(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
2016 年 4 月 21 日(21.04.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/060224 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/38 (2006.01) *C12N 9/96* (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/079259

(22) 国際出願日: 2015 年 10 月 16 日(16.10.2015)

(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 2014-213093 2014 年 10 月 17 日(17.10.2014) JP

(71) 出願人: 合同酒精株式会社(GODO SHUSEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座６－２－１０ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 長畑　直樹(NAGAHATA, Naoki); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０　合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内 Chiba (JP). 堀口　博文(HORIGUCHI, Hirofumi); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０　合同酒精株式会社酵素医薬品研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 伊藤　温(ITOH, Atsushi); 〒1040045 東京都中央区築地４－１－１　東劇ビル４階 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 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).

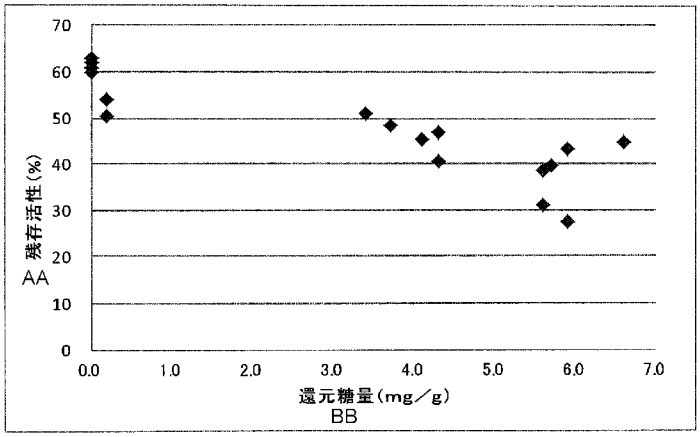
添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: LACTASE SOLUTION AND MILK USING SAME

(54) 発明の名称 : ラクターゼ溶液及びそれを用いた乳

［図1］

【図1】



AA Residual activity (%)
BB Reducing sugar content (mg/g)

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a means for stabilizing a lactase solution. [Solution] A lactase solution containing 0.1-100 g/kg of sugars on the basis of the total mass of the lactase solution, characterized in that the reducing sugar content of the lactase solution is not more than 2.0 mg/g.

(57) 要約: 【課題】　ラクターゼ溶液の安定性を図る手段の提供。 【解決手段】　ラクターゼ溶液であって、前記ラクターゼ溶液の全質量を基準として、糖類を０．１ｇ／ｋｇ～１００ｇ／ｋｇ含有し、前記ラクターゼ溶液の還元糖量が２．０ｍｇ／ｇ以下であることを特徴とするラクターゼ溶液。

WO 2016/060224 A1

明　細　書

発明の名称 ： ラクターゼ溶液及びそれを用いた乳

技術分野

[0001] 本発明は、還元糖量を所定値以下としたラクターゼ溶液及びそれを用いた乳、乳製品などの製造方法に関する。

背景技術

[0002] ラクターゼは、ラクトースをグルコース及びガラクトースに分解する酵素である。牛乳等の乳原料を使用した乳製品中にはラクトースが存在する。多くのヒトの小腸にはラクターゼが存在するため、乳製品中のラクトースは小腸でグルコースとガラクトースに分解される。しかし、ラクターゼが十分に作用しない一部のヒトにおいては、ラクトースが十分に分解されず、下痢や消化不良の症状が生じる。このような症状を防ぐために、ラクターゼはラクトースを予め分解した乳製品を製造するために広く使用されている。

[0003] 現在の技術水準において、化学的にラクターゼを合成することは極めて困難であるため、乳製品の製造に使用されるラクターゼは、酵母やカビ、細菌等の微生物を用いて生産される。しかしながら、当該微生物はラクターゼ以外の物質も生産するため、ラクターゼ溶液にはラクターゼ以外の物質も含むことが通常である。

[0004] ここで、酵素は一般に、熱やｐＨ変化などに対する安定性が低いうえ、共存する物質の影響を受けやすいという欠点がある。特に、酵素を含有する形態が水を含む系であったり、水溶液である場合、保存中にも活性が徐々に低下する問題点がある。酵素の失活は、一般には熱運動による構造変化に基づく変性失活が考えられる。またラクターゼ以外の物質として、タンパク質分解酵素が含まれる場合、更に酵素相互の分解（自己消化）による失活も起こる。これらの問題解決のため、種々の安定化剤を添加したり、冷蔵保存するなどの対策が取られている。

[0005] たとえば、防腐剤の作用による失活を低減するために、グリセロールキナ

ーゼ溶液に糖類を入れる技術が存在する（特許文献１）。また、プロテアーゼ溶液の安定化のために多糖類を添加することが提案されている（特許文献２）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００４－１４１１６２号公報

特許文献2：特開平３－４７９０号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ラクターゼ溶液の保存安定性を図る手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、特許文献１及び２に係る技術に基づき、ラクターゼ溶液への糖類の添加を試みた。しかし、単に糖類を添加することによっては、ラクターゼ溶液の十分な保存安定性を図ることが出来ない旨の知見を得た。本発明者らは、当該糖類の量を特定量に限定し、且つ、還元糖量を所定値以下とすることで、ラクターゼ溶液の保存安定性を図ることができることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] したがって、本発明によれば、

［１］ ラクターゼ溶液であって、

前記ラクターゼ溶液の全質量を基準として、糖類を０．１ｇ／ｋｇ～１００ｇ／ｋｇ含有し、

前記ラクターゼ溶液の還元糖量が２．０ｍｇ／ｇ以下である

ことを特徴とするラクターゼ溶液；

［２］ ５０℃で７日間放置後の残存活性が６０％以上である、［１］に記載のラクターゼ溶液；

［３］ 前記糖類の重量平均分子量が５００～２，０００，０００である、

［１］又は［２］に記載のラクターゼ溶液；

［４］　ラクターゼの活性が、１０～１００，０００NLU/gである、［１］～［３］のいずれか１項に記載のラクターゼ溶液；

［５］　ラクターゼ溶液が安定剤を含有する、［１］～［４］のいずれか１項に記載のラクターゼ溶液；

［６］　［１］～［５］のいずれか１項記載のラクターゼ溶液を添加することにより得られた乳；

［７］　［１］～［５］のいずれか１項記載のラクターゼ溶液又は請求項６記載の乳を少なくとも一原料として得られた乳製品

が提供される。

発明の効果

[0010]　本発明により、ラクターゼの酵素としての保存安定性が改善される。それにより、ラクターゼの製造と乳への添加との間にタイムラグがあるような場合であっても、乳への添加時に、高いラクターゼ活性を維持することができる。微生物を用いてラクターゼを生産する場合、上記のようにラクターゼを含む溶液にはラクターゼ以外の物質も含むことが通常である。当該溶液からラクターゼ以外の物質（例えば、互いに性質の異なるタンパク質やペプチド、種々の低分子量物質）を除去するには様々な精製工程が必要となる。本発明によれば、上記溶液に含まれる還元糖量を指標とすることで、上記精製工程の省略あるいは短時間化を図ることができるようになるため、ラクターゼの精製工程の効率化に寄与することができる。本発明は、保存安定性に優れ、且つ経済性に優れたラクターゼ溶液を提供することができるものである。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、糖類の還元糖量と糖類を添加したラクターゼ溶液における５０℃で７日間経過後の残存活性との関係を表す図である。

発明を実施するための形態

[0012]　本発明に係るラクターゼ溶液は、ラクターゼとともに、糖類を、還元性を示す糖末端のラクターゼ活性への影響を最小限にする程度に含み、安定剤等

の添加剤を任意で含有する。以下、（１）ラクターゼ溶液の構成成分、（２）ラクターゼ溶液の組成、（３）ラクターゼ溶液の性質（特に還元糖量）、（４）ラクターゼ溶液の製造方法、（５）ラクターゼ溶液の使用方法・用途、の順で説明する。

[0013] ≪ラクターゼ溶液の構成成分≫

＜ラクターゼ＞

（原料生物の種類）

ラクターゼは、微生物を含む、非常に広範囲の生物から単離されている。ラクターゼを産生する酵母やカビ、細菌等の微生物の種類は特に制限されない。ラクターゼを産生する微生物としては、クルイベロマイセス属（Kluyveromyces）、アスペルギルス属（Aspergillus）、バチルス属（Bacillus）、ペニシリウム属（Penicillium）に属する微生物が挙げられる。このうちクルイベロマイセス属に属する微生物がより好ましい。クルイベロマイセス属に属する微生物のうち、クルイベロマイセス・フラジリス（K. fragillis）、クルイベロマイセス・ラクティス（K. lactis）、クルイベロマイセス・マーキシアヌス（K.marxianus）が好ましく、クルイベロマイセス・ラクティスがより好ましい。アスペルギルス（Aspergillus）属の微生物は、アスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）又はアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）が例示され、ペニシリウム（Penicillium）属の微生物はペニシリウム・マルチカラー（Penicillium multicolor）が例示される。

[0014] （ラクターゼの至適ｐＨ）

本発明において使用するラクターゼは、中性ラクターゼ又は酸性ラクターゼである。中性ラクターゼと酸性ラクターゼは混合して使用してもよい。中性ラクターゼは、活性の至適ｐＨが中性領域であり、且つ、酸性領域で失活する性質を有するものであって、活性状態において乳糖を分解できるものが好ましい。中性ラクターゼ活性の至適ｐＨは６．０～７．５であり、失活ｐＨ４．０～６．０であるのがより好ましい。酸性ラクターゼは、活性の至適ｐＨが酸性領域であって、活性状態において乳糖を分解できるものであるこ

とが好ましい。酸性ラクターゼ活性の至適ｐＨは３．０～５．９である。

[0015] ＜糖類＞

糖類には、単糖類、オリゴ糖類及び多糖類の全てが含まれる。糖類を構成する糖の種類は１つであってもよいし、２つ以上であっても良い。糖類は、直鎖構造、側鎖構造及び環構造を有することができる。１つの糖類が、これら複数の構造を有していてもよい。糖類を構成する糖の結合方式は限定されない。

[0016] （還元糖）

糖類が還元糖を多く含む場合、ラクターゼ溶液の保存安定性を大きく低下させる。ここで還元糖とは、ある１分子の糖を構成する一末端の官能基が還元性を有するものをいう。全ての単糖類は還元糖であり、一部のオリゴ糖類及び一部の多糖類も還元糖に含まれる。例えば、糖類が直鎖多糖類である場合、その糖の末端は、０、１又は２つの還元性を示す官能基を有する。糖の末端が、１又は２つの還元性を示す官能基である糖類は還元糖である。糖類が側鎖構造を有する場合、その構造上、還元性を示す官能基は直鎖多糖類より増えやすい。上記の還元糖の定義から、ラクターゼ溶液が含む糖類として重合度が大きい多糖類を使用することが好ましい。

[0017] 糖類に含まれる還元糖量は、後述するＤＮＳ法によって測定した値を意味する。ラクターゼ溶液に含まれる還元糖量は２．０ｍｇ／ｇ以下であることが必要である。好ましくは０．５ｍｇ／ｇ以下、より好ましくは０．１ｍｇ／ｇ％以下である。ラクターゼ溶液に含まれる還元糖量が増えるにつれて、ラクターゼ溶液の保存安定性が低下する傾向を示す。

[0018] ＜多糖類＞

本発明において「多糖類」とは、単糖が７個以上結合した糖質をいう。例えば、澱粉、セルロース、デキストリン、シクロデキストリン、プルラン、デキストラン、アラビノキシラン、キチン、キトサン、ペクチン、イヌリン、ガラクタン、マンナン（ガラクトマンナン、グルコマンナン等）、難消化性デキストリン、ポリデキストロース、等が挙げられるが、飲食品として利

用可能な糖質であれば特段制限は無い。これらは、単一又は二種以上を混合しているものであってもよい。

[0019] 多糖類には不溶性、難溶性、可溶性のものがある。不溶性、難溶性の多糖類は、ラクターゼ溶液について膜等の担体を用いて濾過あるいは除菌等をする場合、目詰まりの問題を生じやすい。多糖類としては可溶性のものを使用することが好ましい。可溶性の多糖類とは、２５℃における水１００ｇに対する溶解度が１．５ｇ以上のものをいう。具体的には、水に１．５質量％の多糖類を添加し穏やかに２４時間撹拌後、その溶液の吸光度（ＯＤ６００ｎｍ）が添加前と比べて０．０１以上上昇しない多糖類のことである。

[0020] （ポリデキストロース）

本発明に好適に用いられるポリデキストロースは、グルコースを主原料としてソルビトールとクエン酸の存在下で、縮重合することにより製造され、粉末で水溶性の難消化性多糖類であり、食品素材として広く使用されているものである。例えば、市販のポリデキストロースやポリデキストロースの改良品である「ライテス」（商品名、デュポン社製）等が挙げられる。

[0021] （プルラン）

本発明に好適に用いることのできるプルランは、澱粉を原料とし、黒酵母の一種であるAureobasidium pullulansを培養して得られた、マルトトリオースが規則正しくα－１，６結合した天然多糖類で、無味無臭の白色粉末である。

[0022] これらのうち、最も好適な多糖類は、プルラン、ポリデキストロースであり、ポリデキストロースの中でも「ライテス」、特に「ライテスウルトラ」が、その還元糖量の少なさから好ましい。

[0023] ＜添加物＞

（安定化剤）

ラクターゼ溶液には、安定化剤を含有させることができる。安定化剤を含有させることによって、ラクターゼ溶液のラクターゼ活性を長期にわたって維持することができる。

[0024] 安定化剤として具体的には、ソルビトール、グリセロール、グリセロールトリメチロールプロパン、ネオペンチルグリコール、トリエタノールアミン、グリコール、ジグリコール、トリエチレングリコール、グリコールであって分子量が１０００未満であるものを挙げることができる。安定化剤は単独で又は複数を混合してラクターゼ溶液に含有させることができる。

[0025] （任意成分）

本発明のラクターゼ溶液は、必要に応じ、その他の各種成分を含有していてもよい。具体例としては、ラクターゼの安定化に寄与する金属塩類、アスコルビン酸、又は緩衝作用を有する無機塩類等を挙げることができる。

[0026] ≪ラクターゼ溶液の組成≫

＜糖類＞

糖類の含有量は、ラクターゼ溶液の全質量を基準として、０．１ｇ／ｋｇ～１００ｇ／ｋｇ含有する。好ましくは０．５ｇ／ｋｇ～５０ｇ／ｋｇ、より好ましくは１．０ｇ／ｋｇ～１０ｇ／ｋｇである。糖類の含有量を下限値未満にする場合は精製工程の負荷が大きくなり、経済性に優れたラクターゼ溶液を提供できない。糖類の含有量が上限値超になると、ラクターゼ溶液の保存安定性が低下しやすくなる。糖類の種類にもよるが、ラクターゼ溶液の粘性が高くなることで取扱性に問題が生じやすくなるため、経済性に優れたラクターゼ溶液を提供できない場合が生じる。

[0027] ＜任意成分＞

ラクターゼ溶液に含有させるその他の任意成分の量は、適宜設定すればよい。

[0028] ＜添加物＞

（安定化剤）

ラクターゼ溶液に含有させる安定化剤の量は、１０質量％～９０質量％であることが好ましく、２０質量％～８０質量％であることがより好ましく、３０質量％～７０質量％であることが更に好ましく、４０質量％～６０質量％であることが特に好ましい。安定化剤の量が下限値以上であると、ラクタ

ーゼ溶液のラクターゼ活性を長期にわたって維持することが容易になる。安定化剤の量が上限値超であると、ラクターゼ溶液の粘度が増すことから、濾過の時間が長くなり、作業性が低下する。

[0029] ≪ラクターゼ溶液の性質≫

＜ラクターゼ活性＞

本発明のラクターゼ溶液は、１０～１００，０００NLU/gのラクターゼ活性を有することが望ましい。「ＮＬＵ」はNeutral Lactase Unitである。活性の測定方法は、例えば、以下のとおりである。基質ｏ－ニトロフェニル－β－ガラクトピラノシド（ＯＮＰＧ）を、ｏ－ニトロフェニル及びガラクトースにする加水分解によって測定される。反応は、炭酸ナトリウムの添加によって終了する。形成されたｏ－ニトロフェニルは、アルカリ媒体中で黄色になり、吸光度の変化が酵素活性（ＮＬＵ／ｇで表される）を測定するのに使用される。この手順は、米国食品化学物質規格集（FCC； Food Chemical Codex）第４版、１９９６年７月１日、第８０１～８０２頁／ラクターゼ（中性）（β-ガラクトシダーゼ）活性で、公表されている。

[0030] ラクターゼ溶液のラクターゼ活性は、１０～２５０，０００Ｕ/ｍＬが好ましく、１００～１２０，０００Ｕ/ｍＬがより好ましく、２，５００～６０，０００Ｕ/ｍＬがさらに好ましい。ラクターゼ活性は溶媒の添加や、ラクターゼの濃縮等により調整することができる。

[0031] ラクターゼ溶液には様々な糖類が含まれ、そのうちの１つが還元糖である。還元糖としては、例えば、培地由来の還元糖、ラクターゼ産生微生物が代謝する糖類に由来する還元糖、ラクターゼ産生微生物が代謝するタンパク質に修飾された還元糖等が含まれる。還元糖量が多くなるほど、ラクターゼ活性を長期にわたって維持することが難しくなることから、還元糖はラクターゼタンパクを分解し、安定化に悪影響を及ぼすものと推測される。

[0032] ＜還元糖量測定方法＞

糖類に含まれる還元糖量は、以下の方法により測定することができる。測定対象の糖類１．５ｇを、水（ミリＱ水）１００ｍｌが入ったフラスコに添

加後、マグネチックスターラー（タイテック株式会社）で、２００ｒｐｍにて撹拌し、完全に溶解させる。各溶液の還元糖量をＤＮＳ法（ジニトロサリチル酸法）で定量する。

[0033] ＤＮＳ法は、以下の手順で行う。（１）ＤＮＳ溶液（０．７％－３，５－ジニトロサリチル酸、１．２１％－水酸化ナトリウム、０．０２％－ロッシェル塩、０．５７％－フェノール、０．５５％－炭酸水素ナトリウム）０．６ｍＬを試験管に分注し、（２）グルコース標準液（０．１％、０．２％）及び上記で調製した糖類の溶液０．２ｍｌを（１）の試験管に加える。（３）沸騰水浴中で５分間加熱発色させ、（４）水冷（１５℃）後、４．２ｍｌのミリＱ水を添加し、分光光度計で、波長５５０ｎｍの吸光度を測定する。グルコースを標準液から糖類溶液の還元糖量をグルコースとして定量する。

[0034] ＜ラクターゼ活性の安定性＞

ラクターゼ活性を長期間維持しているか否かは、後述するラクターゼ溶液を加熱環境下で一定期間放置すること（加速安定性試験）で判断することができる。 本発明においては、ラクターゼ溶液を５０℃の加熱環境下で１週間から２週間放置した後、当該ラクターゼ溶液のラクターゼ活性をＦＣＣ法で測定する。

[0035] ＜加速安定性試験＞

（サンプルの調製方法）

ラクターゼ活性を調整したラクターゼ溶液（糖類及び還元糖量はほぼ０）に、終濃度で１．５質量％となるように測定対象となる糖類を添加し、室温で撹拌し、完全に溶解させる。続いて、複数のろ過工程を経てサンプルを得る。なお、本試験に使用する糖類は、いずれも可溶性の多糖類を使用した。

[0036] （加速安定性測定）

上記で調製したサンプルを１５ｍｌ容のチューブに１０ｍｌずつ分注し、５０℃で保存する。０日間（保存前）、７日間、１４日間保存時のラクターゼ活性を測定し、保存前の活性を１００としたときの残存するラクターゼ活性を測定する。本発明のラクターゼは、７日間の残存活性が６０％以上であ

り、好ましくは、８６％以上である。

[0037] ≪ラクターゼ溶液の製造方法≫

本発明のラクターゼの具体的製造方法は、例えば、（１）酵母の培養を行った後の、細胞壁の破壊を伴うラクターゼの抽出工程と、（２）当該抽出したラクターゼから、培養物由来の夾雑物等を除去するための精製工程と、を含む。本発明のラクターゼ溶液の製造方法は、（３）上記のラクターゼ（直前に調製したものでも市販品でもよい）に、必要に応じて糖類（＋必要に応じて他の添加剤）を添加し、糖類及び還元糖量を所定の範囲に調整する工程と、（４）滅菌のためにろ過する工程と、を含む。

[0038] ＜微生物の培養と抽出＞

ラクターゼを産生する微生物の培養は、例えば乳糖や窒素源を含有する培地中で、ｐＨ３～１０の条件下、２０～４０℃で２４～１８０時間行うのが好ましい。得られた培養物からラクターゼ溶液を採取するには、例えば回収した細胞から抽出してもよいし、細胞外に排出されるような変異細胞等を用いてもよく、液体培地中で培養した場合においては培養液そのものを使用してもよい。

[0039] ＜精製工程＞

微生物培養物からのラクターゼの精製方法としては、例えば、硫安分画やアフィニティクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等の方法が挙げられる。微生物培養物には種々の物質が含まれているところ、ラクターゼの活性を高めるには、これらの方法を組み合わせるのが通常である。尚、ラクターゼ溶液は凍結乾燥、噴霧乾燥により粉末化することもできる。

[0040] ≪ラクターゼ溶液の使用方法・用途≫

本発明のラクターゼ溶液は、各種乳製品に広く使用できる。乳製品としては、牛乳等の乳飲料、発酵乳、アイスクリーム、ミルクジャム等が挙げられる。

[0041] 「乳飲料」は、ヨーグルトなどの発酵乳の原料となるものである。乳飲料

には、殺菌前のものも、殺菌後のものも含まれる。ラクターゼ含有組成物は法令に従い、殺菌前又は殺菌後に添加することができる。乳飲料の具体的な原料として、水、生乳、殺菌処理した乳、脱脂乳、全脂粉乳、脱脂粉乳、バターミルク、バター、クリーム、ホエータンパク質濃縮物（ＷＰＣ）、ホエータンパク質単離物（ＷＰＩ）、α（アルファ）－Ｌａ、β（ベータ）－Ｌｇなどがあげられる。あらかじめ温めたゼラチンなどを適宜添加しても良い。原料乳は、公知であり、公知の方法に従って調製すれば良い。本発明における乳飲料の原料としては、牛乳を含むことが好ましい。乳飲料の原料は、牛乳１００％からなるものを使用してもよい。

[0042] 「発酵乳」とは，ヨーグルト，乳等省令で定義される「発酵乳」、「乳製品乳酸菌飲料」、及び「乳酸菌飲料」の何れであっても良い。一般に、プレーンヨーグルトは、容器に原料を充填させ、その後に発酵させること（後発酵）により製造される。一方、ソフトヨーグルトやドリンクヨーグルトは、発酵させた発酵乳を微粒化処理や均質化処理した後に、容器に充填させること（前発酵）により製造される。本発明のラクターゼ溶液は、後発酵及び前発酵のいずれにも使用することができる。発酵乳の原料としては、牛乳を含むことが好ましい。発酵乳の原料は、牛乳１００％からなるものを使用してもよい。

[0043] さらに、本発明のラクターゼ溶液の具体的な利用形態として、ロングライフミルクの製造において用いられる。ロングライフミルクは、長期保存牛乳のことで、製造工程は滅菌工程と連続式無菌包装工程からなっており、一般的には、１３５～１５０℃数秒間の超高温短時間滅菌法で処理され、あらかじめ過酸化水素で滅菌した紙容器を無菌包装できる工程で充填される。

[0044] ＜ラクターゼの用途とそのｐＨプロファイル＞

また、ラクターゼの用途を考える場合には、中性ラクターゼであるか、又は酸性ラクターゼであるかにより大きく２つに大別される。これは、用途におけるｐＨプロファイルに依るものである。中性ｐＨの用途では、通常、中性ラクターゼが好ましく、酸性ラクターゼは、酸性範囲の用途により適して

いるといえる。

実施例

[0045] 本発明を実施例及び比較例により、更に詳細に説明するが、本発明は、これらの例によって何ら限定されるものではない。

[0046] ＜参考例１：還元糖を含まないラクターゼ溶液の調製＞

還元糖の影響を調べるために、下記のようにして還元糖を含まないラクターゼ溶液を調製した。コーン・スティープ・リカー７％、ラクトース２％を含有する液体培地を加圧殺菌後（殺菌後のｐＨ５．５）、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓＮｏ．０１３－２（ＡＴＣＣ ８５８５株）を植菌し、３０℃にて２４時間、１２０００Ｌ／ｍｉｎの通気で培養した。培養終了後冷却しながら４時間放置後、タンク上部から上澄液を除き、タンク底部に凝集沈降した菌体１５００ｋｇを得た。次いでここに得られた菌体のうち１５００ｇを水道水で洗浄後、トルエン８０ｍｌを加え混和後、１５００ｍｌの０．０５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を加え撹拌均一化し、密栓を施して３０℃、１５時間放置し自己消化せしめた。

[0047] この消化液を遠心分離して得た上清２５００ｍｌに等容の冷アセトンを加え一夜放置した。生じた沈殿を遠心分離にて集め６００ｍｌの水道水に溶かし、酵素溶液を得た。この濃縮前酵素溶液６００ｍｌを４℃に冷却しながら、硫酸アンモニウム粉末を６０分間かけて少しずつ添加し、５０％飽和水溶液を得た。当該水溶液を８０時間４℃で放置（静置）しラクターゼを沈殿させた後、濾過によって固液分離し、固体状のラクターゼを回収した。当該ラクターゼを６００ｍｌの水道水に再溶解させた後、限外濃縮を行った。脱塩されたラクターゼに脱塩水を添加し、ｐＨを７．５に中和した後、硫安を最終濃度１Ｍに添加したものを脱塩後サンプルとした。

[0048] ２０ｍｌの脱塩後サンプルを、直径１６ｍｍ、長さ１０ｃｍ、直線流速１５０ｃｍ／ｈで、２０ｍｌのＨｉＰｒｅｐフェニル１６／１０カラムに適用した。カラムは、ｐＨ７．５の１００ｍＭトリス中の１Ｍ硫安で平衡化した。カラムを充填した後、平衡バッファーで流速１５０ｃｍ／ｈで、ベースラ

インが届くまで洗浄した。ラクダーゼの溶出は、１５０ｃｍ／ｈで段階的勾配下（１００ｍＭトリス、ｐＨ７．５）で行った。ラクターゼの溶出後、ラクターゼ液を脱塩し濃縮した。濃縮後、終濃度が５０％となるようにグリセリンを添加し、マグネチックスターラー（タイテック株式会社）で２００ｒｐｍ、室温で１８時間撹拌し、参考例１のラクターゼ溶液（５３，０００ＮＬＵ／ｇ）を得た。参考例１のラクターゼ溶液に含まれる糖類及び還元糖量は、いずれも０％であった。

[0049] ＜還元糖量測定＞

上述した還元糖量測定方法に従って、本発明に好適なライテス３種類、下記表２および表３に記載したそれぞれの糖類について、還元糖量を測定した。結果を表１～表２に示す。

[0050] [表1]

【表1】

品名	還元糖量(mg/g)
ライテスⅡ	1.3
ライテスパウダー	1.2
ライテスウルトラ	0.0

[0051] ＜加速安定性試験＞

（サンプルの調製）

（１）参考例１のラクターゼ溶液に下記表２及び３の糖類を別々に添加し、サンプルとした。

[0052] （還元糖量と残存活性）

同様に下記表２記載の糖類について、上述する方法により測定した還元糖量と加速安定性測定の条件を５０℃で７日間経過後とした時の残存活性の関係について、結果を表２及び図１に示す。

[0053]

[表2]

【表2】

商品名	分類	還元糖量 (mg/g)	残存活性 (%)
アミコール No.1	澱粉	5.7	40
パインデックス #1	澱粉分解物	3.7	48
パインデックス #2	澱粉分解物	4.3	47
パインデックス #4	澱粉分解物	6.6	45
パインデックス #100	澱粉分解物	0.2	54
H-PDX (H-パインデックス)	澱粉分解物	0.0	61
マックス 2000N	澱粉分解物	3.4	51
パインファイバー	難消化デキストリン	4.1	46
セルデックス SH-20	シクロデキストリン	5.9	28
セルデックス SL-20	シクロデキストリン	4.3	41
デキシーパール SD-20	シクロデキストリン	0.0	63
イソエリート 40P	シクロデキストリン	5.6	31
フジオリゴ#450	オリゴ糖	5.9	43
フジオリゴ#G67	オリゴ糖	5.6	39
クラスターデキストリン	ー	0.2	50
プルラン	ー	0.0	60
エスイー100	糖アルコール	0.0	62
ライテスウルトラ	ポリデキストロース	0.0	63

[0054] (加速安定性測定)

下記表３の糖類を添加した各ラクターゼ溶液の上記サンプルについて、上述した加速安定性測定方法により、５０℃において、０日間、７日間及び１４日間保存時、並びに４０℃において、０日間、３１日間及び６１日間保存時のラクターゼ活性を測定し、残存活性を測定した。結果を表３に示す。

[0055] [表3]

【表3】

50℃

	0day	7days	14days
ライテスウルトラ	100%	87%	46%
プルラン	100%	86%	44%
デキシーパール	100%	81%	23%

40℃

	0day	31days	61days
ライテスウルトラ	100%	88%	44%
プルラン	100%	90%	40%
デキシーパール	100%	79%	11%

[0056] (結果)

ラクターゼ中の還元糖量が2.0mg/g以下であれば、50℃において7日間で少なくとも60%以上の残存活性を有することがわかった。

ラクターゼ溶液に含まれる還元糖量を指標とすることで、ラクターゼ溶液

の精製工程の省略あるいは短時間化を図ることができるようになるため、ラクターゼの精製工程の効率化に寄与することができる。

請求の範囲

[請求項1] ラクターゼ溶液であって、

前記ラクターゼ溶液の全質量を基準として、糖類を０．１ｇ／ｋｇ～１００ｇ／ｋｇ含有し、

前記ラクターゼ溶液に含まれる還元糖量が２．０ｍｇ／ｇ以下である

ことを特徴とするラクターゼ溶液。

[請求項2] ５０℃で７日間放置後の残存活性が６０％以上である、請求項１に記載のラクターゼ溶液。

[請求項3] 前記糖類の重量平均分子量が５００～２，０００，０００である、請求項１又は２に記載のラクターゼ溶液。

[請求項4] ラクターゼの活性が、１０～１００，０００NLU/gである、請求項１～３のいずれか１項に記載のラクターゼ溶液。

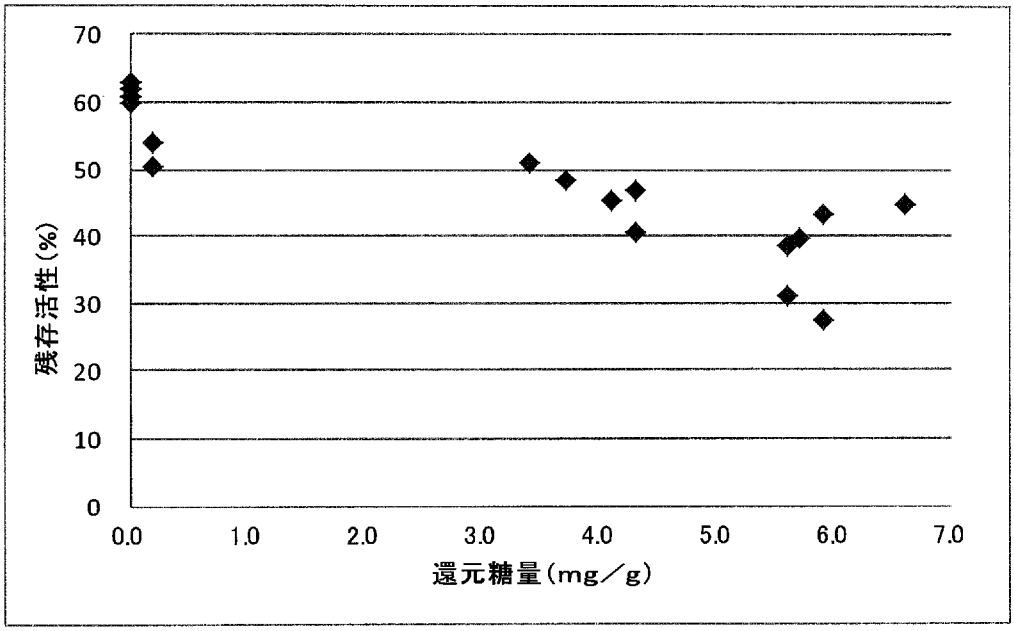
[請求項5] ラクターゼ溶液が安定剤を含有する、請求項１～４のいずれか１項に記載のラクターゼ溶液。

[請求項6] 請求項１～５のいずれか１項記載のラクターゼ溶液を添加することにより得られた乳。

[請求項7] 請求項１～５のいずれか１項記載のラクターゼ溶液又は請求項６記載の乳を少なくとも一原料として得られた乳製品。

[図1]

【図1】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/079259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N9/38(2006.01)i, *A23C9/152*(2006.01)i, *C12N9/96*(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)
C12N9/38, A23C9/152, C12N9/96

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/FROSTI/FSTA(STN), Mintel GNPD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2004-534527 A (DSM IP Assets B.V.), 18 November 2004 (18.11.2004), paragraphs [0002], [0004] & US 2011/0212221 A1 paragraphs [0004], [0013] & US 2004/0121041 A1 & WO 2002/081673 A1 & EP 1373491 A1 & EP 2280065 A1 & CN 1500143 A	6-7 1-5
Y	JP 01-117786 A (Nippon Shinyaku Co., Ltd.), 10 May 1989 (10.05.1989), claims; page 2, upper right column, lines 13 to 20; examples 1 to 2; table 1; fig. 1 to 3 (Family: none)	1-7

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 October 2015 (29.10.15)	10 November 2015 (10.11.15)
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/JP2015/079259

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 03-004791 A (Kanebo, Ltd.), 10 January 1991 (10.01.1991), claims; page 2, upper right column, lines 9 to 20; examples 1 to 6; tables 1 to 5 (Family: none)	1-7
Y	JP 59-104556 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 16 June 1984 (16.06.1984), page 1, right column, lines 11 to 16 (Family: none)	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０７９２５９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/38(2006.01)i, A23C9/152(2006.01)i, C12N9/96(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.　C12N9/38, A23C9/152, C12N9/96

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	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５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),
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/FROSTI/FSTA (STN),
Mintel GNPD

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	JP 2004-534527 A（デーエスエム　イーペー　アセッツ　ベスローテン　フェンノートシャップ）2004.11.18, 段落【０００２】、【０００４】 & US 2011/0212221 A1 段落【０００４】、【００１３】 & US 2004/0121041 A1 & WO 2002/081673 A1 & EP 1373491 A1 & EP 2280065 A1 & CN 1500143 A	6-7 1-5

☑　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	国際調査報告の発送日
２９．１０．２０１５	１０．１１．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　５５７５
植原　克典
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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 01-117786 A（日本新薬株式会社）1989.05.10，特許請求の範囲、第２頁右上欄第１３～２０行、実施例１～２、第１表、第１～３図（ファミリーなし）	1-7
Y	JP 03-004791 A（鐘紡株式会社）1991.01.10，特許請求の範囲、第２頁右上欄第９～２０行、実施例１～６、第１～５表（ファミリーなし）	1-7
Y	JP 59-104556 A（積水化学工業株式会社）1984.06.16，第１頁右欄第１１～１６行（ファミリーなし）	1-7