

(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
2023年11月16日(16.11.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/219172 A1

(51) 国際特許分類:

A23J 3/34 (2006.01) *A23L 33/185* (2016.01)
A23J 3/14 (2006.01) *C12P 21/06* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/018009

(22) 国際出願日: 2023年5月12日(12.05.2023)

(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 2022-079084 2022年5月12日(12.05.2022) JP
特願 2022-105971 2022年6月30日(30.06.2022) 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1丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 酒井 杏匠 (**SAKAI, Kiyota**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目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: 田中 順也, 外 (**TANAKA, Junya et al.**); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:** METHOD FOR PRODUCING PROCESSED VEGETABLE PROTEIN-CONTAINING COMPOSITION

(54) 発明の名称: 加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a processing technology for increasing the free glutamic acid content of a protein hydrolysate. A processed vegetable protein-containing composition that is obtained by a method for producing a processed vegetable protein-containing composition which comprises a step for treating a vegetable protein-containing composition with a proteolytic enzyme and a protein glutaminase has an increased free glutamic acid content.

(57) 要約: 本発明の目的は、タンパク質加水分解物の遊離グルタミン酸量を増加させる加工技術を提供することである。植物性タンパク質含有組成物を、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼで処理する工程を含む加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法により得られる加工植物性タンパク質含有組成物は、遊離グルタミン酸量が増加している。



WO 2023/219172 A1

明 細 書

発明の名称：加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法に関し、より具体的には、遊離グルタミン酸量が増加する加工がされた植物性タンパク質含有組成物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質を含有する食品素材に対して、消化吸収性の向上、低アレルギー化等の諸特性を付与するために、エンド型プロテアーゼを用いてタンパク質を切断する加工が有効とされているが、その際に苦味が生じることが、食品加工の技術開発において課題となる。

この苦味は、食品中のタンパク質を加水分解することにより生じた苦味ペプチドに起因する。タンパク質は、アミノ酸が100～1000個、1本の鎖状に結合したものであり、その鎖は規則的に折り畳まれ、球状の塊として存在している。球状の塊の外側には親水性のアミノ酸が、内側には疎水性のアミノ酸が多く存在しており、タンパク質を加水分解すると、この塊状の構造は破壊され、内側に存在していた疎水性アミノ酸を多く含む部分が切断されて苦味ペプチドとして露出し、苦味の原因となる（非特許文献1）。

[0003] このような苦味の課題への対処として、苦味を呈するアミノ酸を γ -グルタミル化するために、タンパク質の加水分解物をグルタミナーゼで処理することが提案されている。具体的には、大豆たん白質（フジプロF）を*Bacillus licheniformis*由来のプロテアーゼで処理してたん白加水分解物を作成した後、このたん白加水分解物を*B. amyloliquefaciens*由来のグルタミナーゼで γ -グルタミル化でき、これにより苦味が低減されることが確認されている（非特許文献2）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Habibi-Najafi, M.B., and Lee, B. H., Bitterness in cheese. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 36, 397-411(1996)

非特許文献2: 鈴木秀之, 中藤裕子, 田村友規、コク味調味料の新規調製法 ～プロテアーゼ処理で得られたタンパク加水分解物のγ-グルタミル化, 大豆たん白質研究 Vol. 17(2014), 42-45

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記のとおり、所定のタンパク質加水分解物の苦味低減のための処理としてグルタミナーゼ処理が提案されているものの、グルタミナーゼは基質特異性が狭いため、グルタミン酸遊離量の向上効果は限定的であり、未だ改善の余地がある。

[0006] そこで本発明は、タンパク質加水分解物の遊離グルタミン酸量を増加させる加工技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、植物性タンパク質含有組成物をタンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼで処理することで、遊離グルタミン酸量が飛躍的に向上することを見出した。本発明は、この知見に基づいて、更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0008] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 植物性タンパク質含有組成物を、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼで処理する工程を含む、加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法。

項2. 前記タンパク質分解酵素がプロテアーゼ及び／又はペプチダーゼである、項1に記載の製造方法。

項3. 前記プロテアーゼを、前記植物性タンパク質1g当たり110U以上用いる、項1又は2に記載の製造方法。

項4. 前記プロテアーゼが糸状菌由来プロテアーゼである、項2又は3に記載の製造方法。

項 5. 前記プロテアーゼが、アスペルギルス属及び／又はリゾプス属由来のプロテアーゼである、項 2～4 のいずれかに記載の製造方法。

項 6. 前記プロテアーゼが、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガ、アスペルギルス・メレウス、及びリゾプス・ニベウス由来のプロテアーゼからなる群より選択される、項 2～5 のいずれかに記載の製造方法。

項 7. 前記プロテアーゼが、細菌由来プロテアーゼである、項 2 又は 3 に記載の製造方法。

項 8. 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス属及び／又はジオバチルス属由来のプロテアーゼである、項 7 のいずれかに記載の製造方法。

項 9. 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス・ステアロサーモフィラス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・アミロリケファシエンス及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼからなる群より選択される、項 7 又は 8 に記載の製造方法。

項 10. 前記タンパク質分解酵素が、細菌由来プロテアーゼ及び糸状菌由来ペプチダーゼである、項 2、3 及び 7～9 のいずれかに記載の製造方法。

項 11. 前記ペプチダーゼが、リゾプス属及び／又はアスペルギルス属由来のペプチダーゼである、項 2～10 のいずれかに記載の製造方法。

項 12. 前記植物性タンパク質が、豆類、穀類、ナッツ類及び種子類からなる群より選択される植物のタンパク質である、項 1～11 のいずれかに記載の製造方法。

項 13. 前記植物性タンパク質含有組成物が液状である、項 1～12 のいずれかに記載の製造方法。

項 14. 前記植物性タンパク質含有組成物が水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料である、項 1～12 のいずれかに記載の製造方法。

項 15. タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを含む、植物性タンパク質含有組成物の遊離グルタミン酸量向上剤。

項 16. 項 1～14 のいずれかに記載の製造方法によって得られる、植物性タンパク質含有飲食品。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、タンパク質加水分解物中の遊離グルタミン酸量を増加させる加工技術が提供される。

発明を実施するための形態

[0010] 1. 加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法

本発明の加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法は、植物性タンパク質含有組成物を、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼで処理する工程（酵素処理工程）を含むことを特徴とする。酵素処理工程によって、植物性タンパク質含有組成物中の遊離グルタミン酸量を向上（増加）させることができるため、遊離グルタミン酸量が増加する加工がされた植物性タンパク質含有組成物が得られる。以下、本発明の加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法について詳述する。

[0011] 1-1. 植物性タンパク質含有組成物

本発明で用いられる植物性タンパク質含有組成物は、植物性タンパク質及び水を含み、典型例は飲食用の組成物である。植物性タンパク質含有組成物の性状に特段の制限はなく、例えば、液状、スラリー状、及びペースト状等の流動性を有する性状（以下において、これら流動性を有する性状の植物性タンパク質含有組成物を総括して「液体等」とも記載する）、及び固形状が挙げられる。

[0012] 植物性タンパク質含有組成物の具体例としては、非組織化タンパク質材料から調製されるものとして、（i）植物性タンパク質材料（具体的には、植物性タンパク質の由来植物の植物器官、並びに前記植物器官からタンパク質以外の成分の少なくとも一部の除去等を行って当該タンパク質の含量を高めた材料の少なくともいずれかが挙げられる。以下において同様。）の乾燥粉末を水に分散させて得られる液体等；（ii）植物性タンパク質材料を水中で破碎及び分散させ、必要に応じて植物材料の皮等に由来する不溶物を、遠心、濾過、濾し袋、篩等の任意の手段によって除去して得られる液体等；（iii）上記（i）又は（ii）の液体等から、植物性タンパク質以外の成分の除去等を行

って当該タンパク質の含有量を高めた液体等；並びに (iv) 上記 (i) ～ (ii) のいずれかの液体等から調製された乾燥末を、水と混合させて得られる液体等が挙げられ、組織化タンパク質材料から調製されるものとして、(v) 水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料が挙げられる。

[0013] なお、上記 (v) の具体例の調製に用いられる組織化植物性タンパク質材料は、一般的に代替肉（擬似肉）として公知の食品材料である。組織化植物性タンパク質材料の典型的な例として、植物性タンパク質及び水を含む原料混合物をエクストルーダー等で押出し、乾燥又は冷凍させて肉様に組織化させた材料が挙げられる。なお、本発明において、組織化植物性タンパク質材料が模する「肉」とは、食用とされる動物の筋肉を意味し、「肉」と記載する場合、哺乳類及び鳥類の筋肉だけでなく、魚介の身も包含する意味で用いる。

[0014] 組織化植物性タンパク質材料の形状としては、粒状及び繊維状が挙げられる。粒状の形状には、小粒型（ミンチ）、大粒型、ブロック型等の様々な大きさ（小粒型、大粒状、ブロック型の順にサイズが大きくなる）の塊状形状；フレーク型、フィレ型、スライス型等の様々な大きさ（フレーク型、フィレ型、スライス型の順にサイズが大きくなる）の扁平状形状が挙げられる。

[0015] 組織化植物性タンパク質材料のより具体的な例としては、粒状植物性たん白及び繊維状植物性たん白が挙げられる。粒状植物性たん白及び繊維状植物性たん白とは、いずれも、「植物性たん白の日本農林規格」で定義されたものを指す。しかしながら、本発明で用いられる組織化植物性タンパク質材料は上記のように肉様に組織化した材料であれば上記で定義される粒状植物性たん白及び繊維状植物性たん白に限定されるものではない。

[0016] 本発明で用いることができる組織化植物性タンパク質材料について、植物性タンパク質の種類、植物性タンパク質の含有割合以外の特性（例えば、性状、水分量、粒度、品温、食品添加物以外の原材料、食品添加物、かみごたえ、保水性、異物、内容量）及びその測定方法については、「植物性たん白の日本農林規格」で定義された特性及び測定方法に準拠することができる。

[0017] 組織化植物性タンパク質材料に含まれる植物性タンパク質の含有量（組織化植物性タンパク質材料が乾燥した状態の重量を基準とする。）としては特に限定されないが、例えば20重量%以上、25重量%以上、又は30重量%以上が挙げられる。遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、当該含有量としては、好ましくは35重量%以上、より好ましくは40重量%以上、さらに好ましくは45重量%以上が挙げられる。当該含有量範囲の上限としては特に限定されないが、例えば90重量%以下、好ましくは80重量%以下、より好ましくは70重量%以下、さらに好ましくは60重量%以下、一層好ましくは55重量%以下が挙げられる。

[0018] 液状の植物性タンパク質含有組成物の好ましい例としては、植物性ミルクが挙げられる。

[0019] なお、以下において、植物性タンパク質含有組成物中の「植物性タンパク質材料の含量」とは、非組織化植物性タンパク質材料を用いて調製された植物性タンパク質含有組成物の場合は、植物性タンパク質含有組成物に含まれる上記植物器官を構成していた成分の乾燥重量が占める割合であり、組織化植物性タンパク質材料を用いて調製された植物性タンパク質含有組成物の場合は、当該組織化植物性タンパク質材料の乾燥重量が占める割合をいう。例えば、植物性タンパク質含有組成物が、上記（i）～（iv）の具体例のように、植物器官に由来する成分及び水のみで構成されている液体等である場合、「植物性タンパク質材料の含量」は、当該液体等の乾燥重量が占める割合を指す。植物性タンパク質含有組成物が、上記（i）～（iv）の具体例と添加物とを含む液体等である場合、「植物性タンパク質材料の含量」は、当該液体等から添加物を除いた部分の乾燥重量が占める割合を指す。さらに、植物性タンパク質含有組成物が、上記（v）の具体例のように、組織化植物性タンパク質材料と水のみで構成されている膨潤物である場合、「植物性タンパク質材料の含量」は、当該組成物の乾燥重量が占める割合を指す。植物性タンパク質含有組成物が、上記（v）の具体例と添加物とを含む膨潤物である場合、「植物性タンパク質材料の含量」は、当該膨潤物から添加物を除いた部

分の乾燥重量が占める割合を指す。

[0020] 植物性タンパク質としては、特に限定されないが、例えば、大豆、えんどう豆、レンズ豆、ひよこ豆、黒豆、空豆、緑豆、ルピン豆、インゲン豆等の豆類；小麦、大麦、燕麦（オート麦）、ソルガム、米、ライムギ、そば、ひえ、あわ、テフ、トウモロコシ、ポテトなどの穀類；アーモンド、ココナッツ、ピーナッツ、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、ピリナッツ、栗、ゴマ、松の実等のナッツ類；ヘンプシード（産業用ヘンプ）、チア種子、キア、アマランサス、カナリーシード、アマニなどの種子類に含まれるタンパク質（天然タンパク質）；上記のタンパク質の、酸、アルカリなどによる化学的部分分解タンパク質；各種試薬による化学修飾タンパク質、及び合成ペプチド等が挙げられる。

[0021] 本発明において、上記の植物性タンパク質は、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。遊離グルタミン酸量をより一層増大させる観点から、好ましくは豆類のタンパク質が挙げられ、より好ましくは、大豆、えんどう豆、レンズ豆、ひよこ豆、空豆、緑豆、ルピン豆のタンパク質が挙げられ、さらに好ましくは、大豆、えんどう豆のタンパク質が挙げられる。

[0022] 植物性タンパク質含有組成物中の植物性タンパク質の含量としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製される場合、例えば0.01～50重量%、0.05～40重量%、又は0.1～30重量%、好ましくは0.25～25重量%、又は0.35～15重量%、より好ましくは0.45～10重量%、又は0.6～9重量%が挙げられ、植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製される場合、例えば1～70重量%、好ましくは5～50重量%、より好ましくは10～30重量%、さらに好ましくは15～25重量%が挙げられる。

[0023] また、植物性タンパク質含有組成物中の植物性タンパク質材料の含量とし

ても特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製される場合、例えば0.05～50重量%、0.1～40重量%、又は0.5～30重量%、好ましくは1～25重量%、又は3～20重量%、より好ましくは5～15重量%、又は7～12重量%が挙げられ、植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製される場合、例えば20～60重量%、好ましくは30～50重量%、より好ましくは35～45重量%が挙げられる。

[0024] なお、植物性タンパク質含有組成物に含まれる植物性タンパク質が、穀物のような澱粉質の多い植物のタンパク質（好ましくは、大麦、ソルガム、ライムギ）である場合、そのような植物性タンパク質含有組成物は、アミラーゼにより前処理されたものであることが好ましい。アミラーゼとしては、典型的には α -アミラーゼが挙げられる。当該 α -アミラーゼとしては特に限定されないが、例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*）属（例えば、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガ等）、バシラス（*Bacillus*）属（例えば、バシラス・アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）、バシラス・サブティリス（*Bacillus subtilis*）、バシラス・リチェニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）等）由来の α -アミラーゼが挙げられ、好ましくはバシラス（*Bacillus*）属由来の α -アミラーゼが挙げられ、より好ましくはバシラス・アミロリケファシエンス種由来の α -アミラーゼが挙げられる。

[0025] α -アミラーゼの使用量については、植物性タンパク質含有組成物1g当たり、例えば0.5～100U、1～50U、2～25U、又は3～10U、好ましくは4～8Uが挙げられる。

[0026] α -アミラーゼの活性については、1分間にバレイショデンプンのヨウ素による呈色を10%減少させる酵素量を1単位（1U）とする。

[0027] 1-2. タンパク質分解酵素

タンパク質分解酵素としては、ペプチド鎖を分解できる酵素を特に制限な

く用いることができ、典型的には、プロテアーゼ及び／又はペプチダーゼが挙げられる。

[0028] 1-2-1. プロテアーゼ

本発明において、プロテアーゼとは、エンド型ペプチダーゼを指す。プロテアーゼは、その由来において特に限定されるものではないが、例えば、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌由来プロテアーゼが挙げられる。

[0029] 糸状菌由来プロテアーゼとしては特に限定されないが、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、ニューロスポーラ (*Neurospora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、及びスクレロティニア (*Sclerotinia*) 属等に由来するプロテアーゼが挙げられる。

[0030] アスペルギルス属由来プロテアーゼの具体例としては、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガ (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)、アスペルギルス・ジャポニクス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス・ソーエ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamarii*)、アスペルギルス・ファチダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アクレタス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・キャンディダス (*Aspergillus candidus*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*)、

アスペルギルス・イヌイ (*Aspergillus inuii*)、アスペルギルス・グラカス (*Aspergillus glaucus*)、アスペルギルス・セシエルス (*Aspergillus caesiellus*)、アスペルギルス・クラバタス (*Aspergillus clavatus*)、アスペルギルス・デフレクタス (*Aspergillus deflectus*)、アスペルギルス・フィシャリアヌス (*Aspergillus fischerianus*)、アスペルギルス・パラシティクス (*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・ペニシロイデス (*Aspergillus penicilloides*)、アスペルギルス・レストリクタス (*Aspergillus restrictus*)、アスペルギルス・シドウィ (*Aspergillus sydowii*)、アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・ウスタス (*Aspergillus ustus*)、及びアスペルギルス・ベルシコロール (*Aspergillus versicolor*) 等に由来するプロテアーゼが挙げられる。

[0031] リゾプス属由来プロテアーゼの具体例としては、リゾプス・キネンシス (*Rhizopus chinensis*)、リゾプス・デレマー (*Rhizopus delemar*)、リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) 及びリゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) 等に由来するプロテアーゼが挙げられる。

[0032] 細菌由来プロテアーゼとしては、バチルス (*Bacillus*) 属及びジオバチルス (*Geobacillus*) 属等に由来するプロテアーゼが挙げられる。

[0033] バチルス属 (又はジオバチルス属) 由来プロテアーゼの具体例としては、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・クラウジー (*Bacillus clausii*)、バチルス・インターミディウス (*Bacillus intermedius*)

）、バチルス・レントス（*Bacillus lentus*）、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）、バチルス・ステアロサーモフィラス（*Bacillus stearothermophilus*）、バチルス・サブティリス（*Bacillus subtilis*）、及びバチルス・サーモプロテオリティカス（*Bacillus thermoproteolyticus*）、及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼが挙げられる。

[0034] 本発明において、上記のプロテアーゼは、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。上記のプロテアーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは糸状菌由来プロテアーゼ及び／又は細菌由来プロテアーゼが挙げられる。

[0035] また、上記の糸状菌由来プロテアーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくはアスペルギルス属由来プロテアーゼ、リゾプス属由来プロテアーゼが挙げられる。上記のアスペルギルス属由来プロテアーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくはアスペルギルス・オリゼ由来プロテアーゼ、アスペルギルス・ニガ由来プロテアーゼ、アスペルギルス・メレウス由来プロテアーゼが挙げられ、上記のリゾプス属由来プロテアーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくはリゾプス・ニベウス由来プロテアーゼが挙げられる。

[0036] また、上記の細菌由来プロテアーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくはバチルス・ステアロサーモフィラス由来プロテアーゼ、バチルス・リケニフォルミス由来プロテアーゼ、バチルス・アミロリケファシエンス由来プロテアーゼ及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼが挙げられ、より好ましくはジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来プロテアーゼ、バチルス・アミロケエファシエンス由来プロテアーゼ、バチルス・リケニフォルミス由来プロテアーゼが挙げられ、さらに好ましくは、バチルス・リケニフォルミス由来プロテアーゼが挙げ

られる。

[0037] プロテアーゼの使用量としては特に限定されないが、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量として、例えば 110 U 以上が挙げられる。遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは 200 U 以上、350 U 以上、又は 500 U 以上、より好ましくは 700 U 以上、又は 900 U 以上、さらに好ましくは 1000 U 以上、一層好ましくは 1100 U 以上が挙げられる。プロテアーゼの植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、例えば 300000 U 以下、150000 U 以下、100000 U 以下、75000 U 以下、50000 U 以下、40000 U 以下、30000 U 以下、25000 U 以下、20000 U 以下、15000 U 以下、又は 10000 U 以下が挙げられる。

[0038] また、プロテアーゼの植物性タンパク質 1 g 当たりの使用量としては、例えば 110 U 以上が挙げられ、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは 200 U 以上、350 U 以上、又は 500 U 以上、より好ましくは 750 U 以上、又は 1000 U 以上、さらに好ましくは 1200 U 以上、一層好ましくは 1300 U 以上、又は 1400 U 以上が挙げられる。プロテアーゼの植物性タンパク質 1 g 当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、例えば、600000 U 以下、300000 U 以下、150000 U 以下、100000 U 以下、75000 U 以下、60000 U 以下、50000 U 以下、40000 U 以下、30000 U 以下、25000 U 以下、又は 20000 U 以下が挙げられる。

[0039] プロテアーゼの活性については、カゼインを基質とし、フォリン法により測定されるものとする。すなわち、プロテアーゼの活性は、カゼインを基質として常法により測定対象プロテアーゼの至適 pH に応じて設定される pH で酵素反応を行い、1 分間にチロシン 1 μ g に相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を 1 単位 (1 U) とする。

[0040] 1-2-2. ペプチダーゼ

本発明において、ペプチダーゼとは、エキソ型ペプチダーゼを指す。ペプ

チダーゼは、その由来において特に限定されるものではないが、例えば、糸状菌由来ペプチダーゼ、放線菌由来ペプチダーゼ、細菌由来ペプチダーゼが挙げられる。

[0041] 糸状菌由来ペプチダーゼとしては特に限定されないが、例えば、リゾプス (*Rhizopus*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属等に由来するペプチダーゼが挙げられる。放線菌由来ペプチダーゼとしては特に限定されないが、例えば、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属等に由来するペプチダーゼが挙げられる。リゾプス属由来ペプチダーゼの具体例としては、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) 等に由来するペプチダーゼが挙げられ、アスペルギルス属由来ペプチダーゼの具体例としては、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 等に由来するペプチダーゼが挙げられる。

[0042] 細菌由来ペプチダーゼとしては特に限定されないが、例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、ジオバチルス (*Geobacillus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属等に由来するペプチダーゼが挙げられる。

[0043] 本発明において、上記のペプチダーゼは、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。上記のペプチダーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは糸状菌由来ペプチダーゼが挙げられ、より好ましくはリゾプス属（中でもリゾプス・オリゼ）及びアスペルギルス属（中でもアスペルギルス・オリゼ）由来ペプチダーゼが挙げられ、さらに好ましくはリゾプス属（中でもリゾプス・オリゼ）由来ペプチダーゼが挙げられる。

[0044] ペプチダーゼの使用量としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、植物性タンパク質材料1g当たりの使用量として、例えば0.001U以上が挙げられる。遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは0.005U以上

、0.01 U以上、又は0.015 U以上、より好ましくは0.025 U以上、0.05 U以上、0.075 U以上、又は0.1 U以上、さらに好ましくは0.13 U以上、0.15 U以上、0.18 U以上、0.2 U以上、又は0.23 U以上、一層好ましくは0.25 U以上、又は0.27 U以上が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、ペプチダーゼの植物性タンパク質材料1 g当たりの使用量としては、好ましくは0.5 U以上、又は1 U以上、より好ましくは2.5 U以上、5 U以上、又は7.5 U以上、さらに好ましくは10 U以上、15 U以上、又は20 U以上、一層好ましくは25 U以上、又は30 U以上、より一層好ましくは35 U以上、又は40 U以上が挙げられる。

[0045] ペプチダーゼの植物性タンパク質材料1 g当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば500 U以下、300 U以下、200 U以下、100 U以下、75 U以下、50 U以下、又は45 U以下が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、ペプチダーゼの植物性タンパク質材料1 g当たりの使用量範囲の上限としては、例えば500 U以下、好ましくは400 U以下、又は300 U以下、より好ましくは200 U以下、又は100 U以下、さらに好ましくは80 U以下、70 U以下、又は60 U以下、一層好ましくは55 U以下、又は50 U以下が挙げられる。

[0046] また、ペプチダーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量としては、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば0.001 U以上が挙げられ、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは0.005 U以上、0.01 U以上、又は0.015 U以上、より好ましくは0.025 U以上、又は0.05 U以上、さらに好ましくは0.075 U以上、又は0.1 U以上、一層好ましくは0.13 U

以上、0.15 U以上、0.18 U以上、0.2 U以上、又は0.23 U以上、より一層好ましくは0.25 U以上、又は0.27 U以上、特に好ましくは0.3 U以上、又は0.33 U以上が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、ペプチダーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量としては、好ましくは1 U以上、又は2.5 U以上、より好ましくは5 U以上、又は10 U以上、さらに好ましくは20 U以上、30 U以上、又は40 U以上、一層好ましくは50 U以上、60 U以上、又は70 U以上、より一層好ましくは75 U以上、又は80 U以上が挙げられる。

[0047] ペプチダーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば、1000 U以下、900 U以下、800 U以下、700 U以下、600 U以下、500 U以下、300 U以下、200 U以下、100 U以下、又は90 U以下が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、ペプチダーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量範囲の上限としては、例えば1000 U以下、800 U以下、600 U以下、500 U以下、400 U以下、300 U以下、200 U以下、150 U以下、100 U以下、又は90 U以下が挙げられる。

[0048] ペプチダーゼの活性については、L-ロイシル-p-ニトロアニリド・塩酸塩を基質とし、第9版 食品添加物公定書に基づく方法により測定されるものとし、具体的には、L-ロイシル-p-ニトロアニリド・塩酸塩を基質として常法により酵素反応を行い、1分間に1 μmol のp-ニトロアニリンを生成する活性を1単位（1 U）とする。

[0049] 1-3. プロテイングルタミナーゼ

本発明で用いられるプロテイングルタミナーゼとしては、ペプチド結合の切断及びタンパク質の架橋を伴わずグルタミン残基のアミド基含有側鎖を分

解する作用を示す酵素であれば、その種類及び由来等は特に限定されない。プロテイングルタミナーゼの例として、特開2000-50887号公報、特開2001-218590号公報、国際公開第2006/075772号に開示された、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*) 属、アウレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、又はミロイデス (*Myroides*) 属由来のプロテイングルタミナーゼが挙げられる。これらのプロテイングルタミナーゼは、1種を単独で用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。

[0050] これらのプロテイングルタミナーゼの中でも、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくはクリセオバクテリウム属由来のプロテイングルタミナーゼが挙げられ、より好ましくはクリセオバクテリウム・プロテオリティカム (*Chryseobacterium proteolyticum*) 種由来のプロテイングルタミナーゼが挙げられる。

[0051] プロテイングルタミナーゼは、上記のプロテイングルタミナーゼの由来元となる微生物の培養液より調製することができる。具体的な調製方法としては、上記の微生物の培養液又は菌体よりプロテイングルタミナーゼを回収する方法が挙げられる。例えば、プロテイングルタミナーゼ分泌型微生物を用いる場合は、培養液から、必要に応じて予めろ過、遠心処理等によって菌体を回収した後、酵素を分離及び／又は精製することができる。また、プロテイングルタミナーゼ非分泌型微生物を用いる場合は、必要に応じて予め培養液から菌体を回収した後、菌体を加圧処理、超音波処理等によって破碎して酵素を露出させた後、酵素を分離及び／又は精製することができる。酵素の分離及び／又は精製法としては、公知のタンパク質分離及び／又は精製法を特に限定されることなく用いることができ、例えば、遠心分離法、UF濃縮法、塩析法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等が挙げられる。分離及び／又は精製された酵素は、凍結乾燥、減圧乾燥等の乾燥法

により粉末化することができ、また、当該乾燥法において適当な賦形剤及び／又は乾燥助剤を用いて粉末化することもできる。また、分離及び／又は精製された酵素は、適当な添加剤を加え、ろ過滅菌することで液状化することもできる。

[0052] プロテイングルタミナーゼの使用量としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量として、例えば 0.01 U 以上が挙げられる。遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量としては、好ましくは 0.5 U 以上、より好ましくは 0.75 U 以上、さらに好ましくは 1.0 U 以上、一層好ましくは 1.2 U 以上が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量としては、好ましくは 0.01 U 以上、より好ましくは 0.1 U 以上、又は 0.25 U 以上、さらに好ましくは 0.5 U 以上、又は 0.8 U 以上、一層好ましくは 1 U 以上、又は 1.2 U 以上が挙げられる。

[0053] プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば 200 U 以下、150 U 以下、100 U 以下、又は 50 U 以下、好ましくは 30 U 以下、より好ましくは 15 U 以下、又は 10 U 以下、さらに好ましくは 7.5 U 以下、5 U 以下、2.5 U 以下、又は 2 U 以下が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質材料 1 g 当たりの使用量範囲の上限としては、例えば 200 U 以下、150 U 以下、120 U 以下、100 U 以下、80 U 以下、60 U 以下、40 U 以下、30 U 以下、20 U 以下、10 U 以下、7.5 U 以下

、5 U以下、2.5 U以下、又は2 U以下が挙げられる。

[0054] また、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量として、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば0.15 U以上が挙げられる。遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量としては、好ましくは0.5 U以上、より好ましくは0.75 U以上、さらに好ましくは1.0 U以上、一層好ましくは1.2 U以上が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量としては、好ましくは0.1 U以上、又は0.25 U以上、より好ましくは0.5 U以上、又は0.75 U以上、さらに好ましくは1 U以上、又は1.5 U以上、一層好ましくは2 U以上、又は2.5 U以上が挙げられる。

[0055] プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量範囲の上限としては特に限定されないが、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば400 U以下、300 U以下、200 U以下、150 U以下、100 U以下、又は50 U以下、好ましくは30 U以下、25 U以下、又は20 U以下、より好ましくは15 U以下、又は10 U以下、さらに好ましくは7.5 U以下、5 U以下、又は2.5 U以下が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものである場合、プロテイングルタミナーゼの植物性タンパク質1 g当たりの使用量範囲の上限としては、例えば400 U以下、300 U以下、200 U以下、100 U以下、50 U以下、25 U以下、20 U以下、10 U以下、又は5 U以下が挙げられる。

[0056] タンパク質分解酵素とプロテイングルタミナーゼとの使用比率については、各酵素についての上記使用量に基づいて定まるが、遊離グルタミン酸量の

増加効果をより一層高める観点から、好ましくは以下の使用比率が挙げられる。

[0057] プロテイングルタミナーゼのプロテアーゼ1 U当たりの使用量としては、好ましくは0.005 mU以上、より好ましくは0.01 mU以上、又は0.02 mU以上、さらに好ましくは0.03 mU以上、0.04 mU以上、又は0.045 mU以上、一層好ましくは0.05 mU以上、0.075 mU以上、0.1 mU以上、又は0.15 mU以上が挙げられる。プロテイングルタミナーゼのプロテアーゼ1 U当たりの使用量範囲の上限としては、例えば15 mU以下が挙げられ、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは12 mU以下、又は10 mU以下、より好ましくは8 mU以下、又は6 mU以下、さらに好ましくは5 mU以下、又は4 mU以下、一層好ましくは3 mU以下、2 mU以下、又は1.5 mU以下が挙げられる。

[0058] プロテイングルタミナーゼのペプチダーゼ1 U当たりの使用量としては、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、好ましくは0.001 U以上、より好ましくは0.005 U以上、又は0.01 U以上、さらに好ましくは0.015 U以上、0.02 U以上、又は0.025 U以上、一層好ましくは0.03 U以上が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものの場合、プロテイングルタミナーゼのペプチダーゼ1 U当たりの使用量としては、より好ましくは0.005 U以上、さらに好ましくは0.01 U以上、又は0.02 U以上、一層好ましくは0.025 U以上、又は0.03 U以上が挙げられる。プロテイングルタミナーゼのペプチダーゼ1 U当たりの使用量範囲の上限としては、植物性タンパク質含有組成物が非組織化タンパク質材料から調製されるもの及び組織化タンパク質材料から調製されるもののいずれの場合も、例えば100 U以下が挙げられ、遊離グルタミン酸量の増加効果をより一層高める観点から、好ましくは75 U以下、50 U以下、又は40 U以下、より

好ましくは30U以下、又は20U以下、さらに好ましくは15U以下、又は10U以下、一層好ましくは7U以下、6U以下、又は5.5U以下が挙げられる。植物性タンパク質含有組成物が組織化タンパク質材料から調製されるものの場合、プロテイングルタミナーゼのペプチダーゼ1U当たりの使用量範囲の上限としては、好ましくは3U以下、より好ましくは2U以下、又は1U以下、さらに好ましくは0.5U以下、又は0.1U以下、一層好ましくは0.075U以下、又は0.05U以下が挙げられる。

[0059] プロテイングルタミナーゼの活性については、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシン (Z-Gln-Gly) を基質とし、1分間に1 μ molのアンモニアを遊離する酵素量を1単位 (1U) とする。

[0060] 1-4. 反応条件等

酵素処理工程では、当該処理により、植物性タンパク質含有組成物においてグルタミン酸を遊離させる反応を進行させる。

[0061] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを作用させる順番としては特に限定されず、各酵素を任意の順番で順次作用させてもよいし、両酵素を同時に作用させてもよいが、好ましくは両酵素を同時に作用させることができる。

[0062] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼによる処理の条件 (温度、pH、時間等) については、目的とする遊離グルタミン酸量の増加効果の程度に応じて適宜選択される。

[0063] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼによる処理が行われる温度としては特に限定されず、使用酵素の至適温度及び／又は植物性タンパク質含有組成物の熱特性等に応じて当業者が適宜決定することができるが、例えば30℃～80℃、好ましくは40℃～70℃、より好ましくは40℃～60℃が挙げられる。

[0064] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼによる処理が行われる反応系のpHとしても特に限定されず、使用酵素の至適pH及び／又は植物性タンパク質含有組成物のpH特性等に応じて当業者が適宜決定することが

できるが、25℃でのpHとして、例えば2～9、好ましくは3～8、より好ましくは5～7、さらに好ましくは6～7が挙げられる。

[0065] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼによる処理が行われる時間としては例えば0.5～96時間、好ましくは1～72時間、より好ましくは1～30時間が挙げられる。

[0066] 1-5. 他の工程

本発明の製造方法は、上記の酵素処理工程の他に、任意の他の工程を含むことができる。他の工程の具体例については、酵素処理工程の前に行われる工程として、上記の植物性タンパク質含有組成物を調製する工程が挙げられ、酵素処理工程の後に行われる工程として、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼの失活工程、加工植物性タンパク質含有組成物のろ過工程、加工植物性タンパク質含有組成物の乾燥工程等が挙げられる。乾燥工程における方法としては、凍結乾燥、真空乾燥、噴霧乾燥等が挙げられる。

[0067] 2. 植物性タンパク質含有飲食品

本発明の植物性タンパク質含有飲食品は、上記の「1. 加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法」によって得られる、加工植物性タンパク質含有組成物又はそれを飲食品材料とする調理品である。これら本発明の植物性タンパク質含有飲食品においては、遊離グルタミン酸量が増加している。

[0068] 本発明の植物性タンパク質含有飲食品が加工植物性タンパク質含有組成物の調理品の場合、当該調理品を得るための調理方法としては、一般的な動物性タンパク質調理品の代替飲食品を得るために行われる任意の調理方法を用いることができる。調理方法の具体例としては、調味、食品添加物配合、他の飲食品材料の混合、加熱、発酵、成形、冷凍、及び／又は焼成等が挙げられる。

[0069] 本発明の植物性タンパク質含有飲食品の性状は特に限定されない。本発明の植物性タンパク質含有飲食品が加工植物性タンパク質含有組成物の場合における性状としては、上記の製造方法における植物性タンパク質含有組成物の性状及び乾燥工程の有無等に応じて定まるが、例えば、液状、スラリー状

、及びペースト状等の流動性を有する性状及び固形状が挙げられ、固形状の具体例としては、粉末状、細粒状、顆粒状、水分で膨潤した組織化状、乾燥した組織化状等が挙げられる。本発明の植物性タンパク質含有飲食品が加工植物性タンパク質含有組成物の調理品の場合における性状としては、一般的な動物性タンパク質調理品の植物性代替飲食品の任意の性状が挙げられる。

[0070] 上記の調理品の具体例としては、一般的な動物性タンパク質調理品の植物性代替飲食品であれば特に限定されないが、例えば、代替ミルク、代替肉、代替チーズ、代替ヨーグルト等が挙げられる。

[0071] 3. 遊離グルタミン酸量向上剤

タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼの組み合わせは、植物性タンパク質含有組成物中の遊離グルタミン酸量を向上（増加）させることができる。従って、本発明は、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを含む、植物性タンパク質含有組成物の遊離グルタミン酸量向上剤も提供する。

[0072] 上記の遊離グルタミン酸量向上剤において、使用する成分の種類、使用量等については、前記「1. 加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法」の欄に示す通りである。

実施例

[0073] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定して解釈されるものではない。

[0074] [使用した酵素]

以下の酵素（全て天野エンザイム(株)製）を使用した。

（1）タンパク質分解酵素

（1-1）プロテアーゼ

- ・ *Aspergillus niger* 由来プロテアーゼ
- ・ *Rhizopus niveus* 由来プロテアーゼ
- ・ *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼ
- ・ *Aspergillus melles* 由来プロテアーゼ

- ・ *Bacillus licheniformis* 由来プロテアーゼ
- ・ *Bacillus amyloliquefaciens* 由来プロテアーゼ
- ・ *Geobacillus stearothermophilus* 由来プロテアーゼ
- (1-2) ペプチダーゼ
 - ・ *Aspergillus oryzae* 由来ペプチダーゼ
 - ・ *Rhizopus oryzae* 由来ペプチダーゼ
- (2) プロテイングルタミナーゼ
 - ・ *Chryseobacterium proteolyticum* 由来プロテイングルタミナーゼ (PG)
- (3) グルタミナーゼ
 - ・ *Bacillus amyloliquefaciens* 由来グルタミナーゼ
- (4) α -アミラーゼ
 - ・ *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ

[0075] [使用した植物性タンパク質材料]

[表1]

製品名	植物性タンパク質	性状	タンパク質含量 (重量基準)	メーカー
ソイプロ	大豆タンパク質	粉末	50%以上	(株)Ｊ－オイルミルズ
NUTRALYS F85M	エンドウタンパク質	粉末	85%以上	ロケットジャパン(株)
VITEN	小麦タンパク質	粉末	80%以上	ロケットジャパン(株)
リョクトウ蛋白	リョクトウタンパク質	粉末	80%以上	オルガノ(株)
そら豆蛋白	ソラマメタンパク質	粉末	83.7%以上	オルガノ(株)
ひよこ豆蛋白	ヒヨコマメタンパク質	粉末	84%以上	オルガノ(株)
オート蛋白	オートタンパク質	粉末	75%以上	オルガノ(株)
チアシード蛋白	チアシードタンパク質	粉末	83%以上	オルガノ(株)
レンズ豆蛋白	レンズマメタンパク質	粉末	50%以上	オルガノ(株)
ライス蛋白	ライスタンパク質	粉末	40.3%以上	バイオアクティヴ(株)
ヘンプ蛋白	ヘンプシード※タンパク質	粉末	85%以上	バイオアクティヴ(株)
アーモンド蛋白	アーモンドタンパク質	粉末	60%以上	バイオアクティヴ(株)
ゼイン	トウモロコシタンパク質	粉末	81%以上	富士フィルム和光純薬(株)
Lupin isolate	ルピンマメタンパク質	粉末	85%以上	Wide Open Agriculture
北海道産ライ麦全粒粉	ライ麦タンパク質	粉末	7.5±1.0%	富澤商店
石橋工業 大麦粉	大麦タンパク質	粉末	6.80%	石橋工業
ホワイトソルガム粉	ソルガムタンパク質	粉末	10%	中野産業
ダイズラボ「大豆のお肉」 乾燥タイプ（ミンチ状）	大豆タンパク質	組織化	50%	マルコメ（株）

※ヘンプシードはTHCを含まない産業用ヘンプ由来である。

[0076] (1) 予備試験例及び試験例 1, 2 で用いた植物性タンパク質含有組成物（液状の植物性タンパク質含有組成物）

上記の植物性タンパク質材料（粉末）を水と混合させ、液状の植物性タンパク質含有組成物を調製した。当該組成物中の植物性タンパク質材料の含有量は、10重量%とした。

[0077] (2) 予備試験例、及び試験例 1, 3, 4 で用いた植物性タンパク質含有組成物（水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料）

上記の植物性タンパク質材料（組織化）10g に対して6倍重量の水を加

えた。60℃で60分間静置して組織化植物性タンパク質材料を膨潤させ、膨潤後、水で洗い流した。その後、水分を切り、植物性タンパク質含有組成物（水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料）25g（植物性タンパク質含有組成物中のタンパク質材料の含有量は、約40重量%）を得た。

[0078] [酵素活性測定方法]

(1) タンパク質分解酵素活性値測定法

(1-1) プロテアーゼ活性値測定法

0.6% (w/v) カゼイン溶液 (0.05 mol/L リン酸水素ナトリウム、pH 8.0 [*Geobacillus stearothermophilus* 由来、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来、*Bacillus licheniformis* 由来、*Aspergillus melleus* 由来プロテアーゼの場合] 又は、0.7% (v/w) 乳酸、pH 3.0 [*Aspergillus niger* 由来、*Aspergillus oryzae* 由来、*Rhizopus niveus* 由来プロテアーゼの場合]) 5 mL を、37℃で10分間加温した後、プロテアーゼを含む試料溶液 1 mL を加え、直ちに振り混ぜた。この液を 37℃で10分間放置した後、トリクロロ酢酸試液 (1.8% (w/v) トリクロロ酢酸、1.8% (w/v) 酢酸ナトリウム及び 0.33 mol/L 酢酸を含む [*Geobacillus stearothermophilus* 由来、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来、*Bacillus licheniformis* 由来、*Aspergillus melleus* 由来プロテアーゼの場合]、又は 0.44 mol/L トリクロロ酢酸を含む [*Aspergillus niger* 由来、*Aspergillus oryzae* 由来、*Rhizopus niveus* 由来プロテアーゼの場合]) 5 mL を加えて振り混ぜ、再び 37℃で30分間放置し、ろ過した。初めのろ液 3 mL を除き、次のろ液 2 mL を量り、0.55 mol/L 炭酸ナトリウム試液 5 mL 及びフォリン試液 (1→3) 1 mL を加え、よく振り混ぜ、37℃で30分間放置した。この液（酵素反応液）につ

き、水を対照とし、波長660nmにおける吸光度ATを測定した。

[0079] 別に、プロテアーゼを含む試料溶液1mLを量り、トリクロロ酢酸試液（1.8%（w/v）トリクロロ酢酸、1.8%（w/v）酢酸ナトリウム及び0.33mol/L酢酸を含む[*Geobacillus stearothermophilus*由来、*Bacillus amyloliquefaciens*由来、*Bacillus licheniformis*由来、*Aspergillus melleus*由来プロテアーゼの場合]、又は0.44mol/Lトリクロロ酢酸を含む[*Aspergillus niger*由来、*Aspergillus oryzae*由来、*Rhizopus niveus*由来プロテアーゼの場合]）5mLを加えて振り混ぜた後、0.6%（w/v）カゼイン溶液（0.05mol/Lリン酸水素ナトリウム、pH8.0[*Geobacillus stearothermophilus*由来、*Bacillus amyloliquefaciens*由来、*Bacillus licheniformis*由来、*Aspergillus melleus*由来プロテアーゼの場合]又は、0.7%（v/w）乳酸、pH3.0[*Aspergillus niger*由来、*Aspergillus oryzae*由来、*Rhizopus niveus*由来プロテアーゼの場合]）5mLを加え、直ちに振り混ぜ、37℃で30分間放置したことを除いて上述の酵素反応液と同様に操作した液（ブランク）について、吸光度ABを測定した。

[0080] 1分間にチロシン1μgに相当するフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を1単位（1U）とした。

1mg/mLチロシン標準原液（0.2mol/L塩酸）1mL、2mL、3mL及び4mLを量り、それぞれに0.2mol/L塩酸試液を加え、100mLとした。それぞれの液2mLを量り、0.55mol/L炭酸ナトリウム試液5mL及びフォリン試液（1→3）1mLを加え、直ちに振り混ぜ、37℃で30分間放置した。これらの液につき、0.2mol/L塩酸試液2mLを量り上記と同様に操作して得た液を対照とし、波長660nm

mにおける吸光度 A_1 , A_2 , A_3 及び A_4 を測定した。縦軸に吸光度 A_1 , A_2 , A_3 及び A_4 を、横軸にそれぞれの液 2 mL 中のチロシン量 (μg) をとり、検量線を作成し、吸光度差 1 に対するチロシン量 (μg) を求めた。

[0081] [数1]

$$\text{プロテアーゼ活性(U/g, U/mL)} = (AT - AB) \times F \times 11/2 \times 1/10 \times 1/M$$

AT : 酵素反応液の吸光度

AB : ブランクの吸光度

F : チロシン検量線より求めた吸光度差が1のときのチロシン量(μg)

11/2 : 反応停止後のトータル液量への換算係数

1/10 : 反応時間1分当たりへの換算係数

M : 試料溶液1mL中の試料の量(g又はmL)

[0082] (1-2) ペプチダーゼ活性値測定法

酵素を適量量り、pH 7.0 のリン酸緩衝液 (0.01 mol/L) を加えて溶解若しくは均一に分散して 50 mL としたもの又はこれを更に緩衝液を用いて 10 倍、100 倍若しくは 1000 倍に希釈したものを試料液とした。L-ロイシル-p-ニトロアニリド塩酸塩を 40 mg 量り、pH 7.0 のリン酸緩衝液 (0.01 mol/L、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸亜鉛含有) を加えて溶かし、100 mL としたものを基質溶液とした。

[0083] 基質溶液 2 mL を量り、37℃で5分間加温した後、試料液 0.5 mL を加えて振り混ぜ、同温度で15分間加温した。0.2 mol/L 塩酸を 2.5 mL 加え混合し、反応を停止させ、検液とした。別に試料液の代わりに pH 7.0 のリン酸緩衝液 (0.01 mol/L) 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、波長 405 nm における吸光度を測定するとき、検液の吸光度は、比較液の吸光度よりも大きい。なお、吸光度を測定する検液及び比較液に濁りがある場合には、遠心分離を行い、上澄液について測定した。1 分間に 1 μmol の p-ニトロアニリンを生成する活性を 1 単位 (1 U) とした。

[0084]

[数2]

$$\text{ペプチダーゼ活性(U/g,U/mL)} = (\text{AT}-\text{AB}) \times F \times (1/0.5) \times (1/15) \times N$$

AT：酵素反応液の吸光度

AB：酵素ブランク液の吸光度

F：検量線より求めた吸光度差が1のときのp-ニトロアニリン量(μmol)

0.5：酵素液量(mL)

15：反応時間(分)

N：希釈倍数

[0085] (2) プロテイングルタミナーゼ活性値測定法

30 mM Z-Gln-Glyを含む0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.5) 1 mLにプロテイングルタミナーゼを含む試料溶液0.1 mLを添加して、37℃、10分間放置した後、0.4 M TCA溶液を1 mL加えて反応を停止した。ブランクとして、30 mM Z-Gln-Glyを含む0.2 Mリン酸バッファー (pH 6.5) 1 mLに0.4 M TCA試液を1 mL加え、さらにプロテイングルタミナーゼを含む試料溶液0.1 mLを添加して、37℃で10分間放置した。

前記で得られた溶液についてアンモニアテストワコー（富士フイルム和光純薬）を用い、反応液中に生じたアンモニア量の測定を行った。アンモニア標準液（塩化アンモニウム）を用いて作成したアンモニア濃度と吸光度（630 nm）との関係を表す検量線より、反応液中のアンモニア濃度を求めた。

[0086] プロテイングルタミナーゼ（PG）の活性を、1分間に1 μmolのアンモニアを生成する酵素量を1単位（1 U）とし、以下の式から算出した。式中、反応液量は2.1、酵素溶液量は0.1、Dfは酵素溶液の希釈倍率である。また、17.03はアンモニアの分子量である。

[数3]

PG活性(U/mL)

$$= \text{反応液中のアンモニア濃度(mg/L)} \times (1/17.03) \times (\text{反応液量/酵素溶液量}) \times (1/10) \times Df$$

[0087] (3) グルタミナーゼ活性値測定法

酵素を適量量り、酢酸緩衝液（ 0.01 mol/L 、 $\text{pH} 6.0$ 、ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル含有）を加えて溶解若しくは均一に分散して 50 mL としたもの又はこれを更に同緩衝液を用いて10倍若しくは100倍に希釈したものを試料液とした。

[0088] L-グルタミン 2.0 g を量り、水 70 mL を加えて溶かし、 $\text{pH} 6.0$ の酢酸緩衝液（ 1 mol/L ） 10 mL を加え、水を加えて 100 mL としたものを基質溶液とした。試料液 1 mL を量り、 37°C の水浴中で5分間加温し、あらかじめ 37°C に加温した基質溶液 1 mL を加えて、直ちに振り混ぜ、更に 37°C で10分間加温した後、過塩素酸（ $83 \rightarrow 1000$ ） 1 mL を加えて振り混ぜ、直ちに氷水中で1分間以上冷却した。ただし、過塩素酸は質量分率 60% のものを用いた。この液に水酸化ナトリウム溶液（ $3 \rightarrow 100$ ） 1 mL を加えて振り混ぜ、検液とした。別に試料液 1 mL を量り、過塩素酸（ $83 \rightarrow 1000$ ） 1 mL を加えて振り混ぜ、 37°C の水浴中で5分間加温した後、基質溶液 1 mL を加えて振り混ぜ、氷水中で1分間以上冷却した。この液に水酸化ナトリウム溶液（ $3 \rightarrow 100$ ） 1 mL を加えて振り混ぜ、比較液とした。L-グルタミン酸測定キット（ヤマサ醤油製）を用いて、波長 555 nm における吸光度を測定するとき、検液を加えて得られた液の吸光度は、比較液を加えて得られた液の吸光度より大きい。なお、吸光度を測定する検液及び比較液に濁りがある場合には、遠心分離を行い、上澄液について測定した。1分間に $1\text{ }\mu\text{mol}$ のL-グルタミン酸を生成する酵素量を1単位（ 1 GTU ）とした。

[0089]

[数4]

グルタミナーゼ活性(GTU/g, GTU/mL) = [(AS-ASB) · (AR-ARB)] × 250 × 4 × 1/147 × 1/10 × n

AS : 反応溶液吸光度

ASB : ブランク溶液吸光度

AR : L-グルタミン酸標準溶液(250mg/L)の吸光度

ARB : 水ブランク液吸光度

250 : L-グルタミン酸標準溶液濃度(mg/L)

4 : 反応総液量(mL)

147 : L-グルタミン酸分子量

10 : 反応時間 (分)

n : 試料希釈倍数

[0090] (4) α-アミラーゼ活性値測定法

1 重量%バレイショデンプン基質溶液 (0.1 mol/L 酢酸 (pH 5.0)) 10 mL を 37℃ で 10 分間加温した後、α-アミラーゼを含む試料溶液 1 mL を加え、直ちに振り混ぜた。この液を 37℃ で 10 分間放置した後、この液 1 mL を 0.1 mol/L 塩酸試液 10 mL に加え、直ちに振り混ぜた。次に、この液 0.5 mL を量り、0.0002 mol/L ヨウ素試液 (日局) 10 mL を加え、振り混ぜた後、水を対照とし、波長 660 nm における吸光度 (AT) を測定した。別に、試料溶液の代わりに水 1 mL を加えて同様に操作し、吸光度 (AB) を測定した。1 分間にバレイショデンプンのヨウ素による呈色を 10% 減少させる酵素量を 1 単位 (1 U) とした。

[0091] [数5]

α-アミラーゼ活性(U/g, U/mL) = (AB-AT)/AB × 1/W

AT: 反応液の吸光度

AB : ブランク液の吸光度

W : 試料溶液 1 mL 中の試料の量 (g 又は mL)

[0092] [予備試験例]

(1) 実験方法

10 mL の液状の植物性タンパク質含有組成物 (10 重量%植物性タンパク質材料) (pH 6~7 (25℃)) に対して、植物性タンパク質材料 100 重量部当たり 3 重量部のタンパク質分解酵素と 0.3 重量部の PG とを添加した。対照実験として、植物性タンパク質材料 100 重量部当たり 3 重量

部のタンパク質分解酵素のみの試験画分を準備した。50℃で170rpmの振とうにより2時間反応させた。反応後、煮沸にて酵素を失活させ、室温まで冷却することで、加工植物性タンパク質含有液状組成物を得た。

[0093] (2) 遊離アミノ態窒素量 (FAN) 測定

得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物を15,000rpmにて5分間遠心分離し、上清を得た。上清を所定の倍率で希釈し、1.0mL希釈液に対してニンヒドリン試薬pH6.7 (10%Na₂HPO₄/12H₂O、6%KH₂PO₄、0.50%ニンヒドリン、0.30%フルクトース)を0.5mL添加した。混合後、16分間煮沸し、570nmの吸光度を測定した。タンパク質分解酵素とPGを用いた場合に得られた遊離アミノ態窒素量を、対照実験 (PGを用いなかったことを除いて同様に行った実験) で得られた遊離アミノ態窒素量を1とした場合の相対値として導出した。結果を表2に示す。

[0094] (3) 実験結果

[表2]

植物性タンパク質原料	参考例 1	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例	参考例
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
穀類由来	Aspergillus niger由来 フロアールゼ	6,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rhizopus niveus由来 フロアールゼ	-	1,200	1,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aspergillus oryzae由来 フロアールゼ	-	-	-	1,200	1,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aspergillus melleus由来 フロアールゼ	-	-	-	-	-	9,000	9,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bacillus amyloliquefaciens由来 フロアールゼ	-	-	-	-	-	-	-	2,100	2,100	-	-	-	-	-	-	-
	Bacillus licheniformis由来 フロアールゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,400	2,400	-	-	-	-	-
	Geobacillus stearothermophilus由来 フロアールゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,700	2,700	-	-	-
	Aspergillus oryzae由来 ベチダールゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	42	42
	PG	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	大豆	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-
豆科植物由来	エンドウ	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%
	遊離アミノ酸含量の相対値 (PG不使用の場合の遊離アミノ酸含量を1とする相対値)	1.7	1.9	1.1	1.2	3.2	3.4	2.5	2.6	1.1	1.2	1.2	1.3	1.3	1.4	3.5	3.7

表中、酵素の使用量は、植物性タンパク質原料 1 g 当たりの活性値 (U/g) で示される。

[0095] 表2に示す通り、タンパク質分解酵素を単独で用いた場合に比べ、タンパク質分解酵素とプロテイングルタミナーゼとを併用することで、相対遊離アミノ態窒素量が高くなることが判明した。つまり、プロテイングルタミナーゼにより、タンパク質分解酵素の反応性が向上することが判明した。特に、タンパク質分解酵素として、*Aspergillus niger*由来、*Rhizopus niveus*由来、*Aspergillus oryzae*由来、*Aspergillus melleus*由来プロテアーゼ、*Aspergillus oryzae*由来ペプチダーゼを用いた場合に、相対遊離アミノ態窒素量の増加が顕著であった。また、相対遊離アミノ態窒素量の増加は、大豆タンパク及びエンドウタンパクのいずれにおいても認められた。

[0096] さらに、液状の植物性タンパク質含有組成物を、水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料に変更して同様の操作を行った場合も、相対遊離アミノ態窒素量の増加が認められた。

[0097] [試験例1]

(1) 実験方法

表3に示す酵素を表示の量 (*R. oryzae*由来ペプチダーゼのみ植物性タンパク質材料100重量部当たり0.3重量部、その他のタンパク質分解酵素は植物性タンパク質材料100重量部当たり3重量部に相当) で用いたことを除いて、上記予備試験例の(1)と同様にして、液状の植物性タンパク質含有組成物に対して各種酵素を用いて処理を行い、加工植物性タンパク質含有液状組成物を得た。

[0098] (2) 遊離アミノ酸分析

得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物を15,000rpmにて5分間遠心分離し、上清を、フィルター(0.45 μ m)ろ過した後、アミノ酸分析装置(Agilent 1260 Infinity II LCシステムを用いたアミノ酸分析)にて、当該プロトコルに従って遊離アミノ酸量を分析した。タンパク質分解酵素とPGを用いた場合に得られた遊離グルタミ

ン酸量を、対照実験（P Gを用いなかったことを除いて同様に行った実験）で得られた遊離グルタミン酸量を 1 とした場合の相対値として導出した。結果を表 3 に示す。

[0099] （３）食感評価

得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物を、訓練されたパネリストにより、食感（具体的には舌触り）を、酵素処理を行わなかったことを除いて同様に処理した植物性タンパク質含有液状組成物のざらついた舌ざわりを 1 点、ほぼざらつきが認められなくなるほどになめらかな舌ざわりを 10 点とする V A S に基づいて評点した。結果を表 3 に示す。なお、表 3 においては、得られた評点（評点 A とする）を、対照実験（P Gを用いなかったことを除いて同様に行った実験）で得られた評点（評点 B とする）と並べて、評点 A ／評点 B の形式で示す。

[0100] （４）実験結果

[表3]

	実施例 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
使用菌類	Aspergillus niger由来 フロアーズ	6,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rhizopus niveus由来 フロアーズ	-	1,200	1,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aspergillus oryzae由来 フロアーズ	-	-	-	1,200	1,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aspergillus mellesius由来 フロアーズ	-	-	-	-	-	9,000	9,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bacillus amyloliquefaciens由来 フロアーズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,100	2,100	-	-	-	-
	Bacillus licheniformis由来 フロアーズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,400	2,400	-	-
	Geobacillus stearothermophilus由来 フロアーズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,700	2,700
	Aspergillus oryzae由来 ベジターゼ	-	-	-	-	-	-	-	42	42	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rhizopus oryzae由来 ベジターゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	PG	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
植物性タンパク質	大豆	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-
	エンドウ	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-	10wt%	-
	遊離グルタミン酸 (PG不使用の場合の遊離グルタミン酸 量を1とする相対値)	1.69	1.12	1.33	1.23	1.57	1.3	1.19	1.48	1.43	2.65	2.38	2.62	2.26	4.85	2.19	3.28	2.28
食料改質剤A (実施例による評価/PG不使用の場合の 評価)		8/4	6/3	7/5	5/2	10/5	9/5	9/4	10/5	9/4			7/4	6/3	7/4	4/2	7/6	7/3

表中、酵素の使用量は、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの活性値(U/g)で示される。

[0101] 表3に示す通り、タンパク質分解酵素を単独で用いた場合に比べ、タンパク質分解酵素とプロテイングルタミナーゼとを併用することで、相対遊離グルタミン酸量が高くなることが認められた。特に、*Rhizopus oryzae*由来ペプチダーゼを用いた場合に、相対遊離グルタミン酸量の増加が各段顕著であった。また、相対遊離グルタミン酸量の増加は、大豆タンパク及びエンドウタンパクのいずれにおいても認められた。なお、実施例で得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物を、訓練されたパネリストにより呈味の官能評価を行ったところ、いずれも、PGを用いなかった場合に比べて苦味が低減していることが認められた。

[0102] また、表3に示すとおり、タンパク質分解酵素を単独で用いた場合に比べ、タンパク質分解酵素とプロテイングルタミナーゼとを併用することで、加工植物性タンパク質含有液状組成物の食感の向上効果も認められた。

[0103] さらに、液状の植物性タンパク質含有組成物を、水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料に変更して同様の操作を行った場合も、相対遊離グルタミン酸量の増加が認められた。

[0104] [試験例2]

使用酵素及び植物性タンパク質材料の組み合わせとして表4及び表5に示すものに変更し、実施例31～33及び46～48に関しては植物性タンパク質材料を α -アミラーゼによる前処理を経た（具体的には、液状の植物性タンパク質含有組成物（10重量%の植物性タンパク質材料）に対して、植物性タンパク質材料1g当たり6.5Uとなる量の α -アミラーゼを加えて70℃で0.5時間処理をし、50℃まで冷却した）ものに変更したことを除いて、試験例1の（1）と同様にして加工植物性タンパク質含有液状組成物を得た。

[0105] 得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物について、試験例1の（2）と同様にして遊離グルタミン酸量（絶対値）を測定し、遊離グルタミン酸量の相対値を導出した。結果を表4及び表5に示す。

[0106] なお、表4及び表5に示す実施例のうち、実施例24、39について、遊

離グルタミン酸量の相対値及び絶対値を、プロテイングルタミナーゼを用いないことを除いて同様に処理して得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物である比較例（比較例 1， 3）、及びプロテイングルタミナーゼの代わりにグルタミナーゼを用いたことを除いて同様に処理して得られた加工植物性タンパク質含有液状組成物である比較例（比較例 2， 4）と対比した。結果を表 6 に示す。

[0107]

[表4]

菌株名	実施例	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Aspergillus oryzae由来 プロテアーゼ	PG	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
	ソラマメ	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リョクトウ	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ヒヨコマメ	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	レンズマメ	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ルピンマメ	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	グルテン(コムギ)	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オート	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-
	コム	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-
	ゼイン(トウモロコシ)	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-
	アーモンド	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-
	ヘンダシード	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-
	チアシード	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-
	ライ麦	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-
	大麥	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-
遊離グルタミン酸量相対値 (PG不使用の場合の遊離グルタミン酸量を1とする相対値)	ソルガム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%
		1.23	1.18	2.04	1.57	1.46	9.02	5.14	1.87	9.96	1.87	1.47	1.37	2.05	1.92	3.17

表中、酵素の使用量は、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの活性値(U/g)で示される。

[0108] [表5]

	実施例	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	実施例
Aspergillus oryzae由来 ベニチダ-ゼ		42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	48
	PG	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
植物性タンパク質由来	ソラマメ	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リョクトウ	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ヒヨコマメ	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	レンズマメ	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ルピンマメ	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	グルテン(コムギ)	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オート	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-	-
	コム	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-	-
	ゼイン(トウモロコシ)	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-	-
	アーモンド	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-	-
	ヘンダシード	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-	-
	チャシード	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-	-
	ライ麦	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-	-
	大麦	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%	-
	ソルガム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10wt%
逆離グルタミン酸量相対値 (PG不使用の場合の逆離グルタミン酸量を1とする相対値)		1.36	1.22	1.9	1.36	1.65	9.83	4.19	2.07	8.89	2.07	1.66	1.5	2.01	2.27	3.03

表中、酵素の使用量は、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの活生値(U/g)で示される。

[0109] [表6]

		比較例 1	比較例 2	実施例 24	比較例 3	比較例 4	実施例 39
使用酵素	Aspergillus oryzae由来 プロテアーゼ	1,200U/g	1,200U/g	1,200U/g	-	-	-
	Aspergillus oryzae由来 ペプチダーゼ	-	-	-	42U/g	42U/g	42U/g
	Bacillus amyloliquefaciens 由来グルタミナーゼ	-	0.3GTU/g	-	-	0.3GTU/g	-
	PG	-	-	1.5U/g	-	-	1.5U/g
植物性タン パク質材料	グルテン(コムギ)	10wt%	10wt%	10wt%	10wt%	10wt%	10wt%
遊離グルタミン酸量相対値 (PG,グルタミナーゼ不使用の場合の遊離グルタ ミン酸量を1とする相対値)		1	5.13	9.02	1	5.84	9.83
遊離グルタミン酸量絶対値		0.12mM	0.62mM	1.08mM	0.16mM	0.93mM	1.57mM

表中、酵素の使用量は、植物性タンパク質材料 1 g 当たりの活性値で示される。

[0110] 表4及び表5に示すとおり、全ての植物性タンパク質材料において、遊離グルタミン酸量の増加が認められた。また、表6に示す通り、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを併用して植物性タンパク質材料を処理すると、加工植物性タンパク質材料中の遊離グルタミン酸量が顕著に増大し、その程度は、加工植物性タンパク質含有液状組成物の苦味を低減するだけでなく、うま味を付与するのにも十分な程度であった。

[0111] [試験例3]

水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料 25 g に対して、10 mL の水、5 mL のオリーブオイル、メチルセルロース（最終濃度 2 質量%）、及び表7に記載の酵素を表示の量で混合し、パティの形状に成型し、50℃にて1時間インキュベートすることで、組織化植物性タンパク質含有食品（調味後、焼成前）を得た。

[0112] 組織化植物性タンパク質含有食品（調味後、焼成前）を、150℃で10分間焼成することで、パティ形状の組織化植物性タンパク質含有食品（焼成後）を得た。得られた食品を、味覚センサー（Intelligent Sensor Technology, Inc. 社製）によるうま味測定と、訓練されたパネリスト6名による官能評価とを行い、うま味スコアを得た。官能評価では、以下の分類に基づいてうま味の程度を評点し、平均値をうま味スコアとした。結果を表7に示す。

2点：比較例5の食品よりかなり強い

1点：比較例5の食品よりやや強い

0点：比較例5の食品と同等

－1点：比較例5の食品よりやや弱い

－2点：比較例5の食品よりかなり弱い

[0113] [表7]

		比較例 5	比較例 6	比較例 7	比較例 8	実施例 40
使用酵素	Aspergillus oryzae由来 ペプチダーゼ	-	16.8U/g	-		16.8U/g
	Bacillus amyloliquefaciens 由来グルタミナーゼ	-	-	0.12GTU/g	-	-
	PG	-	-	-	0.6U/g	0.6U/g
うま味スコア（味覚センサ）			0.34	-0.12	0.08	1.87
うま味スコア（官能評価）		0	0.4	0	0	1.8

表中、酵素の使用量は、水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料1g当たりの活性値で示される。

[0114] 表7に示される通り、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを併用して植物性タンパク質材料を処理することで得られた食品（実施例40）のうま味が増大したことから、当該食品において遊離グルタミン酸量が顕著に増大したことが類推できる。

[0115] [試験例4]

水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料25gに対して、10mLの水、5mLのオリーブオイル、メチルセルロース（最終濃度2質量%）、及び表8に記載の酵素を表示の量で混合し、パティの形状に成型し、50℃にて1時間インキュベートすることで、組織化植物性タンパク質含有食品（調味後、焼成前）を得た。

[0116] 組織化植物性タンパク質含有食品（調味後、焼成前）を、150℃で10分間焼成することで、パティ形状の組織化植物性タンパク質含有食品（焼成後）を得た。得られた食品を、訓練されたパネリスト6名による官能評価を行い、苦味スコアを得た。官能評価では、以下の分類に基づいて苦味の程度

を評点し、平均値を苦味スコアとした。結果を表 8 に示す。

2 点：比較例 5 の食品よりかなり強い

1 点：比較例 5 の食品よりやや強い

0 点：比較例 5 の食品と同等

－ 1 点：比較例 5 の食品よりやや弱い

－ 2 点：比較例 5 の食品よりかなり弱い

[0117] [表8]

		比較例 5	比較例 6	比較例 9	実施例 40
使用酵素	Aspergillus oryzae由来 ペプチダーゼ	-	16.8U/g	16.8U/g	16.8U/g
	Bacillus amyloliquefaciens 由来グルタミナーゼ	-	-	0.12GTU/g	-
	PG	-	-	-	0.6U/g
苦味スコア（官能評価）		0	1.6	1.0	0.4

表中、酵素の使用量は、水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料 1 g 当たりの活性値で示される。

[0118] 表 8 に示される通り、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを併用して植物性タンパク質材料を処理することで得られた食品（実施例 40）の苦味が抑制されたことから、当該食品における遊離グルタミン酸量の増大が、加水分解による苦味の発生を効果的に抑制できるほどに顕著であったことが類推できる。

請求の範囲

- [請求項1] 植物性タンパク質含有組成物を、タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼで処理する工程を含む、加工植物性タンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項2] 前記タンパク質分解酵素がプロテアーゼ及び／又はペプチダーゼである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記プロテアーゼを、前記植物性タンパク質1g当たり110U以上用いる、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記プロテアーゼが糸状菌由来プロテアーゼである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記プロテアーゼが、アスペルギルス属及び／又はリゾプス属由来のプロテアーゼである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記プロテアーゼが、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガ、アスペルギルス・メレウス、及びリゾプス・ニベウス由来のプロテアーゼからなる群より選択される、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記プロテアーゼが、細菌由来プロテアーゼである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス属及び／又はジオバチルス属由来のプロテアーゼである、請求項7に記載の製造方法。
- [請求項9] 前記細菌由来プロテアーゼが、バチルス・ステアロサーモフィラス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・アミロリケファシエンス及びこれらのジオバチルス属由来のプロテアーゼからなる群より選択される、請求項7に記載の製造方法。
- [請求項10] 前記タンパク質分解酵素が、細菌由来プロテアーゼ及び糸状菌由来ペプチダーゼである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項11] 前記ペプチダーゼが、リゾプス属及び／又はアスペルギルス属由来のペプチダーゼである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項12] 前記植物性タンパク質が、豆類、穀類、ナッツ類及び種子類からな

る群より選択される植物のタンパク質である、請求項 1 に記載の製造方法。

[請求項13] 前記植物性タンパク質含有組成物が液状である、請求項 1 に記載の製造方法。

[請求項14] 前記植物性タンパク質含有組成物が水で膨潤させた組織化植物性タンパク質材料である、請求項 1 に記載の製造方法。

[請求項15] タンパク質分解酵素及びプロテイングルタミナーゼを含む、植物性タンパク質含有組成物の遊離グルタミン酸量向上剤。

[請求項16] 請求項 1 に記載の製造方法によって得られる、植物性タンパク質含有飲食品。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A23J 3/34**(2006.01)i; **A23J 3/14**(2006.01)i; **A23L 33/185**(2016.01)i; **C12P 21/06**(2006.01)i

FI: A23J3/34; A23J3/14; C12P21/06; A23L33/185

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)

A23J3/34; A23J3/14; A23L33/185; C12P21/06

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/201277 A1 (AMANO ENZYME INC.) 07 October 2021 (2021-10-07) examples, paragraph [0013]	1-16
X	WO 2021/251344 A1 (AMANO ENZYME INC.) 16 December 2021 (2021-12-16) claims, paragraph [0018]	1-16
X	WO 2022/014542 A1 (AMANO ENZYME INC.) 20 January 2022 (2022-01-20) examples, paragraph [0011]	1-16
P, X	WO 2022/102723 A1 (AMANO ENZYME INC.) 19 May 2022 (2022-05-19) examples, claims	1-16
P, X	WO 2022/215688 A1 (AMANO ENZYME EUROPE LTD) 13 October 2022 (2022-10-13) examples, claims	1-16

☐ 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

19 June 2023

Date of mailing of the international search report

04 July 2023

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/018009

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/201277	A1	07 October 2021	EP 4130286 A1 examples, paragraph [0013] CN 115380116 A	
WO	2021/251344	A1	16 December 2021	(Family: none)	
WO	2022/014542	A1	20 January 2022	CN 115715156 A examples, paragraph [0011]	
WO	2022/102723	A1	19 May 2022	(Family: none)	
WO	2022/215688	A1	13 October 2022	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A23J 3/34(2006.01)i; A23J 3/14(2006.01)i; A23L 33/185(2016.01)i; C12P 21/06(2006.01)i FI: A23J3/34; A23J3/14; C12P21/06; A23L33/185										
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）） A23J3/34; A23J3/14; A23L33/185; C12P21/06										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023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 (JDreamII); FSTA/CAplus/AGRICOLA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	WO 2021/201277 A1 (天野エンザイム株式会社) 07.10.2021 (2021 - 10 - 07) 実施例、[0013]	1-16								
X	WO 2021/251344 A1 (天野エンザイム株式会社) 16.12.2021 (2021 - 12 - 16) 請求項、[0018]	1-16								
X	WO 2022/014542 A1 (天野エンザイム株式会社) 20.01.2022 (2022 - 01 - 20) 実施例、[0011]	1-16								
P, X	WO 2022/102723 A1 (天野エンザイム株式会社) 19.05.2022 (2022 - 05 - 19) 実施例、請求項	1-16								
P, X	WO 2022/215688 A1 (アマノ エンザイム ヨーロッパ リミテッド) 13.10.2022 (2022 - 10 - 13) 実施例、請求項	1-16								
☐ 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。										
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> “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 </td> </tr> </table>			* 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						
* 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 19.06.2023		国際調査報告の発送日 04.07.2023								
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								

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/JP2023/018009

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/201277	A1	07.10.2021	EP	4130286	A1	
				Examples, [0013]			
				CN	115380116	A	
WO	2021/251344	A1	16.12.2021	(ファミリーなし)			
WO	2022/014542	A1	20.01.2022	CN	115715156	A	
				実施例、[0011]			
WO	2022/102723	A1	19.05.2022	(ファミリーなし)			
WO	2022/215688	A1	13.10.2022	(ファミリーなし)			