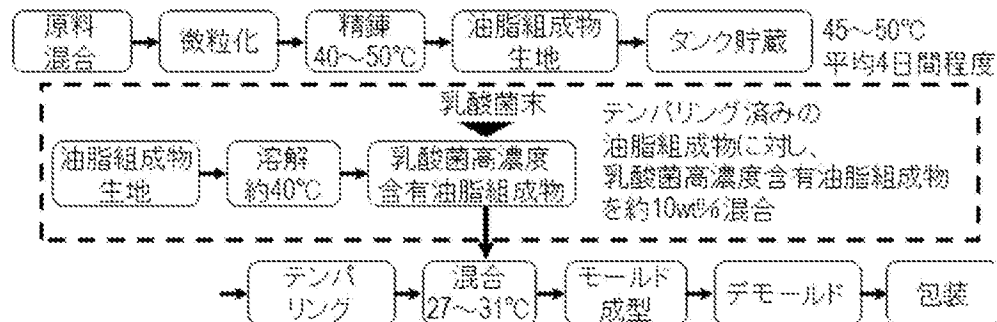
製法2



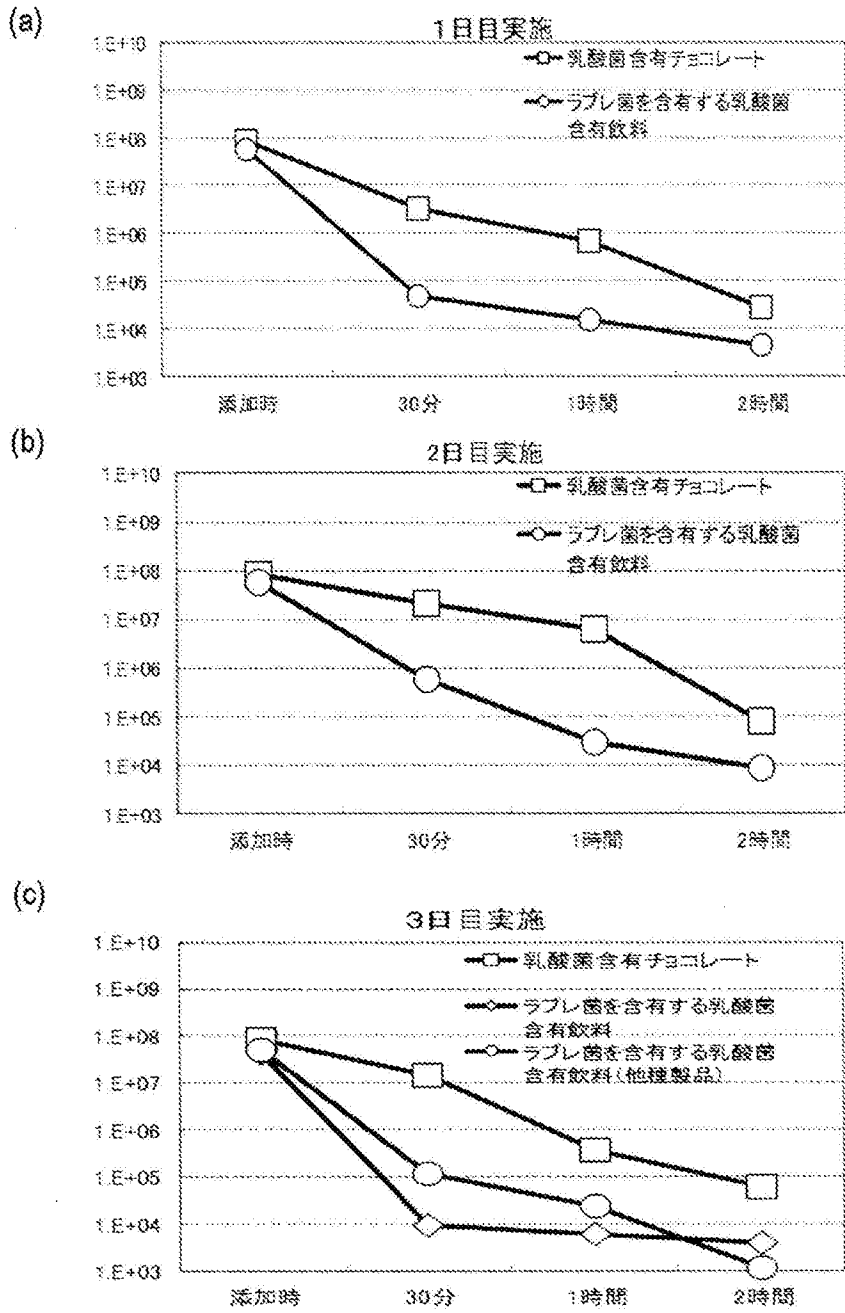
[図4B]



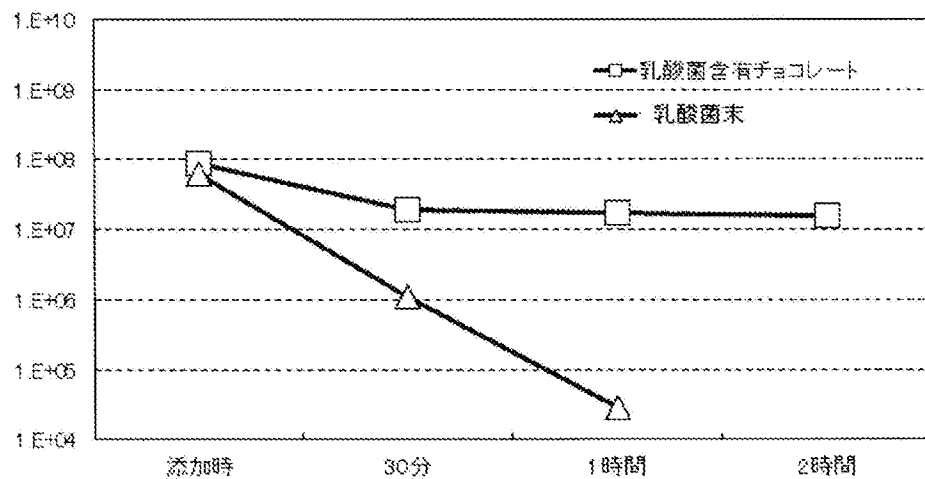
[図4C]



[図5]



[図6]





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2017/029046

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
A23G1/00(2006.01)i, A23G1/30(2006.01)i

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)  
A23G1/00, A23G1/30

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN), FSTA(STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	ZARIC, Danica B. et al., Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill, RSC Adv., 2016.01.28, Vol. 6, p. 13934-13941, ISSN 2046-2069, Table 1, 2, Fig .1	1, 4, 6-9/2-8, 10
Y	JP 05-284911 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 02 November 1993 (02.11.1993), claims; examples & US 5460847 A claims; examples	2-8, 10
Y	JP 2013-074818 A (Meiji Co., Ltd.), 25 April 2013 (25.04.2013), claims; examples (Family: none)	2-8, 10

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

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

Date of the actual completion of the international search 19 October 2017 (19.10.17)	Date of mailing of the international search report 31 October 2017 (31.10.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/029046

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YONEJIMA, Yasunori et al., Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance, <i>Biocatalysis and Agricultural Biotechnology</i> , 2015, Vol. 4, p. 773-777, ISSN 1878-8181, Fig. 1-4., Table 1	5-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23G1/00(2006.01)i, A23G1/30(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23G1/00, A23G1/30											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), FSTA (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/Y	ZARIC, Danica B. et al., Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill, RSC Adv., 2016.01.28, Vol. 6, p. 13934-13941, ISSN 2046-2069, Table 1, 2, Fig .1	1, 4, 6-9/2-8, 10									
Y	JP 05-284911 A (不二製油株式会社) 1993.11.02, 特許請求の範囲、実施例 & US 5460847 A, Claims, Examples	2-8, 10									
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 19.10.2017		国際調査報告の発送日 31.10.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小倉 梢	4N 4504								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3488								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-074818 A (株式会社明治) 2013.04.25, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	2-8, 10
Y	YONEJIMA, Yasunori et al., Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, Vol. 4, p. 773-777, ISSN 1878-8181, Fig. 1-4., Table 1	5-8