

(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
2022年9月1日(01.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/181782 A1

- (51) 国際特許分類:
CI2N 9/04 (2006.01) *A23L 5/00* (2016.01)
A23C 9/127 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/007979
- (22) 国際出願日: 2022年2月25日(25.02.2022)
- (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 2021-031032 2021年2月26日(26.02.2021) JP
特願 2021-133303 2021年8月18日(18.08.2021) JP
- (71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 掃部 正浩 (KAMON Masahiro); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP). 多田 周作 (TADA Shusaku); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP). 橋村 大 (HASHIMURA Dai); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP). 山城 寛 (YAMASHIRO Kan); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP). 林 卓磨 (HAYASHI Takuma); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社イノベーションセンター内 Gifu (JP).
- (74) 代理人: 渡邊 薫 (WATANABE Kaoru); 〒1080014 東京都港区芝四丁目10番5号 ヒューリック田町ビル6階 薫風国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FERMENTED FOOD OR BEVERAGE, AND ANAEROBIC FERMENTATION METHOD

(54) 発明の名称: 発酵飲食品の製造方法、及び嫌気発酵方法

(57) Abstract: The main purpose of the present invention is to newly provide a technique whereby it becomes possible to shorten the amount of time for anaerobic fermentation by reducing the concentration of oxygen contained in a raw material by a method other than an inert gas replacement method that requires the introduction of a facility. In this technique, a method for producing a fermented food or beverage is provided, which comprises: a carbohydrate oxidase action step for allowing a carbohydrate oxidase to act on a portion or the whole of a carbohydrate in a raw material; and an anaerobic fermentation step for performing anaerobic fermentation. In this technique, an oxygen concentration reducing agent for anaerobic fermentation use is also provided, which comprises a carbohydrate oxidase. In this technique, an anaerobic fermentation method is further provided, which includes a carbohydrate oxidase action step for allowing a carbohydrate oxidase to act on a portion or the whole of a carbohydrate in a raw material.

(57) 要約: 設備導入を必要とする不活性ガス置換法以外で原料中に含まれる酸素濃度を低減させることにより、嫌気発酵時間が短縮される技術を新たに提供することを主目的とする。本技術では、原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程と、嫌気発酵を行う嫌気発酵工程と、を含む、発酵飲食品の製造方法を提供する。本技術では、また、糖質酸化酵素を含む、嫌気発酵用酸素濃度低減剤を提供する。本技術では、さらに、原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程を含む、嫌気発酵方法を提供する。

WO 2022/181782 A1

ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：発酵飲食品の製造方法、及び嫌気発酵方法

技術分野

[0001] 本発明は、嫌気発酵の促進方法に関する。より具体的には、本発明は、糖質酸化酵素を用いて原料中に含まれる酸素濃度を低減させることで、嫌気発酵時間を短縮する製造技術に関する。

背景技術

[0002] 原料乳中の溶存酸素を窒素などの不活性ガスにより置換し、低減することで発酵効率が向上し、発酵乳の発酵時間の短縮ができることが非特許文献1及び特許文献1～3等で開示されている。不活性ガスを混入する代わりに、原料乳中に溶解している酸素を脱気により取り除くこともできる。さらに特許文献4では原料乳中に含まれる酸素濃度を低減させる工程と酵母ラクターゼを併用した発酵乳の製造法が開示されており、乳酸菌や酵素の状態によらず、風味や品質を一定に維持できるとされている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2005-176603号公報
特許文献2：特開2005-348703号公報
特許文献3：特開2007-104995号公報
特許文献4：国際公開第2012/026384号パンフレット

非特許文献

[0004] 非特許文献1：生物工学 第90巻 335-339頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 前述の通り、発酵効率を向上させる技術は様々に開発されつつあるが、従来の酸素濃度低減技術は不活性ガスを置換できる窒素置換装置など大掛かりな設備が必要となるという課題があった。

[0006] そこで、本技術では、設備導入を必要とする不活性ガス置換法以外で原料中に含まれる酸素濃度を低減させることにより、嫌気発酵時間が短縮される技術を新たに提供することを主目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、嫌気発酵時間が短縮される技術について鋭意研究を行った結果、原料乳中に糖質酸化酵素を作用させることで嫌気発酵時間が短縮されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本技術では、まず、原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程と、

嫌気発酵を行う嫌気発酵工程と、

を含む、発酵飲食品の製造方法を提供する。

本技術に係る発酵飲食品の製造方法において、前記糖質酸化酵素作用工程は、前記嫌気発酵工程の前及び／又は前記嫌気発酵工程と同時に行うことができる。

本技術では、前記糖質酸化酵素として、グルコース、マルトトリオース、マルトース、ガラクトース、マルトテトラオース、ラクトース、セロビオース、及びマルトデキストリンから選ばれる1以上の糖質に作用する性質を有する糖質酸化酵素を用いることができる。

また、本技術では、前記糖質酸化酵素として、以下の(1)から(3)のいずれかに示すポリペプチドからなる糖質酸化酵素を用いることができる。

(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(2) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸残基が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の基質特異性を示すポリペプチド、及び

(3) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が90%以上であり、且つ配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の基質特異性を示すポリペプチド。

本技術に係る発酵飲食品の製造方法において、前記嫌気発酵工程では乳酸

発酵を行うことができる。

本技術に係る発酵飲食品の製造方法では、前記発酵飲食品として発酵乳を製造することができる。

[0009] 本技術では、次に、糖質酸化酵素を含む、嫌気発酵用酸素濃度低減剤を提供する。

[0010] 本技術では、さらに、原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程を含む、嫌気発酵方法を提供する。

本技術に係る嫌気発酵方法において、前記糖質酸化酵素作用工程は、嫌気発酵工程の前及び／又は嫌気発酵工程と同時に行うことができる。

発明の効果

[0011] 本技術によれば、嫌気発酵において、糖質酸化酵素を用いて原料中に含まれる酸素濃度を低減させる処理を行うことで、設備導入を必要とせずに、嫌気発酵時間を短縮することができる。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0013] <1. 発酵飲食品の製造方法>

本技術に係る発酵飲食品の製造方法は、糖質酸化酵素作用工程と、嫌気発酵工程と、を少なくとも行う方法である。その他、発酵飲食品の種類等に応じて、各工程の前後や各工程と同時に、本技術の効果を損なわない範囲において、一般的な食品の製造工程を行うことも可能である。以下、各工程について詳細に説明する。

[0014] (1) 糖質酸化酵素作用工程

糖質酸化酵素作用工程は、原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる工程である。本技術では、原料中の糖質に糖質酸化酵素を作用させることで、原料中に含まれる酸素濃度を低減させることができる。その結果、後述する嫌気発酵工程における嫌気発酵時間を短縮することができる。

。

[0015] また、原料に糖質酸化酵素を作用させることで、後述する嫌気発酵工程を経て得られる発酵飲食品の曳糸性を向上させることができる。特に、植物性原料を発酵させる場合、例えば、牛乳のような動物性原料を用いた発酵飲食品に比べて、粘性や曳糸性が劣る場合があるといった問題があったが、本技術を用いれば、植物性原料を用いた発酵飲食品における曳糸性も向上させることができる。以下、本技術に用いることができる糖質酸化酵素について、詳細に説明する。

[0016] なお、本技術において、「曳糸性」とは、物質が持つ“糸を引く”性質のことであり、例えば、ザンカップ（Zahn Cup、株式会社離合社製）使用における、流出する試料の流れが途切れるまでの時間で評価することができる。飲食品の曳糸性が向上することで独特の食感を付与することができる。

[0017] A. 糖質酸化酵素

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、糖質を酸化できる酵素であれば特に限定されないが、好ましくは2糖以上のオリゴ糖を酸化する酵素である。具体的には、後述する理化学的性質を有するタンパク質が挙げられる。

[0018] (A) 作用

本技術に用いることができる糖質酸化酵素は、酸素存在下において、後述する糖を酸化し糖酸を生成する。より詳しくは、酸素存在下において、後述する糖に、本技術に用いることができる糖質酸化酵素を作用させると、糖酸と過酸化水素が生成する。

[0019] (B) 基質特異性

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、グルコース、マルトトリオース、マルトース、ガラクトース、マルトテトラオース、ラクトース、セロビオース、及びマルトデキストリンから選ばれる1以上の糖質に対し活性を示すタンパク質を用いることができる。各基質に対する相対活性は、

グルコースに対する活性を100%とした場合、マルトトリオース：約92%、マルトース：約86%、ガラクトース：約79%、マルトテトラオース：約60%、ラクトース：約58%、セロビオース：約53%、マルトデキストリン：約24%である。

なお、本発明においては、グルコースを基質とした場合の活性を基準（100%）としたときの相対活性が50%以上あれば、「本酵素が良好に作用する基質である」と判断した。

[0020] このように、グルコースのような単糖類のみならず、二糖類以上の広範囲な糖質にも活性を示す糖質酸化酵素を用いれば、既存のグルコースオキシダーゼやオリゴ糖酸化酵素では対応できなかった広範囲な分野において、糖質酸化作用を機能させることが可能である。

[0021] (C) K_m 値

本技術において、タンパク質の K_m 値（ミカエリス定数）の具体的な算出方法は特に限定されず、公知の方法を自由に選択して算出することができる。タンパク質の K_m 値の算出方法として、例えば、Lineweaver-Burkプロット、Eadie-Hofsteeプロット、Hanes-Woolfプロット等が挙げられ、好ましくはHanes-Woolfプロットが挙げられる。本技術に用いることができる糖質酸化酵素の K_m 値は特に限定されないが、 $[\text{グルコースの}K_m\text{値}] / [\text{マルトースの}K_m\text{値}] \leq 1$ であることが好ましく、 $0.4 \leq [\text{グルコースの}K_m\text{値}] / [\text{マルトースの}K_m\text{値}] \leq 1$ であることがより好ましい。

[0022] (D) 分子質量

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、SDS-PAGE法による分子質量が約63kDaの糖質酸化酵素を用いることができる。

[0023] (E) 至適pH

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、37℃で5分間の反応条件において、pH5.0～9.0付近で最も糖質酸化酵素活性が高い糖質酸化酵素を用いることができる。

[0024] (F) 安定 pH 範囲

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、37℃で15分間の処理条件において、pH 5.0～10.5付近において安定な糖質酸化酵素を用いることができる。

[0025] (G) 至適温度

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、pH 7.0で5分間の反応条件において、20℃～55℃付近で最も糖質酸化酵素活性が高い糖質酸化酵素を用いることができる。

[0026] (H) 温度安定性

本技術に用いることができる糖質酸化酵素としては、pH 7.0で15分間の処理条件において、45℃までの温度条件で処理しても80%以上の活性を維持することができる糖質酸化酵素を用いることができる。

[0027] (I) 由来について

以上説明した本技術に用いることができる糖質酸化酵素の由来は特に限定されないが、例えば、*Acremonium*属に属する微生物に由来するものが挙げられる。この場合、*Acremonium*属に属する微生物としては、*Acremonium chrysogenum*が挙げられる。

[0028] ここでの「*Acremonium chrysogenum*に由来する糖質酸化酵素」とは、*Acremonium chrysogenum*に分類される微生物（野生株であっても変異株であってもよい）が生産する糖質酸化酵素、あるいは糖質酸化酵素遺伝子を利用して遺伝子工学的手法によって得られた糖質酸化酵素であることを意味する。従って、*Acremonium chrysogenum*より取得した糖質酸化酵素遺伝子（又は当該遺伝子を改変した遺伝子）を導入した宿主微生物によって生産された組換え酵素も「*Acremonium chrysogenum*に由来する糖質酸化酵素」に該当する。

[0029] 本技術に用いることができる糖質酸化酵素がそれに由来することとなる *Acremonium chrysogenum* の例としては、*Acremo*

nium chrysogenum NBRC30055 (NITE、日本)、ATCC15006 (ATCC、アメリカ)、DSM880 (DSMZ、ドイツ)を挙げることができる。

[0030] (J) アミノ酸配列

本技術に用いることができる糖質酸化酵素のアミノ酸配列は限定されないが、一例を挙げると、以下のアミノ酸配列により特定することができる。

[0031] 具体的には、本技術に用いることができる糖質酸化酵素は、配列番号1で表されるアミノ酸配列で特定することができる。

[0032] ここで、一般に、あるタンパク質のアミノ酸配列の一部に改変を施した場合において改変後のタンパク質が改変前のタンパク質と同等の機能を有することがある。即ち、アミノ酸配列の改変がタンパク質の機能に対して実質的な影響を与えず、タンパク質の機能が改変前後において維持されることがある。そこで、本発明は他の態様として、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列からなり、糖質酸化酵素活性を有するタンパク質を提供する。「アミノ酸配列を構成する1から数個のアミノ酸の欠失、置換および／または付加」とは、典型的にアミノ酸配列の一部の相違のことをいう。

[0033] ここでのアミノ酸配列の相違は、糖質酸化酵素活性が保持されうる限り許容される（活性の多少の変動があってもよい）。この条件を満たす限り、アミノ酸配列が相違する位置は特に限定されず、また複数の位置で相違が生じていてもよい。ここでの複数とは、例えば、全アミノ酸配列の約30%未満に相当する数であり、好ましくは約20%未満に相当する数であり、さらに好ましくは約10%未満に相当する数であり、より一層好ましくは約5%未満に相当する数であり、最も好ましくは約1%未満に相当する数である。

即ち、配列番号1のアミノ酸配列と、例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、より一層好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の同一性を有することを指す。

[0034] また、好ましくは、糖質酸化酵素活性に必須でないアミノ酸残基において

、保存的アミノ酸置換を生じさせることによって、タンパク質を得る方法がよい。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基は、その側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0035] ところで、二つのアミノ酸配列又は二つの核酸（以下、これらを含む用語として「二つの配列」を使用する）の同一性（％）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる。この際、例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基又はヌクレオチド）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（即ち、同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数×100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数及びサイズも考慮に入れる。

[0036] また、二つの配列の比較及び同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、Karlin及びAltschul（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、Karlin及びAltschul（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズム

ムがあるが、これに限定されることはない。このようなアルゴリズムは、Altschulら(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10に記載のNBLASTプログラム及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。本発明の核酸分子に等価なヌクレオチド配列を得るには例えばNBLASTプログラムでscore=100、wordlength=12としてBLASTヌクレオチド検索を行えばよい。

[0037] 本発明のポリペプチド分子に等価なアミノ酸配列を得るには、例えば、XBLASTプログラムでscore=50、wordlength=3としてBLASTポリペプチド検索を行えばよい。比較のためのギャップアライメントを得るためにはAltschulら(1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402に記載のGapped BLASTが利用可能である。BLAST及びGapped BLASTを利用する場合は、対応するプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる。詳しくは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

[0038] 配列の比較に利用可能な他の数学的アルゴリズムの例としては、Myers及びMiller(1988) *Comput Appl Biosci.* 4:11-17に記載のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、例えばGENESTREAMネットワークサーバー(IGH Montpellier、フランス)又はISRECサーバーで利用可能なALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを使用する場合は例えば、PAM120残基質量表を利用し、ギャップ長ペナルティ=12、ギャップペナルティ=4とすることができる。

[0039] 本技術に用いることができる糖質酸化酵素は、より大きいタンパク質(例えば融合タンパク質)の一部であってもよい。融合タンパク質において付加される配列としては、例えば、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保する付加配列等が挙げられる。

[0040] 上記アミノ酸配列を有するタンパク質は、遺伝子工学的手法によって容易に調製することができる。例えば、本タンパク質をコードするDNAで適当な宿主細胞（例えば大腸菌、酵母、糸状菌）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜調製される。このように組換えタンパク質として本タンパク質を得ることにすれば、種々の修飾が可能である。例えば、本タンパク質をコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本タンパク質を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0041] 糖質酸化酵素作用工程の各種条件は、本技術の効果を損なわない限り、自由に設定することができる。例えば、用いる糖質酸化酵素の至適pH、安定pH範囲、至適温度、温度安定性などの理化学的性質に応じて、pH、温度、作用時間等を設定することができる。pHは例えば、pH5.0～10.5、好ましくはpH5.0～7.5に設定することができる。温度は例えば、20℃～55℃、好ましくは30℃～50℃、より好ましくは35℃～45℃に設定することができる。作用時間は例えば、1～12時間、好ましくは4～10時間に設定することができる。

[0042] 糖質酸化酵素作用工程における糖質酸化酵素の添加量は、本技術の効果を損なわない限り自由に設定することができる。例えば、発酵時間短縮効果の向上を目的とする場合は、原料に対して、0.005U/mL以上添加することが好ましく、0.008U/mL以上添加することがより好ましく、0.08U/mL以上添加することが更に好ましく、0.17U/mL以上添加することが更に好ましい。また、発酵飲食品の曳糸性向上を目的とする場合は、糖質酸化酵素を1.5U/mL以上添加することが好ましい。

[0043] 糖質酸化酵素作用工程では、本技術の効果を損なわない限り、糖質酸化酵素に加えて、他の酵素を併用することができる。例えば、ラクターゼ、プロテアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ラッカーゼ、パーオキシダーゼ、カタラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、およびアミラーゼから選択される1以上の酵素を併用することが可能である。

[0044] また、糖質酸化酵素作用工程では、糖質を併用することができる。糖質を併用することで、糖質の酸化時に飲食品原料中の酸素が消費されるため、脱酸素効果を向上させることができる。本技術で併用することができる糖質の種類は、本技術の効果を損なわない限り、特に限定されないが、例えば、澱粉、加工澱粉、デキストリン、セルロース、および加工セルロースから選択される1以上の糖質を併用することができる。

[0045] (2) 嫌気発酵工程

嫌気発酵工程では、原料の一部または全部を、嫌气的条件下で発酵させる工程である。嫌気発酵工程は、前記糖質酸化酵素作用工程後に行うこともできるし、前記糖質酸化酵素作用工程と同時に行うこともできる。

[0046] 本技術の嫌気発酵工程では、嫌気性微生物を用いて発酵を行うことができる。本技術で用いることができる嫌気性微生物は、本技術の効果を損なわない限り、製造する発酵飲食品の種類等に応じて、一般的な発酵飲食品の製造に用いることができる嫌気性微生物を1種以上、自由に選択して用いることができる。例えば、嫌気性微生物としては、乳酸菌、酵母等が挙げられる。

[0047] 本技術の嫌気発酵工程では、乳酸発酵を行うことができる。乳酸発酵時に用いる乳酸菌としては、本技術の効果を損なわない限り、製造する乳酸発酵飲食品の種類や目的に応じて、一般的な乳酸発酵飲食品の製造に用いることができる乳酸菌を1種以上、自由に選択して用いることができる。乳酸菌としては、例えば、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、ペディオコッカス (*Pediococcus*)、ロイコノストック (*Leuconostoc*) に属する乳酸球菌、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) に属する乳酸桿菌

、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) 等が挙げられ、好ましくは、*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*、*Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*が挙げられる。

[0048] なお、本技術では、前記糖質酸化酵素作用工程を行うことで、原料中に含まれる酸素濃度を低減させるため、嫌気発酵の進行を促進することができるが、好気発酵を行うことを排除するものではない。例えば、前記糖質酸化酵素作用工程を行う前に、好気性微生物を用いた好気発酵工程を行うことも可能であるし、少ない酸素でも生育可能な微生物であれば、前記糖質酸化酵素作用工程や嫌気発酵工程と同時または後に、好気発酵工程を行うことも可能である。

[0049] 嫌気発酵工程を行う際の各種条件は、本技術の効果を損なわない限り、自由に設定することができる。例えば、用いる嫌気性微生物の種類に応じて、発酵条件、加熱条件等を設定することができる。発酵温度は、例えば20℃～55℃、好ましくは30℃～50℃、より好ましくは35℃～45℃に設定することができる。発酵時間は、例えば1～12時間、好ましくは4～10時間に設定することができる。加熱条件は、例えば、高温短時間殺菌 (HTST) 法、高温加熱調理 (UHT) 法、レトルト法等が挙げられ、飲食品材料の温度が90℃以上、好ましくは95℃程度になる条件であればよい。飲食品材料を90～100℃にて1～5分間で処理する方法や、90～95℃にて1～3分間で処理する方法等が挙げられる。

[0050] 以上説明した発酵飲食品の製造方法を用いれば、様々な発酵飲食品を効率的に製造することができる。本技術において、「発酵飲食品」とは、飲食品材料を発酵することにより得られる飲食品をいう。具体的には、例えば、発酵乳 (ヨーグルト)、乳酸菌飲料、チーズ、ヨーグルトペースト、酒類 (日本酒、ビール、ワイン、焼酎等)、各種発酵調味料 (醤油、味噌、酢等)、ぬか漬け、キムチ、納豆、くずもち等が挙げられる。また、本技術において

、「発酵飲食品」には、これらの発酵飲食品を用いた二次加工飲食品も包含する。

[0051] 本技術において、「発酵乳」とは、動物由来の「動物性発酵乳」と植物由来の「植物性発酵乳」を指す。「動物性発酵乳」とは、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」において、「乳又はこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳等を乳酸菌又は酵母で発酵させ、糊状又は液状にしたもの又はこれらを凍結したもの」と定義されている「発酵乳」を指す。「植物性発酵乳」とは、植物性ミルクを発酵させたものを指し、植物性ミルクとは、例えば、エンドウ豆、大豆、そら豆、ひよこ豆、大麦、小麦、オーツ麦、米、そば、ひえ、あわ、ヘンプ（産業用ヘンプ）、藻類、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クルミ、ブラジルナッツ、ピーナッツ、ココナッツ由来の植物性ミルクが挙げられる。

[0052] 本技術に係る発酵飲食品の製造方法における各工程では、飲食品材料（動物性乳、植物性乳、穀物、野菜、果物、豆類、魚介類、肉類等）、各種酵素、各種微生物の他に、本技術の効果を損なわない限り、一般的な飲食品の製造時に用いる原料を自由に選択して用いることができる。例えば、各種調味料、pH調整剤、着色剤、矯味剤、安定剤等を用いることができる。

[0053] <2. 嫌気発酵用酸素濃度低減剤>

本技術に係る嫌気発酵用酸素濃度低減剤は、糖質酸化酵素を有効成分として含有する。糖質酸化酵素の詳細は、前述した発酵飲食品の製造方法に用いることができる糖質酸化酵素と同一であるため、ここでは説明を割愛する。

[0054] 嫌気発酵用酸素濃度低減剤は、前述した糖質酸化酵素を含有していれば、前述した糖質酸化酵素のみで構成されていてもよいし、本技術の効果を損なわない限り、他の成分を1種又は2種以上、自由に選択して含有させることもできる。他の成分としては、例えば、通常製剤化に用いられている賦形剤、pH調整剤、着色剤、矯味剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤等の成分を用いることができる。更に、公知の又は将来的に見出される機能を有する成分を、

適宜目的に応じて併用することも可能である。

[0055] <3. 嫌気発酵方法>

本技術に係る嫌気発酵方法は、糖質酸化酵素作用工程と、嫌気発酵工程と、を少なくとも行う方法である。本技術に係る嫌気発酵方法で行う糖質酸化酵素作用工程及び嫌気発酵工程の詳細は、前述した発酵飲食品の製造方法における糖質酸化酵素作用工程及び嫌気発酵工程と同一であるため、ここでは説明を割愛する。

実施例

[0056] 以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。なお、以下に説明する実施例は、本発明の代表的な実施例の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0057] なお、本技術では、糖質酸化酵素の活性測定法として、以下の測定方法を用いた。

[グルコースオキシダーゼ活性測定法]

適当量の酵素を量り、冷却した pH 7.0 のリン酸カリウム・水酸化ナトリウム緩衝液 (0.1 mol/L) を加えて溶解又は均一に分散して 50 mL としたものを試料液とした。D (+) - グルコース 2.50 g を量り、水を加えて溶かし、25 mL としたものを基質溶液とした。基質溶液 0.5 mL、リン酸カリウム・水酸化ナトリウム緩衝液 (0.1 mol/L、pH 7.0、フェノール含有) 2 mL、パーオキシダーゼ試液 (25 単位/mL) 0.5 mL 及び 4 - アミノアンチピリン溶液 (1 → 250) 0.1 mL を石英セルに入れ、37°C で 10 分間加温した。この液に試料液 0.1 mL を加えてよく混ぜて 37°C で加温し、検液とした。別に試料液の代わりに pH 7.0 のリン酸カリウム・水酸化ナトリウム緩衝液 (0.1 mol/L) 又は水を用いて検液の調製と同様に操作し、比較液とした。検液及び比較液につき、試料液添加 2 分後及び 5 分後の波長 500 nm における吸光度を測定した。生成したキノンイミン色素のモル吸光係数から酸化されたグルコース量を定量した。条件下、1 分間に 1 μmol のグルコースを酸化するのに必要

な酵素量を1単位とした。

[0058] <実験例1>

実験例1では、乳原料の発酵時に、糖質酸化酵素を用いた場合の乳原料中の溶存酸素濃度の挙動と、発酵時間への影響を調べた。

[0059] (1) 実験方法

市販牛乳（「明治おいしい牛乳」（無脂乳固形分8.3%以上、乳脂肪分3.5%以上）、株式会社明治製）380g、市販スキムミルク（森永乳業株式会社製）11g、水57gをガラス容器内で混ぜて乳原料ミックスを調製した後、95℃で5分間殺菌処理した。続いて、室温まで戻した殺菌処理済み乳原料ミックスをクリーンベンチ内で50mLチューブ内に30mLずつ分注し、糖質酸化酵素の一例として、WO2014/042237に記載の方法で調製された酵素を5~120U（対乳原料ミックス）（0.17~4U/mL）になるように添加後、*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*ならびに*Streptococcus thermophilus*を含む乳酸菌スターターを2v/v%添加し、5回転倒混和した後、恒温水槽にて37℃で数時間発酵を行った。発酵時のpHおよび溶存酸素の挙動はそれぞれpHセンサー、DOセンサーを用いることでモニタリングした。

[0060] (2) 結果

結果を表1に示す。

[表1]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	溶存酸素が開始から 10%未満までになる時間	pH5.5に到達する時間
無添加	2.5時間	2.8時間
0.17	0.3時間	2.3時間
0.4	~0.2時間	2.2時間
0.8	~0.2時間	1.9時間
4	~0.2時間	1.8時間

[0061] (3) 考察

表1に示す通り、溶存酸素の挙動を確認した結果、酵素無添加区では溶存酸素が発酵初期の10%未満になるまでにかかる時間が2.5時間であったが、これに対して糖質酸化酵素添加区では0.3時間まで短縮され、酵素処理により酸素を除去できることが明らかとなった。さらに、pH挙動を確認したところ、酵素無添加区では乳原料のカードが形成されるpH5.5に到達するまでに2.8時間要したが、糖質酸化酵素添加区では0.17U/mLで2.3時間、0.8U/mL以上で1.9時間と、最大で1時間の発酵時間短縮が認められた。これらの結果から、糖質酸化酵素の作用によって乳原料の酸素濃度を低減させることで嫌気発酵を促進させ、発酵時間を短縮できることが明らかとなった。

[0062] <実験例2>

実験例2では、糖質酸化酵素とラクターゼの併用効果を確認した。

[0063] (1) 実験方法

ラクターゼとしてLactase Y "Amano" L-K (*Kluyveromyces lactis*由来ラクターゼ)を用いた。実験例1と同様に殺菌処理済み乳原料ミックスを調製、クリーンベンチ内で15mLチューブに10mLずつ分注し、糖質酸化酵素を0.8U(対乳原料ミックス)(0.08U/mL)、ラクターゼ剤を0.02~0.1v/v%(2~10U/mL)、乳酸菌スターターを2v/v%添加し、5回転倒混和した後、恒温水槽にて37℃で数時間発酵を行った。1時間ごとに0.5mLずつサンプリングし、乳原料ミックスのpHを確認した。

[0064] (2) 結果

結果を表2に示す。

[表2]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	ラクターゼ剤添加量 (U/mL)	発酵4時間後のpH	4時間後の発酵乳の物性
無添加	無添加	5.59	固まっていない
0.08	無添加	5.23	ほぼ固まっているが、逆さにして少し垂れる
0.08	2	5.12	ほぼ固まっており、逆さにしても全く垂れない
0.08	5	5.2	
0.08	10	5.11	

(3) 考察

表2に示す通り、発酵4時間で酵素併用効果が確認された。糖質酸化酵素単独処理では発酵4時間でカードは形成されているが、物性はややゆるく、チューブを逆さにすると少し垂れるのに対して、糖質酸化酵素とラクターゼ併用添加処理ではカードは垂れず、より強固な物性であることが明らかとなった。これらの結果から、糖質酸化酵素とラクターゼの併用効果が認められた。

[0065] <実験例3>

実験例3では、発酵工程前に、糖質酸化酵素による処理を行った場合の効果について確認した。

[0066] (1) 実験方法

実験例1と同様に殺菌処理済み乳原料ミックスを調製、クリーンベンチ内で15mLチューブに10mLずつ分注し、糖質酸化酵素を無添加または0.08~39.1U（対乳原料ミックス）（0.08~3.91U/mL）添加し、5回転倒混和した後、5℃低温庫で一晩（20時間）反応させた。酵素無添加または0.08~39.1U（対乳原料ミックス）（0.08~3.91U/mL）の糖質酸化酵素で処理した乳原料ミックスを100℃で10分間殺菌処理し、室温まで戻した後に乳酸菌スターターを2v/v%添加、5回転倒混和した後、恒温水槽にて37℃で数時間発酵を行った。1時間ごとに0.5mLずつサンプリングし、乳原料ミックスのpHを確認した。

[0067] (2) 結果

結果を表3に示す。

[表3]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	発酵4時間後のpH	4時間後の発酵乳の物性
無添加	5.58	固まっていない
0.08	5.43	固まっている
0.16	5.22	
0.39	5.34	
0.78	5.29	
3.91	5.18	

[0068] (3) 考察

表3に示す通り、発酵工程前に、糖質酸化酵素による処理を行った場合でも、糖質酸化酵素添加量依存的に発酵時間が短縮されることが認められ、発酵前または発酵工程中でも効果を発揮できることが明らかとなった。

[0069] <実験例4>

実験例4では、植物性原料の発酵時に、糖質酸化酵素を用いた場合の発酵時間への影響を調べた。植物性原料として、豆乳を用いた。

[0070] (1) 実験方法

大豆100gに常水400g入れ、24時間浸漬した。浸漬大豆を取り出し、100gをミキサーで粉砕(2分程度)し、ご汁を調製した。得られたご汁に、ご汁の7倍の水を加えながら、ミキサーでさらに細かく破碎した。破碎したものを鍋に入れ、沸騰してから中火~弱火で焦げつかないようにヘラで混ぜながら10分間火入れした。冷却後、こし袋に入れ、ご汁を漉して、豆乳を調製した。調製した豆乳を、50mLチューブに30mL分注し、95℃で5分間殺菌した。

[0071] 殺菌した豆乳を水冷し、クリーンベンチにてLactobacillus

*delbrueckii subsp. delbrueckii*を含む乳酸菌スターターを0.6 mLと、前記実験例1で用いた糖質酸化酵素を0.24 U (0.008 U/mL) 添加し、37°Cで一晩発酵を行った。発酵中、pHセンサーでpHをモニターした。なお、糖質酸化酵素を添加しなかった例を酵素無添加区とした。

[0072] (2) 結果

結果を表4に示す。

[0073] [表4]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	pH4.5に到達する時間	短縮時間
無添加	9.3時間	-
0.008U/mL	8.2時間	1.1時間

[0074] (3) 考察

表4に示す通り、酵素無添加区では豆乳原料のカードが形成されるpH4.5に到達するまでに9.3時間要したが、糖質酸化酵素添加区では8.2時間と、1.1時間の発酵時間短縮が認められた。この結果から、植物性原料である豆乳を用いた場合も、本技術を用いれば発酵時間を短縮できることが明らかとなった。

[0075] <実験例5>

実験例5では、植物性原料としてオーツミルクを用いて発酵を行った際、糖質酸化酵素を用いた場合の発酵時間への影響を調べた。

[0076] (1) 実験方法

オーツミルク (Oatly社製「オーツミルク」) を10 mLずつ分注し、クリーンベンチにて*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*を含む乳酸菌スターターを0.2 mLと、前記実験例1で用いた糖質酸化酵素を0.08 U (0.008 U/mL) 添加し、37°Cで一晩発酵を行った。発酵中、pHセンサーでpH

をモニターした。なお、糖質酸化酵素を添加しなかった例を酵素無添加区とした。

[0077] (2) 結果

結果を表5に示す。

[0078] [表5]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	pH4.5に到達する時間	短縮時間
無添加	7.8時間	-
0.008U/mL	5.5時間	2.3時間

[0079] (3) 考察

表5に示す通り、酵素無添加区ではオーツミルク原料のカードが形成されるpH4.5に到達するまでに7.8時間要したが、糖質酸化酵素添加区では5.5時間と、2.3時間の発酵時間短縮が認められた。この結果から、植物性原料であるオーツミルクを用いた場合も、本技術を用いれば発酵時間を短縮できることが明らかとなった。

[0080] <実験例6>

実験例6では、植物性原料の発酵時に、糖質酸化酵素を用いた場合の曳糸性への影響を調べた。植物性原料として、豆乳を用いた。

[0081] (1) 実験方法

滅菌済み300mLビーカーに、豆乳（マルサンアイ株式会社製「オーガニック 成分無調整豆乳」）を280mL分注し、水冷後、クリーンベンチにて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*を含む乳酸菌スターターを5.6mLと、前記実験例1で用いた糖質酸化酵素を1.5U/mL又はセルラーゼを2.0U/mLとなるよう添加し、37°Cで一晩発酵を行った。発酵後、豆乳ヨーグルトの曳糸性について、ザーンカップを用いて流出時間を計測した。具体的には、ザーンカップのオリフィスから流出する試料の流れが途切れるまでの時間

を流出時間とした。なお、糖質酸化酵素を添加しなかった例を酵素無添加区とした。

[0082] (2) 結果

結果を表6に示す。

[0083] [表6]

酵素	流出時間
無添加	6秒
1.5U/mL糖質酸化酵素	100秒
2U/mLセルラーゼ	30秒

[0084] (3) 考察

表6に示す通り、酵素無添加区では流出時間が6秒であるところ、糖質酸化酵素添加区では流出時間が100秒と、飛躍的に曳糸性が向上していた。また、セルラーゼ添加区では、酵素無添加区に比べると曳糸性の向上が見られたが、曳糸性の向上効果は、糖質酸化酵素添加区でより顕著であった。この結果から、本技術を用いれば、植物性原料を用いた場合でも、曳糸性を向上させることが明らかとなった。

[0085] <実験例7>

実験例7では、植物性原料の発酵後の曳糸性について、添加する糖質酸化酵素の添加量の影響を調べた。植物性原料として、豆乳を用いた。

[0086] (1) 実験方法

滅菌済み300mLビーカーに、豆乳（マルサンアイ株式会社製「オーガニック 成分無調整豆乳」）を280mL分注し、水冷後、クリーンベンチにて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*を含む乳酸菌スターターを5.6mLと、前記実験例1で用いた糖質酸化酵素を下記の表7に示す量添加し、37℃で一晩発酵を行った。発酵後、豆乳ヨーグルトの曳糸性について、ザーンカップを用

いて流出時間を計測した。

[0087] (2) 結果

結果を表7に示す。

[0088] [表7]

糖質酸化酵素添加量 (U/mL)	流出時間
0.015	13秒
0.15	13秒
1.5	100秒
15	165秒

[0089] (3) 考察

表7に示す通り、糖質酸化酵素の添加量が0.015 U/mLおよび0.15 U/mLの場合に比べて、1.5 U/mL以上添加した場合、飛躍的に流出時間が延びていた。この結果から、曳糸性向上を確実に実現するためには、糖質酸化酵素を1.5 U/mL以上添加することが好ましいことが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] 原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程と、
嫌気発酵を行う嫌気発酵工程と、
を含む、発酵飲食品の製造方法。
- [請求項2] 前記糖質酸化酵素作用工程は、前記嫌気発酵工程の前及び／又は前記嫌気発酵工程と同時に行われる、請求項1に記載の発酵飲食品の製造方法。
- [請求項3] 前記糖質酸化酵素が、グルコース、マルトトリオース、マルトース、ガラクトース、マルトテトラオース、ラクトース、セロビオース、及びマルトデキストリンから選ばれる1以上の糖質に作用する性質を有する、請求項1又は2に記載の発酵飲食品の製造方法。
- [請求項4] 前記糖質酸化酵素が、以下の(1)から(3)のいずれかに示すポリペプチドからなる、請求項1から3のいずれか一項に記載の発酵飲食品の製造方法。
(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、
(2) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸残基が置換、付加、挿入又は欠失されてなり、且つ配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の基質特異性を示すポリペプチド、及び
(3) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、配列番号1に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が90%以上であり、且つ配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の基質特異性を示すポリペプチド。
- [請求項5] 前記嫌気発酵工程では乳酸発酵が行われる、請求項1から4のいずれか一項に記載の発酵飲食品の製造方法。
- [請求項6] 前記発酵飲食品が発酵乳である、請求項1から5のいずれか一項に記載の発酵飲食品の製造方法。

- [請求項7] 糖質酸化酵素を含む、嫌気発酵用酸素濃度低減剤。
- [請求項8] 原料中の糖質の一部または全部に糖質酸化酵素を作用させる糖質酸化酵素作用工程を含む、嫌気発酵方法。
- [請求項9] 前記糖質酸化酵素作用工程が、嫌気発酵工程の前及び／又は嫌気発酵工程と同時に行われる、請求項8に記載の嫌気発酵方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 9/04</i> (2006.01)i; <i>A23C 9/127</i> (2006.01)i; <i>A23L 5/00</i> (2016.01)i FI: A23C9/127 ZNA; A23L5/00 J; C12N9/04 D		
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) A23C9/127; A23L5/00; C12N9/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); FSTA/CAplus/AGRICOLA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN); Google		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2012/121090 A1 (MEIJI CO., LTD.) 13 September 2012 (2012-09-13) claims, examples	1-3, 5-6, 8-9 4-6 7
X Y A	WO 2015/041194 A1 (MEIJI CO., LTD.) 26 March 2015 (2015-03-26) claims, examples	1-3, 5-6, 8-9 4-6 7
Y A	WO 2014/042237 A1 (AMANO ENZYME INC) 20 March 2014 (2014-03-20) claims, examples, sequence tables	4-6 1-3, 7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2022		Date of mailing of the international search report 10 May 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007979

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2-265443 A (KARUTAA LTD) 30 October 1990 (1990-10-30) claims, examples	1-3, 5, 7-9
Y		4-5
A		6
A	CRUZ, A. G. et al. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. J. Daily Sci. 2012, vol. 95, no. 5, pp. 2261-2269 MATERIALS AND METHODS: Yogurt Processing	1-9
A	US 2482724 A (BAKER, Dwight L.) 20 September 1949 (1949-09-20) claims, examples	1-9
A	JP 61-271959 A (OREOFUINA SA) 02 December 1986 (1986-12-02) claims, examples	1-9
A	JP 62-285778 A (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 11 December 1987 (1987-12-11) claims, examples	1-9

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/007979

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2012/121090	A1	13 September 2012	CN 103547162 A claims, examples	
WO	2015/041194	A1	26 March 2015	CN 105555143 A claims, examples	
WO	2014/042237	A1	20 March 2014	US 2015/0232813 A1 claims, examples, SEQUENCE LISTING	
				EP 2896694 A1	
JP	2-265443	A	30 October 1990	US 4751089 A claims, examples	
				WO 84/001694 A1	
				EP 0108568 A1	
US	2482724	A	20 September 1949	(Family: none)	
JP	61-271959	A	02 December 1986	US 4957749 A claims, examples	
				EP 0207039 A1	
JP	62-285778	A	11 December 1987	US 4775626 A claims, examples	
				EP 0246912 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 9/04(2006.01)i; A23C 9/127(2006.01)i; A23L 5/00(2016.01)i FI: A23C9/127 ZNA; A23L5/00 J; C12N9/04 D		
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）） A23C9/127; A23L5/00; C12N9/04 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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); FSTA/CAplus/AGRICOLA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN); Google		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	WO 2012/121090 A1 (株式会社明治) 13.09.2012 (2012-09-13) 請求項、実施例	1-3, 5-6, 8-9 4-6 7
X Y A	WO 2015/041194 A1 (株式会社明治) 26.03.2015 (2015-03-26) 請求項、実施例	1-3, 5-6, 8-9 4-6 7
Y A	WO 2014/042237 A1 (天野エンザイム株式会社) 20.03.2014 (2014-03-20) 請求項、実施例、配列表	4-6 1-3, 7-9
X Y A	JP 2-265443 A (カルターリミテイツド) 30.10.1990 (1990-10-30) 請求項、実施例	1-3, 5, 7-9 4-5 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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抵触するものではなく、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 19.04.2022		国際調査報告の発送日 10.05.2022
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 戸来 幸男 40 3964 電話番号 03-3581-1101 内線 3461

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
A	CRUZ A. G. et al., Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds., J. Daily Sci., 2012, vol.95, no.5, pp.2261-2269 MATERIALS AND METHODS: Yogurt Processing	1-9
A	US 2482724 A (BAKER, dwight L.) 20.09.1949 (1949 - 09 - 20) Claims, Examples	1-9
A	JP 61-271959 A (オレオフィナ・ソシエテ・アノニム) 02.12.1986 (1986 - 12 - 02) 請求項、実施例	1-9
A	JP 62-285778 A (シンテツクス (ユー・エス・エイ) インコーポレイテッド) 11.12.1987 (1987 - 12 - 11) 請求項、実施例	1-9

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/007979

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2012/121090	A1	13.09.2012	CN	103547162	A	
				Claims, Examples			
WO	2015/041194	A1	26.03.2015	CN	10555143	A	
				Claims, Examples			
WO	2014/042237	A1	20.03.2014	US	2015/0232813	A1	
				Claims, Examples, SEQUENCE LISTING			
				EP	2896694	A1	
JP	2-265443	A	30.10.1990	US	4751089	A	
				Claims, Examples			
				WO	84/001694	A1	
				EP	0108568	A1	
US	2482724	A	20.09.1949	(ファミリーなし)			
JP	61-271959	A	02.12.1986	US	4957749	A	
				Claims, Examples			
				EP	0207039	A1	
JP	62-285778	A	11.12.1987	US	4775626	A	
				Claims Examples			
				EP	0246912	A2	