

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-524355

(P2017-524355A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 1 D 8/04 (2006.01)	A 2 1 D 8/04	4 B 0 3 2
A 2 1 D 2/26 (2006.01)	A 2 1 D 2/26	
A 2 1 D 13/00 (2017.01)	A 2 1 D 13/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2016-576024 (P2016-576024)	(71) 出願人	517000184 キャラヴァン イングリーディエンツ インク. アメリカ合衆国, カンザス州 66215 、レネッサ、キヴィラ ロード 7905
(86) (22) 出願日	平成27年7月8日 (2015.7.8)	(74) 代理人	100085545 弁理士 松井 光夫
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月23日 (2017.2.23)	(74) 代理人	100118599 弁理士 村上 博司
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065612	(72) 発明者	フェン, グオフア アメリカ合衆国, カンザス州 66221 、オーバーランド パーク, バレンタイン レーン 14402
(87) 国際公開番号	W02016/005452		
(87) 国際公開日	平成28年1月14日 (2016.1.14)		
(31) 優先権主張番号	14176074.4		
(32) 優先日	平成26年7月8日 (2014.7.8)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	62/021, 899		
(32) 優先日	平成26年7月8日 (2014.7.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖を生成しかつテクスチャーを改善するベーカリー方法およびそれから形成される製品

(57) 【要約】

新規な、酵母で膨らませたおよび他のベーカリー製品ならびにそれらの製品を作製する方法が提供される。上記製品は、熱的に安定なアミログルコシダーゼならびに生デンプン分解アミログルコシダーゼおよび/または老化防止性アミラーゼを含む生地から形成される。生地に含まれる添加糖のレベルが実質的に低減され、削除されることさえできる上に、甘味がある製品をなおも実現することが可能である。加えて、得られたベーカリー製品は、フルクトースを含まないまたは少なくとも実質的に含まない。最終的に焼成された製品はまた、より優れた硬さ、レジリエンスおよび粘着性を含む改善されたテクスチャー特性を有し、低減された量の酵母を用いて作製されることができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ベーカリー製品を形成する方法であって、
酵母、
初期量の糖、
デンプンの源、

上記デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ；ならびに

生デンプン分解アミログルコシダーゼ、
老化防止性アミラーゼ、および
それらの混合物

からなる群から選択される酵素

を含む生地を用意すること、そして

上記生地を、上記ベーカリー製品を得るのに十分な時間および温度で焼成すること、ここで上記ベーカリー製品の糖の最終量は、糖の上記初期量より多いを含む方法。

【請求項 2】

糖の上記初期量が、100重量%とみなされる上記生地の総重量に対して約1.0重量%未満であり、

糖の上記最終量が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して少なくとも約5.0重量%であり、かつ

上記ベーカリー製品が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して約0.5重量%未満のフルクトースを含む、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約65 ~ 約85 の温度で活性である、
請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約85 で約1分間~約30分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (Penicillium oxalicum)、タラロマイセス エメルソニイ (Talaromyces emersonii)、タラロマイセス デュボンティ (Talaromyces dupontii)、タラロマイセス サーモフィリウス (Talaromyces thermophilus)、クロストリジウム サーモアミロリティックム (Clostridium thermoamylolyticum) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフィックム (Clostridium thermohydrosulfuricum) からなる群から選択される菌株に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

上記酵素が、約70 で約1分間~約20分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する生デンプン分解アミログルコシダーゼである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

上記ベーカリー製品が、貯蔵期間7日目で測定されるとき、少なくとも約28%のレジリエンスパーセントを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

酵母で膨らませたベーカリー製品を形成するのに有用であり、かつデンプンの源、酵母および水を含む生地であって、上記デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ；ならびに生デンプン分解アミログルコシダーゼ、老化防止性アミラ

10

20

30

40

50

ーゼおよびそれらの混合物からなる群から選択される酵素を含むことを特徴とする生地。

【請求項 9】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約 65 ~ 約 85 の温度で活性である、請求項 8 に記載の生地。

【請求項 10】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約 85 で約 1 分間 ~ 約 30 分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する、請求項 8 または 9 に記載の生地。

【請求項 11】

上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*)、タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces dupontii*)、タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*)、クロストリジウム サーモアミロリティックム (*Clostridium thermoamylolyticum*) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフリウム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) からなる群から選択される菌株に由来する、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の生地。

10

【請求項 12】

上記酵素が、約 70 で約 1 分間 ~ 約 20 分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する生デンプン分解アミログルコシダーゼである、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の生地。

20

【請求項 13】

穀粉、酵母および水から形成される、酵母で膨らませたベーカリー製品であって、デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼ、100 重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して少なくとも約 5 重量%の糖、および100 重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して約 0.5 重量%未満のフルクトースを含むことを特徴とするベーカリー製品。

30

【請求項 14】

上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約 85 で約 1 分間 ~ 約 30 分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、請求項 13 に記載のベーカリー製品。

【請求項 15】

上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*)、タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces dupontii*)、タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*)、クロストリジウム サーモアミロリティックム (*Clostridium thermoamylolyticum*) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフリウム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) からなる群から選択される菌株に由来する熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、請求項 13 または 14 に記載のベーカリー製品。

40

【請求項 16】

貯蔵期間 7 日目に測定されるとき、少なくとも約 28% のレジリエンスパーセントを有する、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のベーカリー製品。

【請求項 17】

貯蔵期間 7 日目に、約 250 g 未満の力の硬さを有する、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のベーカリー製品。

【請求項 18】

50

貯蔵期間7日目に測定されるとき、約5g・mm～約25g・mmの粘着性を有する、請求項13～17のいずれか1項に記載のベーカリー製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、焼成中に糖を生成する特定の酵素配合物を組み込むことによる、ベーカリー製品の調製に広く関する。有利には、最終製品は、添加糖およびフルクトースを含まないまたは実質的に含まない上に、添加糖を用いて作製された相当製品と同等のまたはそれより良好な味および香りをなおも有する。加えて、本発明は、含まれる酵素の相乗的な相互作用によって、該ベーカリー製品のテクスチャー品質および貯蔵期間を著しく改善する。

10

【背景技術】

【0002】

ベーカリー製品は、一般に、それらの新鮮さおよび甘味によって、消費者の興味をそそっている。先行技術における製品について、これは、該製品を形成するために使用される材料に、糖、例えばスクロース、高フルクトースコーンシロップ、ハチミツなどを加えることによる。最近、添加糖が、食品中の最も健康を害する材料の1つとして指摘されている。添加糖は、潜在的な健康上のリスクと関連付けられているフルクトースを高レベル（一般に50%）で含有する。フルクトースは、肝臓で代謝され、有害な最終生成物、例えばトリグリセリド、尿酸およびフリーラジカルなどを生じる。これは、健康上の病気、とりわけ、例えば非アルコール性脂肪肝疾患、増加されたLDLコレステロール、心血管疾患、痛風および/または高トリグリセリドを引き起こし得る。

20

【0003】

したがって、これらの製品に、添加糖、特にフルクトースを含有する添加糖を加えることを避けることが好ましい。しかし、甘味は該製品が魅力的であるには望ましいため、単に糖を加えないならば、味が悪く、消費者の興味をそそらない製品になってしまう。糖の代わりに人工甘味製品を使用すると、それ自体の問題、例えば潜在的な健康上の問題、一部の人々の興味をそそらない味、および消費者に都合の悪い材料表示などを引き起こす。また、糖アルコールは、製品を甘くするのによく使用されるやり方となっているが、典型的な糖ほどの魅力的な味を有しておらず、また、多くの人々は、糖アルコールを適切に消化することができない。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

添加糖を含む必要がない、これらの製品の形成方法が必要とされている。さらに、最終製品が、フルクトースを含まないまたは実質的に含まない上に、魅力的で甘い味をなおも有するならば、それは非常に望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、ベーカリー製品を形成する方法であって、
酵母；
初期量の糖；
デンプンの源；
該デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ；ならびに生デンプン分解アミログルコシダーゼ、
老化防止性アミラーゼ、および
それらの混合物
からなる群から選択される酵素
を含む生地を用意することを含む方法に広く関する。

40

【0006】

上記生地は、該ベーカリー製品を得るのに十分な時間および温度で焼成され、該ベーカ

50

リー製品の糖の最終量は、糖の上記初期量より多い。

【0007】

本発明はまた、酵母で膨らませたベーカリー製品を形成するのに有用であり、かつデンプンの源、酵母および水を含む生地を提供する。改善点は、該生地が、デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ、ならびに

生デンプン分解アミログルコシダーゼ、

老化防止性アミラーゼ、および

それらの混合物

からなる群から選択される酵素を含むことである。

【0008】

さらなる実施形態では、本発明は、穀粉、酵母および水から形成される、酵母で膨らませたベーカリー製品を提供する。改善点は、該製品が、

デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼ、

100重量%とみなされる該ベーカリー製品の総重量に対して少なくとも約5重量%の糖、および

100重量%とみなされる該ベーカリー製品の総重量に対して約0.5重量%未満のフルクトース

を含むことである。

【0009】

さらなる改善点は、該ベーカリー製品が、図7および図11に説明されているように、8%の添加糖が初期材料中に含まれ、かつ本発明の酵素配合物を含まないまたは現在の市場で標準的な老化防止性酵素製品、例えばCorbionからのUltra Fresh Premium 250を含む材料から形成される同様の製品と比較して、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは約90%~約100%のクラム硬さの減少を有することである。

【0010】

該ベーカリー製品はさらに、図2および図12に説明されているように、8%の添加糖が初期材料中に含まれ、かつ従来の酵素、例えばNovozymesからのAMG 1100または現在の市場で標準的な老化防止性酵素製品、例えばCorbionからのUltra Fresh Premium 250を含む材料から形成される同様の製品と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも約15%、より好ましくは約20%~約28%のクラムレジリエンス(crumbrésilience)の改善を有する。

【0011】

その上、該ベーカリー製品のさらなる改善点は、図3に説明されているように、従来の酵素、例えばNovozymesからのAMG 1100を含む材料から形成される同様の製品と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも約25%、より好ましくは約25%~約50%のクラム粘着性(crumbadhesiveness)の減少である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例1に基づいて、従来のRSDアミログルコシダーゼ(AMG 1100)の糖生成能を、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)と比較するグラフである。

【図2】実施例1に基づいて、従来のRSDアミログルコシダーゼ(AMG 1100)のパンレジリエンス改変能を、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)と比較するグラフである。

【図3】実施例1に基づいて、従来のRSDアミログルコシダーゼ(AMG 1100)のパン粘着性改変能を、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)と比較するグラフである。

10

20

30

40

50

【図4】実施例2に基づいて、従来のRSDアミログルコシダーゼ（AMG 1100）および熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG）の両方が、生地混捏段階および生地発酵段階中に少量の糖を生成するために使用され得ることを説明するグラフである。

【図5】実施例2に基づいて、完成されたパンにおける、RSDアミログルコシダーゼ（AMG 1100）または熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG）または上記2種の組合せによって生成されたグルコースの総量を説明するグラフである。

【図6】実施例2に基づいて、焼成中に、熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG）によってのみ、有意な量のグルコースが生成され、一方、従来のRSDアミログルコシダーゼ（AMG 1100）は、有意な量のグルコースを生成することができなかったことを説明するグラフである。

10

【図7】実施例3に基づいて、クラム硬さを低減するという点から見た、生地配合物中の添加糖（この場合にはスクロース）の低減が老化防止性酵素の性能に及ぼす影響を示すグラフである。

【図8】実施例3に基づいて、パン中に生成される酵素最終生成物（すなわち、マルトース）の量の点から見た、生地配合物中の添加糖（この場合にはスクロース）の低減が老化防止性酵素の性能に及ぼす影響を示すグラフである。

【図9】実施例4における種々のパン配合物中のグルコース、フルクトースおよびマルトースの含量を比較するグラフである。

【図10】実施例4における種々のパン配合物の相対的な甘さのグラフである。

20

【図11】実施例4における種々のパン配合物の硬さのグラフである。

【図12】実施例4における種々のパン配合物のレジリエンスのグラフである。

【図13】対照パンを実施例5において配合された試験パンと比較した官能性結果を示すグラフである。

【図14】実施例5において調製された試験パンと比較された、対照パンの甘さを示す官能性評価結果を与えるグラフである。

【図15】実施例5において調製された試験パンと比較された、対照パンの官能性嗜好結果を示すグラフである。

【図16】実施例5における本発明に従う試験パンと比較された、対照パンの糖含量を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0013】

より詳細には、本発明は、新規な生地配合物ならびにこれらの配合物を用いて、酵母で膨らませたベーカリー製品および他のベーカリー製品を作製する新規な方法に関する。これらの製品は、パン、プレッツェル、イングリッシュマフィン、パンズ、ロールパン、トルティーヤ（トウモロコシおよび穀粉の両方）、ピザ生地、ベーグルおよびクランペットからなる群から選択されるものを包含する。

【0014】

本発明の方法において、上記特定の製品のための材料と一緒に混捏される。典型的な材料およびそれらの好ましい範囲は、表1に記述されている。

40

【0015】

【表 1】

表 1

材料	広い範囲*	好ましい範囲*	最も好ましい範囲*
圧搾酵母	約1%～約10%	約2%～約6%	約3%～約4%
生地強化剤	約0%～約2%	約0.25%～約1%	約0.35%～ 約0.5%
添加糖**	約10%未満	約3%未満	約1%
粉乳	約0%～約3%	約1%～約2%	約1%～約1.5%
塩（典型的には NaCl）	約1%～約3%	約1.5%～約2.5%	約1.75%～ 約2.25%
防かび剤	約0%～約1%	約0.1%～約0.5%	約0.25%～ 約0.35%
油/脂	約0%～約20%	約1%～約6%	約2%～約3%
穀粉改良剤	約0ppm～ 約500ppm	約10ppm～ 約200ppm	約40ppm～ 約75ppm
乳化剤	約0%～約4%	約0.5%～約3%	約1%～約2.5%
水	約50%～約75%	約55%～約70%	約58%～約65%
熱的に安定な アミログルコシ ダーゼ	穀粉1kg当たり 少なくとも約300 AGU	穀粉1kg当たり 約500～約1,500 AGU	穀粉1kg当たり 約750～約1,250 AGU
生デンプン分解 アミログルコシ ダーゼ	穀粉1kg当たり 約0～約5,000 AGU	穀粉1kg当たり 約100～約2,500 AGU	穀粉1kg当たり 約500～約1,000 AGU
細菌アミラーゼ	穀粉1kg当たり 約0～ 約20,000MANU	穀粉1kg当たり 約1,000～ 約10,000MANU	穀粉1kg当たり 約3,000～ 約5,000MANU
他の酵素	約0ppm～ 約2,000ppm	約20ppm～ 約300ppm	約100ppm～ 約200ppm

* 穀粉の重量に対する百分率またはppm。

** 配合物中に存在するすべてのタイプの添加糖を指す。配合物に加えられることができる糖は、スクロース、グルコース、フルクトース、高フルクトースコーンシロップ、ハチミツ、ブラウンシュガー、ラクトース、ガラクトース、メープルシロップおよび米飴を含む。「添加糖」は、生地混合物中の他の材料中に（例えば、穀粉の一部として）もともと存在し得る糖を含まず、糖アルコール（例えば、キシリトール、ソルビトール）および人工甘味材料も含まない。

【0016】

特に好ましい実施形態では、該添加糖は約0重量%であり、別の実施形態では、該添加糖は0重量%である。

【0017】

MANUおよびAGUは、それぞれ、アミラーゼおよびアミログルコシダーゼの酵素活性の尺度である。本明細書において使用されるとき、1単位のMANU（Maltoge

10

20

30

40

50

nic Amylase Novo Unit) は、0.1 M クエン酸緩衝液 1 ml 当たり 10 mg のマルトトリオース (Sigma M8378) 基質の濃度で、pH 5.0、37 にて 30 分間に、毎分 1 μmol のマルトースを放出するのに必要とされる酵素の量と定義される。1 単位の AGU (Amyloglucosidase Unit) は、0.1 M 酢酸緩衝液中に 100 ミリモルのマルトースの基質濃度で、pH 4.3、37 にて、毎分 1 μmol のマルトースを加水分解するのに必要とされる酵素の量と定義される。いずれの場合にも、 μmol で表されるマルトースの量は、最終溶液を標準マルトース溶液と比較することによって決定されることができる。

【0018】

表 1 の材料に加えて、上記生地は、デンプンの源、例えば、小麦粉、ライ麦粉、オート麦粉、大麦粉、ライ小麦粉、米粉、タピオカデンプン、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、トウモロコシ粉およびジャガイモ粉からなる群から選択されるものを含む。上記デンプンの源は、典型的には、100 重量%とみなされる該穀粉の総重量に対して、約 50% ~ 約 95 重量%、好ましくは約 65% ~ 約 85 重量%のレベルのデンプンをもたらしように含まれる。穀粉が該デンプンの源の場合には、これは、典型的には、100 重量%とみなされる該生地の総重量に対して、約 40% ~ 約 70 重量%、好ましくは約 50% ~ 約 60 重量%の穀粉レベルを結果する。

10

【0019】

使用される酵母は、酵母で膨らませたベーカリー製品中に慣用的に使用されている任意の酵母であることができ、クリーム状酵母および圧搾酵母が好ましい。適した生地強化剤は、ステアロイル乳酸ナトリウム、エトキシ化モノグリセリド、モノ-およびジグリセリドのジアセチル酒石酸エステル (DATEM) ならびにそれらの混合物からなる群から選択されるものを含む。

20

【0020】

好ましい防かび剤は、プロピオン酸カルシウムおよび/またはナトリウム、ソルビン酸カリウム、酢、レーズン果汁濃縮物ならびにそれらの混合物からなる群から選択されるものを含む。好ましい油脂は、大豆油、部分的に水素添加された大豆油、ラード、ヤシ油、トウモロコシ油、綿実油、菜種油およびそれらの混合物からなる群から選択される。

【0021】

適した穀粉改良剤は、アスコルビン酸、臭素酸カリウム、ヨウ素酸カリウム、アゾジカーボンアミド、過酸化カルシウムおよびそれらの混合物からなる群から選択されるものを含む。従来の任意の乳化剤が利用されることができるが、好ましい乳化剤は、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (典型的にはポリソルベート 60 と称される) ならびにモノグリセリド、例えば粉末および水和モノグリセリド、クエン酸モノグリセリドおよびコハク酸モノグリセリドを含む。

30

【0022】

熱的に安定なアミログルコシダーゼ

上記生地はまた、熱的に安定なアミログルコシダーゼを含む。本発明に利用される熱的に安定なアミログルコシダーゼは、焼成プロセス中にデンプンが糊化するとき活性であり、かつデンプンに作用するのに利用できるように選択されるべきである。すなわち、焼成前に生地に存在するデンプンの大部分は、酵素によってすぐには作用されないデンプン粒の形態で存在する。生デンプンは、約 65 で糊化し始め、典型的にはおよそ 85 までに完全に糊化される。糊化デンプンは、アミログルコシダーゼによってより容易に加水分解されてグルコースになる。したがって、選択された熱的に安定なアミログルコシダーゼは、生地がパンに移行する際に、生地中のデンプンに作用することができるように十分に熱安定性であるべきである (すなわち、それは、約 65 ~ 約 85 で活性であるべきであり、または少なくとも部分的に活性であるべきである)。同時に、完全に焼成された製品における残りのアミログルコシダーゼ活性は、その貯蔵期間中に最終製品の品質に影響を及ぼし得るので、選択された熱的に安定なアミログルコシダーゼは、焼成終了 (すなわち、約 95 ~ 約 100) までに不活性化されることが好ましい。

40

50

【0023】

したがって、本発明に使用するための熱的に安定なアミログルコシダーゼは、約85で約1分間～約30分間、好ましくは約85で約3分間～約20分間、より好ましくは約85で約5分間～約15分間の半減期($T_{1/2}$)を有する。これらの値は、pH4.5で、0.12mM $CaCl_2$ 中で得られる。

【0024】

一実施形態では、好ましい熱的に安定なアミログルコシダーゼは、pH約4.5でアッセイされるとき、少なくとも約60、好ましくは約60～約85、より好ましくは約70～約85、さらに好ましくは約75～約80の最適温度を有する。本明細書において使用されるとき、酵素の「最適温度」は、指定されたアッセイ条件で酵素活性が最も高い温度を指す。

10

【0025】

一実施形態では、利用される熱的に安定なアミログルコシダーゼは、85にて約15分のインキュベーション後に、約25%～約90%、好ましくは約35%～約70%、より好ましくは約35%～約60%の残存酵素活性を有する。調理されたパンへの負の影響を避けるために、選択された熱的に安定なアミログルコシダーゼは、0.12mM $CaCl_2$ を含むpH5.0の緩衝液中、100にて約3分後に、約15%未満、好ましくは約10%未満、より好ましくは約5%未満の残存酵素活性を有する。本明細書において使用されるとき、「残存酵素活性」は、特定の酵素がこの段落に記述されている条件に供された後に残存している酵素活性(すなわち「最終活性」(上記で定義されているMANUまたはAGUで表される))である。「%残存酵素活性」は、特定の酵素がこの段落に記述されている条件に供された後に残存している酵素活性(すなわち「最終酵素活性」(上記で定義されているMANUまたはAGUで表される))を、これらの条件に供される前の同酵素の酵素活性(すなわち「初期酵素活性」(先と同様に、MANUまたはAGUで表される))と比較することによって算出される。すなわち、

20

【0026】

【数1】

$$\% \text{残存活性} = \left(\frac{\text{最終酵素活性}}{\text{初期酵素活性}} \right) \times 100$$

30

である。

【0027】

一実施形態では、利用される熱的に安定なアミログルコシダーゼは、1mM $CaCl_2$ でアッセイされるとき、約3.0～約7.0、好ましくは約4.0～約6.0、より好ましくは約4.5～約5.5の最適pH(すなわち、指定されたアッセイ条件で酵素活性が最も高いpH)を有する。

【0028】

一実施形態では、好ましい熱的に安定なアミログルコシダーゼは、約3.0～約7.0、好ましくは約4.0～約6.0、より好ましくは約4.5～約5.5のpH安定性範囲を有する。pH安定性は、特定の酵素を、指定されたpHで37にて20時間、最初にインキュベートすることによって測定される。次いで、保持された酵素活性がアッセイされ、そして最初の酵素活性と比較される。好ましい熱的に安定なアミログルコシダーゼは、上記で言及されたpH安定性範囲において、その最初の活性の少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは約95%～100%を保持する。

40

【0029】

本発明に使用するのに適した熱的に安定なアミログルコシダーゼの特定の例は、下記：
(a) ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、Novozymesによる国際公開第2011/127802号に記載されているPo-AMG)；

50

(b) タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、国際公開第2009/028448号に記載されているもの) ;

(c) タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces duponti*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第4,247,637号に記載されているもの) ;

(d) タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第4,587,215号明細書に記載されているもの) ;

(e) クロストリジウム サーモアミロリチウム (*Clostridium thermoamylolyticum*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、欧州特許第135,138号に記載されているもの) ; および

(f) クロストリジウム サーモヒドロスルフィックム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) (例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、国際公開第1986/001,831号に記載されているもの)

からなる群から選択される菌株から得られる (すなわち、上記菌株の1種に見出されるDNA配列によってコードされる) アミログルコシダーゼを含む。

【0030】

上記は、いくつかの好ましい熱的に安定なアミログルコシダーゼを記述しているが、上記の特性を満たす任意の熱的に安定なアミログルコシダーゼが、本発明で働き得る。これは、任意の天然源由来のアミログルコシダーゼおよび遺伝子改変を通じて作られる変形を含む。

【0031】

生デンブン分解アミログルコシダーゼ

好ましい実施形態では、生デンブン分解アミログルコシダーゼが、生地中に存在する。生デンブン分解アミログルコシダーゼは、生デンブン分子に作用する。一実施形態では、この生デンブン分解アミログルコシダーゼは、好ましくは、上述した最初のアミログルコシダーゼよりも低い最適温度を有する。また、この生デンブン分解アミログルコシダーゼは、適度に熱的に安定であることのみを必要とする。すなわち、それは、生地温度がデンブンの糊化温度より高いときに、その活性の多くを失いうる。好ましい実施形態では、糖が、生デンブン分解アミログルコシダーゼによって、生地中においてのみ生成され、焼成中には生成されない。すなわち、生デンブン分解酵素 (例えばAMG 300およびAMG 1100の名称で販売されているもの) は、デンブンが糊化する温度で、それらの活性の多くを失う。

【0032】

好ましい生デンブン分解アミログルコシダーゼは、約70℃まで熱安定性を有するが、好ましくは70℃を超えるとかなり急速に活性を失う。したがって、本発明に使用するための好ましい生デンブン分解アミログルコシダーゼは、約70℃で約1分間~約20分間、好ましくは約70℃で約3分間~約15分間、より好ましくは約70℃で約3分間~約10分間の半減期 ($T_{1/2}$) を有する。好ましくは、利用される生デンブン分解アミログルコシダーゼは、70℃にて約15分後に、少なくとも約5%、好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは約10%~約20%の残存活性を有する。別の実施形態では、該生デンブン分解アミログルコシダーゼは、pH約4.5で、約70℃未満、好ましくは約65℃未満、より好ましくは約40℃~約65℃、より好ましくは約40℃~約60℃、さらに好ましくは約45℃~約55℃の最適温度を有する。

【0033】

適した生デンブン分解アミログルコシダーゼは、国際公開第2012/088303号およびPurification and Properties of a Thermophilic Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, W. Fogarty et.al., Eur J Appl Microbiol Biotechnol (1983) 18:271-278に開示されており、これらは参照によって本明細書に組み込まれる

10

20

30

40

50

。アスペルギルス (*Aspergillus*) から産生されるものが好ましく、特に好ましいものは、アスペルギルスニガー (*Aspergillus niger*) からなる群から選択される菌株から得られるもの (例えば、Novozymes、Denmark によって、AMG (登録商標) 1100 の名称で販売されているもの) を含む。

【0034】

老化防止性アミラーゼ

別の実施形態では、細菌アミラーゼまたは老化防止性アミラーゼが含まれる。焼成中にデンプン粒が糊化されるとき、老化防止性アミラーゼによるデンプンの加水分解がさらに一層効果的に起こるため、上記アミラーゼは、約80 ~ 約90 で不活化されるものであることが好ましい。最も好ましい老化防止性アミラーゼは、マルトース生成 (malto 10
genic) アミラーゼであり、より好ましくはマルトース生成 - アミラーゼであり、さらにより好ましくはマルトース生成 - エキソアミラーゼである。そのようなアミラーゼの最も好ましいものは、Novozymes A/S によって NOVAMYL の名称で販売されており、参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第 RE38, 507 号に記載されている。このマルトース生成アミラーゼは、バチルス (*Bacillus*) 菌株 NCIB 11837 によって産生可能であり、またはバチルス菌株 NCIB 11837 から得られる DNA 配列によってコードされるものである (上記マルトース生成アミラーゼは、米国特許第 4, 598, 048 号および米国特許第 4, 604, 355 号に開示されており、これらの内容は参照によって本明細書に組み込まれる)。本方法で使用されうる別のマルトース生成アミラーゼは、バチルス菌株 NCIB 11608 によって産 20
生可能なマルトース生成 - アミラーゼである (欧州特許第 234858 号明細書に開示されており、この内容は参照によって本明細書に組み込まれる)。本発明に使用するための、適した別の老化防止性酵素は、DuPont Danisco から、POWERFresh (登録商標) G4 および POWERFresh (登録商標) G+ の名称で入手可能である。加えて、米国特許出願公開第 2009/0297659 号明細書 (参照によって本明細書に組み込まれる) が、適したアミラーゼを開示している。

【0035】

マルトース生成アミラーゼに加えて、本発明に含まれることができる他の酵素のいくつかは、真菌アミラーゼ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の細菌 - アミラーゼ、ヘミ - セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、グルコースオキシダーゼ 30
、ヘキソースオキシダーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、アスパラギナーゼおよびセルラーゼからなる群から選択されるものを含む。

【0036】

以上に言及されているように、いくつかの実施形態では、本発明は、熱的に安定なアミログルコシダーゼのみを利用する。好ましい実施形態では、本発明は、熱的に安定なアミログルコシダーゼに加えて、生デンプン分解アミログルコシダーゼまたは老化防止性アミラーゼを利用する。特に好ましい実施形態では、本発明は、熱的に安定なアミログルコシダーゼ、生デンプン分解アミログルコシダーゼおよび老化防止性アミラーゼを利用する。言うまでもなく、上記実施形態は、使用者の好みおよび調製される特定の製品に応じて選 40
択されることができる。

【0037】

焼成された製品を作製する方法

本発明による生地を形成する際に、上記の材料は、「ノータイム生地方法 (no-time dough process)」を使用して1段階で一緒に簡単に混捏されることができ、または上記材料は「中種生地方法 (sponge and dough process)」に供されることができる。「ノータイム生地方法」では、すべての材料が同時にミキシングボウルに加えられ、約5 ~ 約15分間混捏されて、混捏された生地を形成する。

【0038】

「中種生地」方法では、穀粉の一部 (例えば、全穀粉の55 ~ 75質量%) が、水、酵 50

母および好ましくは（利用される場合には）生地強化剤と混捏され、そして約3時間～約4時間の期間発酵される。こうして「中種」を形成する。この期間の後に、残りの材料が、上記中種と約2分～約10分間混捏されて、混捏された生地を形成する。該混捏された生地は、好ましくは、約5分～約15分間休まされた後、所望のサイズの片に切り分けて成形され、そして焼成皿に置かれる。次いで、該生地は、好ましくは、約40～約50の温度で、約65%～約95%の相対湿度で、約50分～約70分の期間、最終発酵される。

【0039】

最終発酵（proofing）中、存在する酵素が、デンプンに作用し始める。熱的に安定なアミログルコシダーゼと同様に、存在する任意の生デンプン分解アミログルコシダーゼが、生デンプンに作用し始め、いくらかのデンプンをグルコースに転化する。

10

【0040】

上記実施形態にかかわらず、糖（特にフルクトースでない糖）は、焼成プロセス中に（および好ましくは最終発酵中にも）、利用される酵素ブレンドによって生成される。すなわち、出発材料または生地は、何らかの「初期量」の糖を含有する。その初期量は、例えば、添加糖なしの配合物の場合のように、ゼロであることができる。または、その初期量は、以上に記載されているように、いくらか低い糖量（例えば、1～3%）もしくは10%という高い量であることができる。特に、糖の初期量は、約10重量%以下、好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約1重量%未満である。特に好ましい実施形態では、糖の初期量は、約0重量%、より特には0重量%である。該初期量にかかわらず、焼成後に最終製品は、上記初期量を超える最終量の糖の合計を有する。本発明の目的のために、糖は、スクロース、グルコース、フルクトース、高フルクトースコーンシロップ、ハチミツ、ブラウンシュガー、ラクトース、ガラクトース、メープルシロップおよび米飴を含むが、糖アルコールまたは人工甘味材料を含まないことが理解される。

20

【0041】

より詳細には、いくつかの実施形態では、本発明の初期生地（すなわち最終発酵の前）は、（任意の穀粉もしくはデンプンに生来見出される少量の糖、または使用される任意の穀粉もしくはデンプンのタイプ故にもともと存在している少量の糖を超える量の）糖をほとんどまたは全く含有せず、特に、フルクトースをほとんどまたは全く含有しない（すなわち、100重量%とみなされる上記初期生地の総重量に対して各々、約0.2重量%未満、好ましくは約0.1重量%未満、好ましくは約0重量%、好ましくは0重量%である）。一実施形態では、上記初期生地はまた、グルコースをほとんどまたは全く含有しない（初期生地中のフルクトースについて上記したのと同じの低い量である）。最終発酵中、生デンプン分解アミログルコシダーゼおよび熱的に安定なアミログルコシダーゼの両方は、ある特定の量のデンプンをグルコースに転化する。生地が最終発酵された後、典型的には、100重量%とみなされる最終発酵された生地の総重量に対して、少なくとも約1重量%、好ましくは約1～約2重量%、より好ましくは約2～約3重量%の糖の合計レベル（すなわち、グルコース、フルクトースおよびマルトースの合計）が存在する。該最終発酵された生地中のグルコースレベルは、典型的には、100重量%とみなされる該最終発酵された生地の総重量に対して、少なくとも約1重量%、好ましくは約1～約2重量%、より好ましくは約2～約3重量%である。すなわち、最終発酵後に生地中に存在するグルコースは、一般に、100重量%とみなされる該最終発酵された生地の総重量に対して、0%（もしくは0%に近い）から少なくとも約1%、好ましくは約1～約2%、より好ましくは約2～約3重量%に増加する。少なくともいくらかの量のグルコースが、初期材料混合物中に存在する（すなわち、初期材料中に存在するグルコースが0%を超えるが、それでもなお、上記した範囲内である）場合には、最終発酵された生地中に存在するグルコースの合計は、最終発酵前の生地中に存在するグルコース量の少なくとも約5倍、好ましくは少なくとも約10倍、より好ましくは約10～約15倍の量である。有利には、上述したフルクトースレベルは、実質的に変化しないままである。すなわち、最終発酵された生地は依然として、100重量%とみなされる該最終発酵された生地の総重量に対して、

30

40

50

約 0.2 重量%未満のフルクトース、好ましくは約 0.1 重量%未満のフルクトース、より好ましくは約 0 重量%のフルクトースを有する。

【0042】

最終発酵後、次いで、作製される製品のタイプに必要な時間および温度（例えば、約 190 ~ 約 220 で約 20 分 ~ 約 30 分）を使用して焼成され得る。最初の材料中に含まれた任意の生デンプン分解アミログルコシダーゼを含む、任意の熱的に安定でない酵素は、最終発酵中にそれらの活性形態でまだ存在するが、それらは焼成中に不活性化され始めて、酵素骨格を残す。しかし、初期材料中に含まれる（1種または複数の）熱的に安定なアミログルコシダーゼおよび老化防止性アミラーゼは、焼成が開始されるときに、その活性形態でなおも存在する。したがって、焼成中にデンプン粒が糊化するとき、熱的に安定なアミログルコシダーゼは、糊化デンプンを加水分解し続けて、グルコースをより高量でさらに生成することができ、一方、老化防止性アミラーゼは、糊化デンプンを加水分解し続けて、老化防止効果を完成製品に残し、また、マルトース、他のオリゴ糖およびデキストリンを生成する。しかし、焼成サイクルの終了までに、熱的に安定なアミログルコシダーゼおよび老化防止性アミラーゼの両方共が不活性化される。

10

【0043】

本発明は、これまで論じてきたものに加えて、いくつかの利点をもたらす。本発明は、先行技術の製品におけるよりも有意に少ない酵母を使用することを結果する。すなわち、先に言及された本発明の酵素配合物を使用することは、糖が初期材料に加えられかつ本発明の酵素配合物を含まない材料から形成された同様の製品と比較されるとき、少なくとも約 15%、好ましくは少なくとも約 20%、より好ましくは約 20% ~ 約 35% の酵母低減をもたらす。例えば、初期材料中に添加糖が 0% である生地が、本発明の酵素配合物と組み合わせて利用されると、8% の添加糖が初期材料中に含まれかつ本発明の酵素配合物を含まない材料から形成された同様の製品と比較されるとき、上記の酵母低減が達成される。

20

【0044】

本発明の追加の利点は、老化防止性マルトース生成アミラーゼの機能性の増加である（クラム硬さとして測定される）。すなわち、添加糖の多くは、老化防止性マルトース生成アミラーゼを阻害するところ、熱的に安定なアミログルコシダーゼの使用によって、より低い量の糖、例えばスクロースが発生地に加えられることが可能になり、そのことが老化防止性アミラーゼの性能を改善する。初期材料中に本発明の酵素配合物を含みかつ添加糖が 0% である生地が、8% の添加糖が初期材料中に含まれ、かつ本発明の酵素配合物を含まないまたは現在の市場で標準的な老化防止性酵素製品、例えば Corbion からの Ultra Fresh Premium 250 を含む材料から形成された同様の製品と比較されるとき、クラム硬さを少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 75%、より好ましくは約 90% ~ 約 100% 減少させることが観察されており、その両方が図 7 および図 11 に説明されている。

30

【0045】

加えて、初期生地を形成する際に、添加糖がほとんどまたは全く含まれなかった（それ故に、フルクトースがほとんどまたは全く含まれなかった）にもかかわらず、本発明の酵素配合物を利用して形成された最終の焼成された製品は、官能試験において 8% 添加糖（例えばスクロース）対照製品と比較して、同様の甘味があるまたはより甘味がある。すなわち、上記焼成された製品は、典型的には、100 重量%とみなされる最終の焼成されたベーカリー製品の総重量に対して、少なくとも約 5 重量%、好ましくは約 6 ~ 約 12 重量%、より好ましくは約 8 ~ 約 10 重量%の糖の合計レベル（主に、フルクトースを含有しないグルコースおよびマルトース）を有する。初期材料中に少なくともいくつかの糖が存在する（すなわち、初期材料中に糖の量が 0% を超える）場合には、最終の焼成された製品中に存在する糖の合計は、一般に、初期材料混合物中に存在する糖の合計の少なくとも約 5 倍、好ましくは少なくとも約 10 倍、より好ましくは約 16 ~ 約 20 倍の量である。

40

【0046】

50

最終の焼成された製品中のグルコースレベルは、典型的には、100重量%とみなされるベーカリー製品の総重量に対して、少なくとも約3重量%、好ましくは約3～約10重量%、より好ましくは約4～約6重量%である。すなわち、初期材料中に少なくともいくらかの量のグルコースが存在する場合には、最終の焼成された製品における生地中に存在するグルコースは、一般に、初期材料配合物中に存在するグルコース量の少なくとも約15倍、好ましくは少なくとも約20倍、より好ましくは約20～約30倍の量である。

【0047】

この場合も同様に、および有利には、上述したフルクトースレベルは、実質的に変化しないままである。すなわち、最終の焼成された製品は、100重量%とみなされるベーカリー製品の総重量に対して、約1重量%未満のフルクトース、好ましくは約0.5重量%未満のフルクトース、より好ましくは約0重量%未満のフルクトースを有する。このことは、フルクトース消費に関連する健康上のリスクが回避されるので、先行技術に対して有意な利点を提示することが理解されるだろう。

10

【0048】

以上に論じられているように、一実施形態では、本発明は、熱的に安定なアミログルコシダーゼを老化防止性(マルトース生成)アミラーゼと一緒に使用することを伴う。熱的に安定なアミログルコシダーゼおよび老化防止性アミラーゼは共に、同様の熱的安定性を有し、また、デンプン粒が糊化した後に活性なままであるため、それらは焼成中に相乗的に働く。有利には、熱的に安定なアミログルコシダーゼの存在は、焼成された製品の甘味を増加するのみならず、クラム粘着性を減少させ、クラムレジリエンスを増加する。本発明はさらに、高価な老化防止性アミラーゼのレベルが低減されることを可能にすると共に、テクスチャーを改善し、さらに、甘味があるパンを達成することができる。すなわち、本発明に従って形成されたベーカリー製品は、低減された硬さ、低減された粘着性および増加されたクラムレジリエンス故に、改善されたクラムテクスチャーを有するのみならず、これらの製品は、熱的に安定なアミログルコシダーゼおよび老化防止性アミラーゼによって生成された少量の糖、例えばグルコースおよびマルトース故に、改善された味および香りをも有する。

20

【0049】

上記実施形態にかかわらず、本発明によるベーカリー製品は、下記の試験方法の項に記載された硬さ(すなわち、クラム圧縮性)試験に供されるとき、7日目に約250g未満の力、好ましくは約200g未満の力、さらに好ましくは約160g未満の力の結果を与える。さらに、同じ項に記載された粘着性試験に供されるとき、本発明によるベーカリー製品は、貯蔵期間7日目に測定されると、約5g・mm～約25g・mm、好ましくは約5g・mm～約20g・mm、より好ましくは約10g・mm～約20g・mmの値を与える。達成されるレジリエンスパーセントは、貯蔵期間7日目に測定されるとき、少なくとも約28%、好ましくは約30%～約40%、より好ましくは約32%～約37%である。最後に、最終の焼成された製品がパンである場合には、比容は、454gの1塊のパンにおいて、少なくとも約5.5g/cc³、好ましくは少なくとも約6.0g/cc³、より好ましくは少なくとも約6.5g/cc³である。体積は、Stable Micro Systemsによって製造されたVolScanレーザー体積計によって決定される。

30

40

【0050】

本発明は、特に、以下の条項における主題に関するものであり、それにまたはそれによって限定されない。以下の条項に提示されている実施形態は、指示通りに組み合わせられ得、また、本明細書における他の事項とおよび特許請求の範囲と組み合わせられ得る。

【0051】

1. ベーカリー製品を形成する方法であって、
 - 酵母、
 - 初期量の糖、
 - デンプンの源、

50

上記デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ；ならびに

生デンプン分解アミログルコシダーゼ、
老化防止性アミラーゼ、および
それらの混合物

からなる群から選択される酵素

を含む生地を用意すること、そして

上記生地を、上記ベーカリー製品を得るのに十分な時間および温度で焼成すること、ここで、上記ベーカリー製品の糖の最終量は、糖の上記初期量より多い

を含む方法。

【0052】

2．糖の上記初期量が、100重量%とみなされる上記生地の総重量に対して約1.0重量%未満であり、

糖の上記最終量が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して少なくとも約5.0重量%であり、かつ

上記ベーカリー製品が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して、約0.5重量%未満のフルクトースを含む、

条項1に記載の方法。

【0053】

3．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約65～約85の温度で活性である、条項1または2に記載の方法。

【0054】

4．上記酵素がマルトース生成アミラーゼであり、上記ベーカリー製品が、貯蔵期間7日目に測定されるとき、約5g・mm～約25g・mmの粘着性を有する、条項1～3のいずれか1に記載の方法。

【0055】

5．上記デンプンの源が穀粉である、条項1～4のいずれか1に記載の方法。

【0056】

6．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、少なくとも約60の最適温度を有する、条項1～5のいずれか1に記載の方法。

【0057】

7．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約85で約1分間～約30分間の半減期($T_{1/2}$)を有する、条項1～6のいずれか1に記載の方法。

【0058】

8．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*)、タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces dupontii*)、タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*)、クロストリジウム サーモアミロリティウム (*Clostridium thermoamylolyticum*) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフリウム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) からなる群から選択される菌株に由来する、条項1～7のいずれか1に記載の方法。

【0059】

9．上記酵素が、約70で約1分間～約20分間の半減期($T_{1/2}$)を有する生デンプン分解アミログルコシダーゼである、条項1～8のいずれか1に記載の方法。

【0060】

10．上記生デンプン分解アミログルコシダーゼが、アスペルギルス (*Aspergillus*) から産生される、条項1～9のいずれか1に記載の方法。

【0061】

10

20

30

40

50

11．糖の上記初期量が、100重量%とみなされる上記生地の総重量に対して約3重量%未満である、条項1～10のいずれか1に記載の方法。

【0062】

12．上記初期量が0%超である、条項10に記載の方法。

【0063】

13．糖の上記最終量が、上記初期量の糖の少なくとも約10倍である、条項1～12のいずれか1に記載の方法。

【0064】

14．糖の上記最終量が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の重量に対して少なくとも約5重量%である、条項1～13のいずれか1に記載の方法。

【0065】

15．上記ベーカリー製品が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の重量に対して、約1重量%未満のフルクトースを含む、条項1～14のいずれか1に記載の方法。

【0066】

16．上記ベーカリー製品が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の重量に対して、約0重量%のフルクトースを含む、条項1～15のいずれか1に記載の方法。

【0067】

17．上記焼成前に、上記生地を最終発酵させることをさらに含む、条項1～16のいずれか1に記載の方法。

【0068】

18．上記生地が、上記最終発酵前に初期量のグルコースを有し、上記最終発酵後に最終量のグルコースを有し、上記最終量が上記初期量の少なくとも約5倍である、条項17に記載の方法。

【0069】

19．上記生地が、上記最終発酵前に、100重量%とみなされる上記最終発酵前の生地の総重量に対して、0重量%超のグルコースを有する、条項17または18に記載の方法。

【0070】

20．上記生地が、上記最終発酵後に最終量のグルコースを有し、上記最終量が、100重量%とみなされる上記最終発酵後の生地の総重量に対して、少なくとも約1.0重量%である、条項17～19のいずれか1に記載の方法。

【0071】

21．上記ベーカリー製品が、パン、イングリッシュマフィン、プレッツェル、パンズ、ロールパン、トルティーヤ、ピザ生地、ベーグルおよびクランペットからなる群から選択される、条項1～20のいずれか1に記載の方法。

【0072】

22．上記ベーカリー製品が、貯蔵期間7日目に、約250g未満の力の硬さを有する、条項1～21のいずれか1に記載の方法。

【0073】

23．上記ベーカリー製品が、貯蔵期間7日目に測定されるとき、少なくとも約28%のレジリエンスパーセントを有する、請求項1から22に記載の方法。

【0074】

24．酵母で膨らませたベーカリー製品を形成するのに有用であり、かつデンプンの源、酵母および水を含む生地であって、

上記デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼ、ならびに

生デンプン分解アミログルコシダーゼ、

老化防止性アミラーゼ、および

それらの混合物

からなる群から選択される酵素

10

20

30

40

50

を含むことを特徴とする生地。

【0075】

25．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約65～約85の温度で活性である、条項24に記載の生地。

【0076】

26．上記デンプンの源が穀粉である、条項24～25のいずれか1に記載の生地。

【0077】

27．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、少なくとも約60の最適温度を有する、条項24～26のいずれか1に記載の生地。

【0078】

28．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約85で約1分間～約30分間の半減期($T_{1/2}$)を有する、条項24～27のいずれか1に記載の生地。

【0079】

29．上記熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*)、タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces dupontii*)、タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*)、クロストリジウム サーモアミロリティウム (*Clostridium thermoamylolyticum*) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフリウム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) からなる群から選択される菌株に由来する、条項24から28のいずれかに記載の生地。

【0080】

30．上記酵素が、約70で約1分間～約20分間の半減期($T_{1/2}$)を有する生デンプン分解アミログルコシダーゼである、条項24～29のいずれか1に記載の生地。

【0081】

31．上記生デンプン分解アミログルコシダーゼが、アスペルギルス (*Aspergillus*) から産生されたものである、条項24～30のいずれか1に記載の生地。

【0082】

32．最終発酵されていない生地である、条項24～31のいずれか1に記載の生地。

【0083】

33．上記最終発酵されていない生地が、100重量%とみなされる上記最終発酵されていない生地の総重量に対して、約3重量%未満の糖を含む、条項32に記載の生地。

【0084】

34．上記最終発酵されていない生地が、100重量%とみなされる上記最終発酵されていない生地の総重量に対して、約0.5重量%未満の糖を含む、条項32または33に記載の生地。

【0085】

35．最終発酵された生地である、条項24～31のいずれか1に記載の生地。

【0086】

36．上記最終発酵された生地が、100重量%とみなされる上記最終発酵された生地の総重量に対して、少なくとも約1.0重量%の糖を含む、条項35に記載の生地。

【0087】

37．上記最終発酵された生地が、100重量%とみなされる上記最終発酵された生地の総重量に対して、約0.2重量%未満のフルクトースを含む、条項35または36に記載の生地。

【0088】

38．上記最終発酵された生地が、100重量%とみなされる上記最終発酵された生地の総重量に対して、約0重量%のフルクトースを含む、条項35～37のいずれか1に記載の生地。

10

20

30

40

50

【0089】

39. 穀粉、酵母および水から形成された、酵母で膨らませたベーカリー製品であって、デンプンが糊化する温度で活性を示す熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼ、

100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して少なくとも約5重量%の糖、および

100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して約0.5重量%未満のフルクトース

を含むことを特徴とするベーカリー製品。

【0090】

40. 上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約65 ~ 約85の温度で活性である熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、条項39に記載のベーカリー製品。

【0091】

41. 上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約60 ~ 約85の最適温度を有する熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、条項39または40に記載のベーカリー製品。

【0092】

42. 上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、約85で約1分間~約30分間の半減期($T_{1/2}$)を有する熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、条項39~41のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0093】

43. 上記不活性化された熱的に安定なアミログルコシダーゼが、ペニシリウム オキサリウム (*Penicillium oxalicum*)、タラロマイセス エメルソニイ (*Talaromyces emersonii*)、タラロマイセス デュポンティ (*Talaromyces dupontii*)、タラロマイセス サーモフィリウス (*Talaromyces thermophilus*)、クロストリジウム サーモアミロリテイクム (*Clostridium thermoamylolyticum*) およびクロストリジウム サーモヒドロスルフィックム (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) からなる群から選択される菌株に由来する熱的に安定なアミログルコシダーゼに由来する、条項39~42のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0094】

44. 上記糖が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して、約6~約12重量%のレベルで存在する、条項39~43のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0095】

45. 上記ベーカリー製品が、100重量%とみなされる上記ベーカリー製品の総重量に対して、約0重量%のフルクトースを含む、条項39~44のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0096】

46. 貯蔵期間7日目に測定されるとき、少なくとも約28%のレジリエンスパーセントを有する、条項39~45のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0097】

47. 貯蔵期間7日目に、約250g未満の力の硬さを有する、条項39~46のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【0098】

48. 貯蔵期間7日目に測定されるとき、約5g・mm~約25g・mmの粘着性を有する、条項39~47のいずれか1に記載のベーカリー製品。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0099】

以下の実施例は、本発明による好ましい方法を記述している。しかし、これらの実施例は、例証として提供されるものであり、その中のいかなる内容も、本発明の全範囲を限定するものとみなされるべきではないことが理解されるべきである。

【0100】

試験方法テクスチャー分析

パンのテクスチャーは、7日目および14日目に測定された。焼成後、パンは、内部温度が華氏100°になるまで冷まされ(50分)、次いで計量され、体積を測定され、そして温度が華氏72°±華氏2°に制御された部屋に貯蔵された。その時点で、複数ローフのパンが、一度に1ローフずつ、Oliver 16ブレードスライサーを用いて25mm±2mmの厚さに薄く切られ、1ポンドの1ローフ当たり10枚を得た。テクスチャープロファイル分析(TPA)手順を使用して、中央の4枚が試験された。測定機器はStable Micro Systemsからのテクスチャーアナライザー(TA-XT2 Texture Analyzer - 分解能1gを有するロードセル25kg)であった。この機器を実行するソフトウェアは、Texture Expert Exceed 2.64版であった。テクスチャーアナライザー上でパンのTPAを実行する設定は、下記表の通りである。

【0101】

【表2】

テクスチャーアナライザーの設定

試験モードおよびオプション	TPA
試験前速度 (mm/秒)	2.00
試験速度 (mm/秒)	1.00
試験後速度 (mm/秒)	1.00
ターゲットモード	ひずみ
ひずみ	25%
2回目ひずみ	40%
時間 (秒)	3
2回目圧縮時の保持時間 (秒)	3
トリガーの型	自動
トリガー力 (グラム)	5
力の単位	グラム
距離の単位	ミリメートル

【0102】

理解されるように、当業者は、試験される製品のタイプに基づいて、これらの設定を調整することができる。例えば、距離（mmで表される、試験の深さ）は、試験される製品のタイプに応じて調整されることができる。

【0103】

TA-4プローブ（直径1と1/2インチ（38mm）のアクリル製シリンダー）が使用され、グラフの選択は、X軸上に時間および自動範囲、Y軸上に力および自動範囲となるように設定された。

【0104】

パンの測定手順は、テクスチャーアナライザーの台上に一枚を置き、プローブが上記一枚のほぼ中央で表面から約10mm上に来るように、上記一枚の位置を定め、そして試験プログラムを開始することであった。上記試験によって、粘着性、硬さおよびレジリエンスを定量化するために使用されるグラフを作成した。特に、粘着性または粘着性の値は、第2の曲線の終端に続く負の領域であり、上記一枚からプローブを引き出すのに必要なエネルギーを表している。硬さは、上記一枚の厚さの25%穿孔深さに相当する第1の曲線上の力点である。レジリエンスは、プローブが上記一枚から持ち上げられるときに上記一枚から放出されるエネルギーと、プローブが上記一枚を圧縮するときに上記一枚にかけられるエネルギーとの比である（AAC方法74-09）。

10

【0105】

糖の抽出および分析

生地およびパンの両方の糖含量は、生地またはパンクラムの20gのサンプルをブレンディングカップ中に計量することによって試験された。次に、蒸留水80gが加えられ、手持ち式ブレンダーが使用されて、上記生地またはクラムを完全に分散させた。上記混合物の約12mlが15ml管に注がれ、そして氷浴上に置かれた。次いで、上記管が4,000rpmで10分間、遠心分離された。次いで、上清が除去され（上記管の中央に透明な溶液が得られることを確実にする）、次いで、2本の微量遠心管（microfuge）に移された。生地の抽出のために、上記上清は、上記微量遠心管中で1分間煮沸され、次いで氷上で冷却された。上記微量遠心管が12,000rpmで10分間、遠心分離された。次いで、得られた上清は、ラベル付きの新しい2本の微量遠心管に移され、それらは糖の分析まで冷凍庫で貯蔵された。

20

30

【0106】

サンプル中の糖含量は、Dionex Ultimate 3000 RS HPLCシステム上で、PA10ガードカラム（4x50mm）が付けられたDionex CarboPac PA1カラム（4x250mm）を用いて分析された。使用された電気化学的検出器は、Thermo Scientificの使い捨て電極を備えたDionex ED40であった。HPLCの移動相Aは50mM NaOHであり、移動相Bは200mM NaOHであった。すべての糖サンプルは、0.4μmのフィルターによりろ過された後、HPLCカラムに充填された。

【0107】

実施例1

アミログルコシダーゼの糖生成およびテクスチャー改変

従来の生デンプン分解（「RSD」）アミログルコシダーゼ（AMG 1100（Novozymes（North Carolina）から））が、熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG（Novozymesから））と、パン焼成におけるそれらの糖生成能およびクラムテクスチャー改変能に関して比較された。標準的な白パン配合物が、以下の方法に従って調製された。

40

【0108】

【表 3】

ストレート法による白パン

材料	穀粉重量に対する%	グラム
穀粉	100.0	700.00
DEPENDOX (登録商標) AXCA ^A	0.04	0.28
塩	2.0	14.00
粒状スクロース	1.0	7.00
プロピオン酸カルシウム	0.3	2.10
大豆油	2.0	14.00
圧搾酵母	7.00	49.00
水	64.0	448.00
GMS 90 SS ^B	1.0	7.00
ステアロイル乳酸 ナトリウム (SSL)	0.35	2.45
UFP 250 ^C	0.50	3.50
総重量	176.3	

^A アスコルビン酸、アゾジカーボンアミド (ADA)、真菌酵素および小麦デンプン (Corbion (Lenexa、KS) から入手可能) のブレンド。

^B 水和モノグリセリド (乳化剤; Corbionから入手可能)。

^C Ultra Fresh Premium 250 (貯蔵期間を延長する酵素; Corbionから入手可能)。

【表 4】

アミログルコシダーゼ

名称	AGU/g	最適温度	最適pH	ハーフタイム
AMG 1100	1100/g	65-70℃	4-5	70℃で7分間
Po-AMG	1680/g	75-80℃	4-5	70℃で120分間；85℃で10分間

10

【0110】

アミログルコシダーゼの量は、下記表に示されているように変化させた。

【0111】

【表 5】

配合の種類

生地#	1	2	3	4	5	6	7	8
		AMG 1100			Po-AMG			
穀粉1kg当 たりのAGU	0	1,000	2,000	5,000	500	1,000	2,000	5,000

20

【0112】

上記材料がHobartミキサーに加えられ、そして低速で1分間、次いで高速で13分間混捏された。ミキサーボウルは、20の冷水をミキシングボウルの冷却ジャケットに循環させることによって冷却された。混捏後、該生地は、下記表の加工処理パラメータに従って、木製ベンチ上で10分間休まされ、次いで、分割され、伸ばされ、そして成形された。

30

【0113】

【表 6】

加工処理パラメータ

目標生地温度	華氏 78° (20°Cの冷水を循環)	
フロアタイム	10分	
分割された生地の重量	525 g	10
丸め後の休ませ	5分	
成形型のタイプおよび設定		
成形型のタイプ	ストレートグレイ (straight grain)	
第2ローラー	2	
圧力 B d	2.8	20
最終発酵の設定	華氏 104°, 95% RH	
最終発酵時間	目標高さまでの時間	
焼成温度	華氏 420°	
焼成時間	20分	30
室温での冷却時間	60分	

【0114】

次いで、成形された生地片は、ローフパンの中に置かれ、そして目標とされる高さまで、およそ55～60分間最終発酵された。焼成前に、糖の抽出および分析用に、最終発酵された各生地のサンプルが採取された。焼成後、複数のローフを金属棚の上に置いて60分間冷却し、次いで、貯蔵寿命分析のためにプラスチック製の袋に個々に包装した。上記貯蔵寿命分析は、上述したテクスチャーアナライザーを用いたテクスチャー分析および糖含量分析を含む。

【0115】

図1は、従来のRSDアミログルコシダーゼ(AMG 1100)の糖生成能を、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)と比較している。結果は、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)が、主に、生デンプンが65を超える温度で糊化された後にデンプンをグルコースに変換し続ける能力故に、パンにおいてグルコースを生成することにおいてより効果的であることを示した。図2および図3は、従来のRSDアミログルコシダーゼ(AMG 1100)のパンテクスチャー改変能を、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)と比較している。結果は、熱的に安定なアミログルコシダーゼ(Po-AMG)は、クラムレジリエンスの増加およびクラム粘着性の低減という点から見て、非常に大きなテクスチャー改変能を有することを明らかに示している

10

20

30

40

50

。

【 0 1 1 6 】

図 2 に説明されているデータに基づくと、生地中に種々のレベルの P o - A M G を含むことによって、従来の酵素、例えば N o v o z y m e s からの A M G 1 1 0 0 が生地中に含まれた材料から形成された同様の製品と比較して、クラムレジリエンスの少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも約 1 5 %、より好ましくは約 2 0 % ~ 約 2 8 % の改善が達成され得る。また、図 3 に説明されているように、生地中に種々のレベルの P o - A M G を含めることによって、従来の酵素、例えば N o v o z y m e s からの A M G 1 1 0 0 が生地中に含まれた材料から形成された同様の製品と比較して、クラム粘着性の少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも約 2 5 %、より好ましくは約 2 5 % ~ 約 7 9 % の低減が達成され得る。

10

【 0 1 1 7 】

実施例 2

糖生成能の分析

標準的な白パン配合物が、以下の配合および実施例 1 に記載されている同一の加工処理パラメータに従って調製された。パン生地のすべてが、1 % の添加糖および明記された量のアミログルコシダーゼを用いて作製された。

【 0 1 1 8 】

【表 7】

ストレート法による白パン

材料	穀粉重量に対する%	グラム
穀粉	100.0	700.00
DEPENDOX (登録商標) AXC	0.04	0.28
塩	2.0	14.00
粒状スクロース	1.0	7.00
プロピオン酸カルシウム	0.3	2.10
大豆油	2.0	14.00
圧搾酵母	5.50	38.50
水	64.0	448.00
GMS 90 SS	1.0	7.00
SSL	0.35	2.45
NOVAMYL (登録商標) 3D ^A	0.02	0.14
総重量	174.8	

^A Novozymesからの老化防止性酵素。

【0119】

【表 8】

配合の種類

生地#	1	2	3	4
	穀粉1kg当たりのAGU			
AMG 1100	0	0	1000	1000
Po-AMG	0	1000	0	1000

【0120】

再び、最終発酵された生地のサンプルが収集され、そして糖分析用に急速冷凍された。10gの生地が90gの水に分散されたことを除いては、上述したように、生地の糖が抽出された。結果は、図4～図6に示されている。最終発酵された生地中のおよび焼成され

たパン中の糖含量が分析および比較されて、パン作製プロセス中に糖がいつ生成されたかを決定した。

【 0 1 2 1 】

【 表 9 】

糖分析

最終発酵された生地中のグルコース		
	穀粉1kg当たり0AGU のPo-AMG	穀粉1kg当たり1000 AGUのPo-AMG
穀粉1kg当たり0AGUの AMG 1100	0.06%	1.23%
穀粉1kg当たり1000 AGUのAMG 1100	1.56%	2.60%
パン中のグルコース		
	穀粉1kg当たり0 AGUのPo-AMG	穀粉1kg当たり1000 AGUのPo-AMG
穀粉1kg当たり0AGUの AMG 1100	0.61%	4.44%
穀粉1kg当たり1000 AGUのAMG 1100	2.08%	5.81%
パン中のマルトース		
	穀粉1kg当たり0 AGUのPo-AMG	穀粉1kg当たり1000 AGUのPo-AMG
穀粉1kg当たり0AGUの AMG 1100	1.92%	0.61%

10

20

30

40

穀粉1kg当たり1000 AGUのAMG 1100	0.00%	0.00%
パン中のマルトース		
	穀粉1kg当たり 0AGUのPo-AMG	穀粉1kg当たり 1000AGUのPo-AMG
穀粉1kg当たり0AGUの AMG 1100	7.29%	5.60%
穀粉1kg当たり1000 AGUのAMG 1100	7.24%	5.76%
焼成中に生成 されたグルコース		
	穀粉1kg当たり 0AGUのPo-AMG	穀粉1kg当たり 1000AGUのPo-AMG
穀粉1kg当たり0AGUの AMG 1100	0.55%	3.21%
穀粉1kg当たり1000 AGUのAMG 1100	0.52%	3.21%

10

20

30

40

50

【0122】

図4～図6は、アミログルコシダーゼが使用されて、パン作製プロセス中の種々の段階でグルコースを生成したことを示している。図4は、RSDアミログルコシダーゼ、例えばAMG 1100が使用されて、生地 of 混捏段階中および生地の最終発酵段階中に糖を生成することができるのに対して、より熱的に安定なアミログルコシダーゼ、例えばPo-AMGは、実際の焼成段階中に糖を生成することにおいてさらに一層効果的である（図5および図6を参照のこと）ことを示している。図6は、本発明において使用される熱的に安定なアミログルコシダーゼ、例えばPo-AMGのみが、焼成中に有意な量のグルコースを生成したのに対して、従来のアミログルコシダーゼ、例えばアスペルギルスニガ由来のAMG 1100は、デンプン粒が糊化される前に不活性化されたため、焼成中に有意な量のグルコースを生成することができなかったことを示した。しかし、2種の異なるタイプのアミログルコシダーゼの組合せを使用することによって、パン作製プロセスの全体を通じて、糖、最も有意にはグルコースが生成され得、それは、焼成された完成製品中の糖（特にグルコース）含量を最大にし、生地の最終発酵中に酵母が発酵するのに十分なグルコースをもたらし、かつ焼成された完成製品の望ましい甘味を与えることができる。さらに、上記表に示されているように、熱的に安定な老化防止性マルトース生成アミラーゼによって、焼成全体の間有意な量のマルトースが生成された。また、焼成された製品中の高量のマルトースは、焼成された製品の香りおよび味に貢献した。

【0123】

実施例 3

糖含量およびその老化防止性酵素に及ぼす影響

標準的な白パン配合物が、以下の配合に従って調製された。5種の異なる配合物が、配合物に加えられる糖の量、老化防止性酵素（NOVAMYL（登録商標））のレベルおよびアミログルコシダーゼ（Po-AMG）の量を変化させることによって調製され、他の材料は、下記表に示されているように、それに応じて変化させた。

【0124】

【表10】

ストレート法による白パン

材料	穀粉重量に対する%	グラム
穀粉	100.0	700
DEPENDOX（登録商標） AXC	0.06	0.42
塩	2.0	14
粒状スクロース	変化する	変化する
プロピオン酸カルシウム	0.2	1.4
SSL（任意的）	0.35	2.45
GMS-90（任意的）	1.00	7
大豆油	2.0	14
1% BXP 25001	0.10	0.7
乾燥酵母	変化する	変化する
水	変化する	変化する
総重量	変化する	変化する

10

20

30

【0125】

【表11】

配合の種類

生地#	1	2	3	4	5
Po-AMG	穀粉1kg当たり0AGU		穀粉1kg当たり1000AGU		
スクロース（穀粉重量に対する%）	8%		4%		0%
Novamy1 （穀粉1kg当たりのMANU）	0	2000	1000	2000	1000
乾燥酵母 （穀粉重量に対する%）	3.0	3.0	2.5	2.5	2.0
水（穀粉重量に対する%）	62.0	62.0	63.0	63.0	64.0

40

【0126】

50

本発明の酵素組成物を使用することによって、添加糖は、著しく低減され得、またはパンの配合から完全に除去され得、このことが、老化防止性酵素、例えばNOVAMYL（登録商標）の機能性を大いに高める。

【0127】

図7は、生地配合中の添加糖の量を低減することによって、NOVAMYL（登録商標）の老化防止機能が大いに高められることを示している。この焼成試験において、本発明者らは、4%添加糖および穀粉1kg当たり1000AGUのPo-AMGでの、穀粉1kg当たり1000MANUのNOVAMYL（登録商標）は、8%添加糖および穀粉1kg当たり0AGUのPo-AMGを含む、穀粉1kg当たり2000MANUのNOVAMYL（登録商標）と類似のクラム軟化効果を有するのに対して、0%添加糖および穀粉1kg当たり1000AGUのPo-AMGを含む、穀粉1kg当たり1000MANUのNOVAMYL（登録商標）は、8%添加糖および穀粉1kg当たり0AGUのPo-AMGを含む、穀粉1kg当たり2000MANUのNOVAMYL（登録商標）に比べて著しく良好に機能することを示した。

10

【0128】

図8は、この焼成試験において、老化防止性酵素（NOVAMYL（登録商標））によって生成されたマルトースの量を示す。マルトースは、NOVAMYL（登録商標）作用の最終生成物であり、パン中に生成されるマルトースの量は、酵素の機能性に直接関係している。図8における試験結果は、生地中の添加糖（すなわち、酵素阻害剤）を低減するまたは除去することによって、より多くのマルトースがNOVAMYL（登録商標）によって生成されることを示しており、これは酵素の活性および機能性の増加と一致する。NOVAMYL（登録商標）の増加された活性は、酵素の老化防止効果を改善するのみならず、パン中の高いマルトースレベルをもたらし、これは、完成されたパンの味および香りに正の貢献をした。

20

【0129】

この実施例では、本発明の酵素組成物を含み、かつ添加糖を含まないことにより、酵母の添加量が3.0%から2.0%に低減されることができ、これは33%の酵母低減を表している。

【0130】

実施例4

30

AMGの組合せ

この実施例は、0%添加糖で焼成する際の、通例のRSDアミログルコシダーゼ（AMG 1100）および熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG）の組合せを検討する。白パン生地が、ノータイム系（no-time system）を使用して調製された。この焼成において、穀粉1kg当たり2000MANUのNOVAMYL（登録商標）3D（これは、NOVAMYL（登録商標）の変種である）が、老化防止性酵素として使用された。熱的に安定なアミログルコシダーゼPo-AMGとともに、AMG 1100がRSDアミログルコシダーゼとして使用された。RSDアミログルコシダーゼ（AMG 1100）のレベルは、穀粉1kg当たり500および1000AGUであったのに対して、熱的に安定なアミログルコシダーゼ（Po-AMG）のレベルは、穀粉1kg

40

【0131】

【表 1 2】

白パンノータイム

材料	穀粉重量に対する%	グラム
穀粉	100.0	700
DEPENDOX (登録商標) A X C	0.06	0.42
塩	2.0	14
粒状スクロース	変化する	変化する
プロピオン酸カルシウム	0.3	2.1
SSL (任意的)	0.35	2.45
GMS-90	1.00	7
大豆油	2.0	14
圧搾酵母	変化する	変化する
水	変化する	変化する
総重量	変化する	変化する

10

20

30

【 0 1 3 2 】

【表 1 3】

配合の種類

生地#	1	2	3	4
添加されたスクロース (穀粉重量に対する%)	8	8	0	0
UFP 250 (穀粉重量に対する%)	0	0.25	0	0
NOVAMYL (登録商標) 3D (穀粉重量に対する%)	0	0	0.02	0.02
Eversoft ^A (穀粉重量に対する%)	0	0	0.0025	0.0025
AMG 1100 (穀粉1kg当たりのAGU)	0	0	545	1089
Po-AMG (穀粉1kg当たりのAGU)	0	0	1000	500
圧搾酵母 (穀粉重量に対する%)	5.75	5.75	4.0	4.0
水 (穀粉重量に対する%)	60.0	60.0	64.0	64.0

^A Corbionからの細菌アミラーゼ製品

【0133】

焼成後、貯蔵期間試験用に、パンの複数のローフがプラスチック製の袋の中で貯蔵された。糖分析について、パンクラムが蒸留水で抽出され、糖含量がDionex HPLCシステムで分析された。図9は、パン中の糖のタイプおよび含量を示す。結果は、老化防止性酵素および両方のタイプのアミログルコシダーゼ(AMG 1100およびPo-AMG)を加えることで、有意な量のグルコースおよびマルトースがパン中に生成されたことを示す。しかし、0%添加糖および本発明の酵素組成物を用いて作製されたそのパン中に、検出できる量のフルクトースは存在しなかった。図10は、それらのパンサンプルについての、測定された糖含量に基づいて算出された甘さを示した。結果は、酵素(NOVAMYL(登録商標)3Dと2種のAMGとの両方)を加えることで、0%添加糖のパンは、8%の添加糖を用いて作製された対照パンよりも実際に甘味があることを示した。図11~図12は、酵素を加えることで、パンの老化が有意に遅くされたことを示した。これは、クラム硬さの減少およびクラムレジリエンスの増加によって測定され得る。この実施例ではまた、本発明の酵素配合物および0%添加糖を用いて作製された生地は、8%添加糖を含み、本発明の酵素配合物を含まない生地と比較して、30%の酵母低減を可能にした。

【0134】

クラムレジリエンスおよび粘着性に関する改善のいくつか(図2、3、11および12から算出される)を下記表にまとめる。

【0135】

10

20

30

40

【表 1 4】

	AMG (穀粉 1kg当 たりの AGU)	0	500	1,000	2,000	5,000	図7
レジリエンス	AMG 1100	28.2%	28.4%	28.8%	31.2%	32.3%	27.50%
	Po-AMG	28.2%	31.3%	33.3%	38.2%	41.5%	35.20%
レジリエンスの改善			10%	16%	22%	28%	28%
粘着性	AMG 1100	12.4	12	11.9	10.4	8.5	
	Po-AMG	12.4	10.6	6.4	3.7	1.8	
粘着性の改善			12%	46%	64%	79%	

10

20

【0136】

実施例 5

官能評価

この実施例では、官能知覚のためにパンが調製され、そして評価された。8%の添加糖（この場合にはスクロース）および6.65 Promu/kgのNovamy1 Pro（これは、NOVAMY1（登録商標）（Novozymesから入手可能）の変種である）を用いて作製された対照パンが、0%の添加糖、33.25 PROMU/kgのNovamy1 Pro、および生デンプン分解AMG（NovozymesからのGold Crust 3300）とPo-AMGとの組合せを用いて作製された試験パンと比較された。

30

【0137】

【表 1 5】

中種生地系

中種	穀粉重量 に対する%	900g生地
Polar Bear Flour	70	630.0
STARPLEX (登録商標)	0.25	2.3
SSL	0.375	3.4
圧搾酵母	3	27.0
水	40.5	364.5
総計	114.13	1027.1
生地		
Polar Bear Flour	30.00	270.0
スクロース	変化する	変化する
塩	2	18.0
プロピオン酸カルシウム	0.35	3.2
DEPENDOX (登録商標) AXC	0.06	0.54
大豆油	2	18.0
圧搾酵母	変化する	変化する
水	変化する	変化する

10

20

30

【0138】

【表 16】

生地側の配合の種類

生地#	1	2
添加されたスクロース (穀粉重量に対する%)	8	0
NOVAMYL (登録商標) Pro ^A 穀粉 1 kg 当たりの PROMU	6.65	33.25
Gold Crust 3300 ^B (穀粉 1 kg 当たりの AGU)	0	825
Po-AMG (穀粉 1 kg 当たりの AGU)	0	756
压榨酵母 (穀粉重量に対する%)	4.0	2.5
水 (穀粉重量に対する%)	14.0	18.0

^A Novozymes からの NOVAMYL 変種

^B Novozymes からの タラロマイセス エメルソニ
(*Talaromyces emersoni*) アミログルコシダーゼ

【0139】

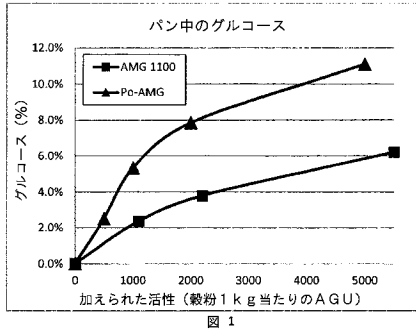
図 13 ~ 図 16 は、46 名のパネリストを対象とした、8%の粒状スクロースおよび 6.65 PROMU / kg の NOVAMYL (登録商標) Pro を用いて作製された対照パンと、0%の添加糖、33.25 PROMU / kg の NOVAMYL (登録商標) Pro、825 AGU / kg の Gold Crust 3300 および 756 AGU / kg の Po-AMG を用いて作製された試験パンとの官能比較を示した。結果は、0%添加糖での試験パンは、新鮮さ、軟らかいテクスチャーおよび良好な味において、有意に高いスコアを獲得したことを示した。甘さの評価はまた、試験パンが、対照パンに比べてわずかに甘味があったこと、およびそれが「ちょうど良い」甘さにより近いことを示した。全般的に、パネリストの約 90% (46 名中 41 名) が、0パーセントの添加糖で作製した試験パンを選好した (図 15)。また、糖含量分析 (図 16) は、添加糖を含まないが、本発明の酵素組成物を含む試験パンがフルクトースを含まなかったことを示した。

10

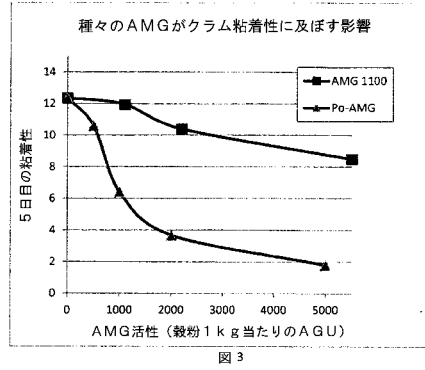
20

30

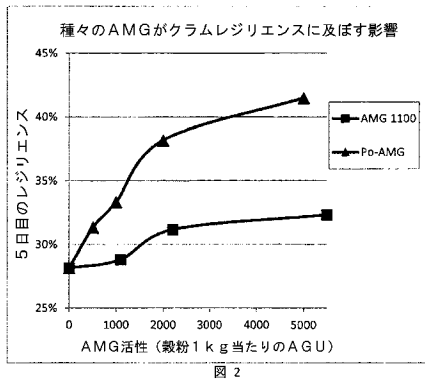
【 図 1 】



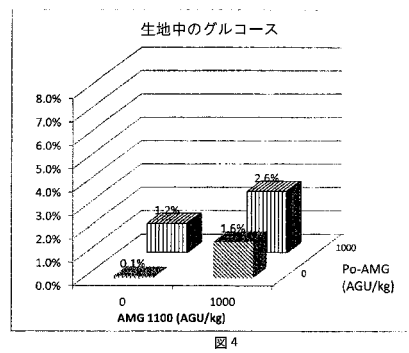
【 図 3 】



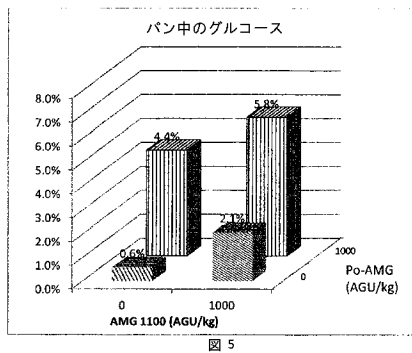
【 図 2 】



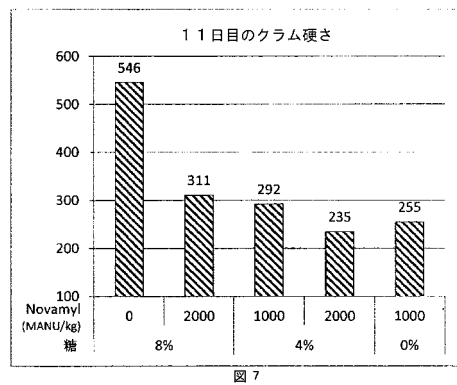
【 図 4 】



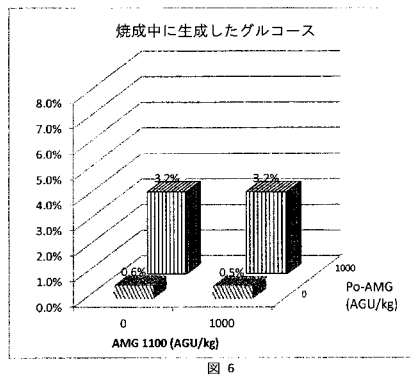
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】

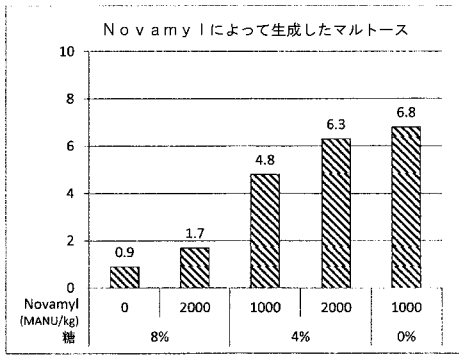


図 8

【 図 1 0 】

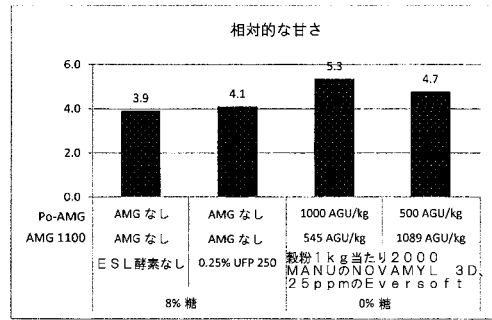


図 10

【 図 9 】

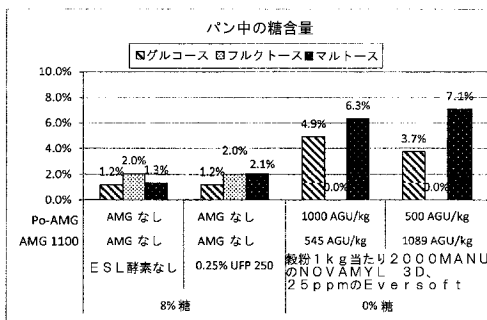


図 9

【 図 1 1 】

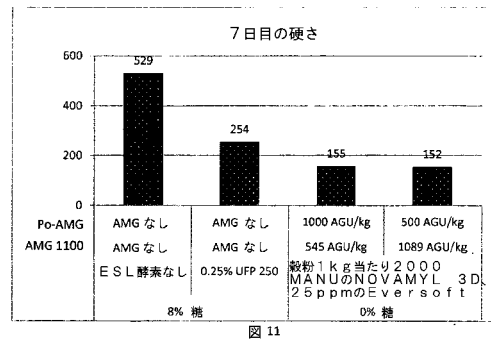


図 11

【 図 1 2 】

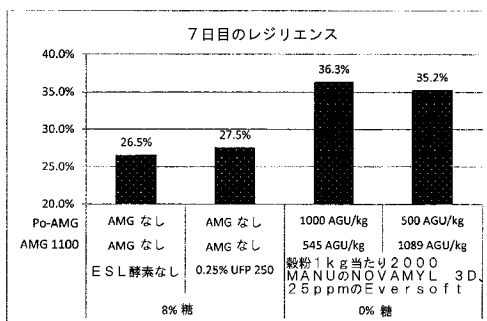


図 12

【 図 1 4 】

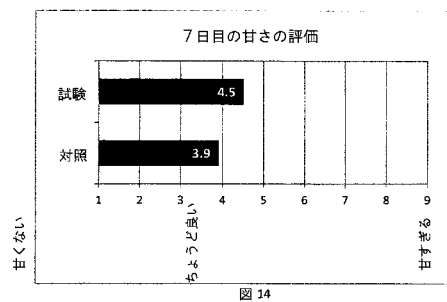


図 14

【 図 1 3 】

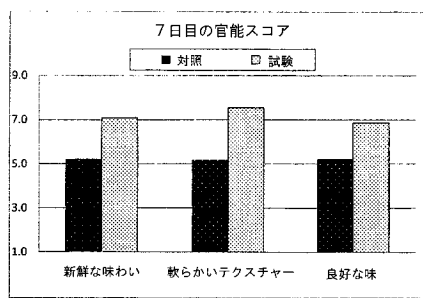


図 13

【 図 1 5 】

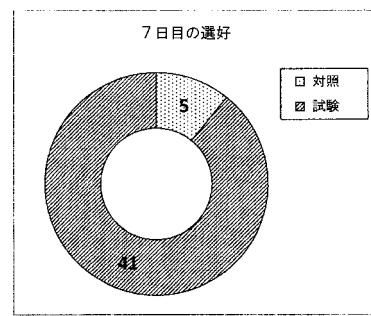


図 15

【 図 16 】

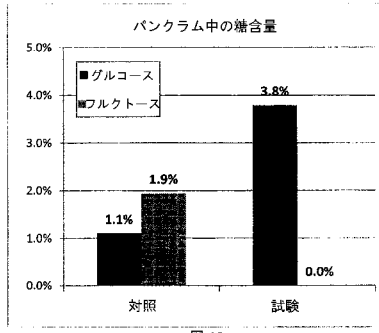


図 16

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/065612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A21D8/04 A21D13/06 ADD.		
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) A21D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 589 207 A (LARSEN PETER [FR] ET AL) 31 December 1996 (1996-12-31) line 62, paragraph 3 - column 4, line 45 examples 1,2	1-18
X	----- US 2009/297659 A1 (BOUTTE TROY T [US] ET AL) 3 December 2009 (2009-12-03) paragraphs [0012] - [0014], [0026], [0032] examples 1-3; tables 2,4	1-18
Y	----- CA 2 268 966 A1 (WORKMAN PACKAGING INC [CA]) 7 May 1998 (1998-05-07) page 10, paragraph 3 ----- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"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	Date of mailing of the international search report	
30 September 2015	02/11/2015	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Graham, Judith	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/065612

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2013/028071 A1 (CSM NEDERLAND BV [NL]; ELSE ANTHONY JAMES [NL]; TRONSMO KARI MARGRETE) 28 February 2013 (2013-02-28) examples 1,2 page 4, line 18 - line 24 page 6, line 1 - line 12 -----</p>	1-18
Y	<p>GERRARD J A ET AL: "The role of maltodextrins in the staling of bread", JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, GB, vol. 26, no. 2, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 201-209, XP002669573, ISSN: 0733-5210 figure 1 -----</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/065612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5589207	A	31-12-1996	AT 99870 T 15-01-1994
			AU 644810 B2 23-12-1993
			CA 2062966 A1 15-01-1991
			DE 69006031 D1 24-02-1994
			DE 69006031 T2 04-08-1994
			DK 0482105 T3 30-05-1994
			EP 0482105 A1 29-04-1992
			NO 920182 A 12-03-1992
			US 5589207 A 31-12-1996
			WO 9101088 A1 07-02-1991

US 2009297659	A1	03-12-2009	EP 2148570 A1 03-02-2010
			JP 2011521668 A 28-07-2011
			US 2009297659 A1 03-12-2009
			WO 2009148467 A1 10-12-2009

CA 2268966	A1	07-05-1998	NONE

WO 2013028071	A1	28-02-2013	CA 2787683 A1 25-02-2013
			EP 2747574 A1 02-07-2014
			JP 2013046614 A 07-03-2013
			US 2013059031 A1 07-03-2013
			WO 2013028071 A1 28-02-2013

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(72)発明者 ギルフォイル, エミリー
 アメリカ合衆国, カンザス州 66212, オーバーランド パーク, ムーディー パーク ドライブ 10213

(72)発明者 スティンソン, ジェシー
 アメリカ合衆国, カンザス州 66215, レネックサ, エーピーティー . 638, モンロヴィア ストリート 8534

(72)発明者 スコガーソン, ローレンス
 アメリカ合衆国, カンザス州 66208, ミッション ヒルズ, ウェスト 67 テラス 2801

Fターム(参考) 4B032 DB01 DK07 DK09 DK51 DL04