

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6236319号
(P6236319)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int. Cl.		F I	
A 2 3 C	9/13	(2006.01)	A 2 3 C 9/13
A 2 3 C	19/02	(2006.01)	A 2 3 C 19/02
A 2 3 C	11/10	(2006.01)	A 2 3 C 11/10

請求項の数 5 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2013-539300 (P2013-539300)	(73) 特許権者	503260310
(86) (22) 出願日	平成23年11月23日(2011.11.23)		セーホーエル、ハンセン アクティーゼルス
(65) 公表番号	特表2013-542741 (P2013-542741A)		スカブ
(43) 公表日	平成25年11月28日(2013.11.28)		デンマーク国、デーコー-2970 ヘル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/070835		ルスホルム、バイエ アレ 10-12
(87) 国際公開番号	W02012/069546	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成24年5月31日(2012.5.31)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成26年10月3日(2014.10.3)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	10192207.8		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成22年11月23日(2010.11.23)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳製品の調製におけるグリコシダーゼの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物由来の乳のヨーグルトを生産するための方法であって、

a) 動物由来の乳を提供し；

b) ペプチド - N (4) - (N - アセチル - ベータ - グルコサミニル) アスパラギンアミダーゼ (EC 番号 : 3 . 5 . 1 . 5 2 ; 別名 : N - グリコシダーゼ - F 又は PNGase - F) 及びエンド - N - アセチルグルコサミニダーゼ H (EC 番号 : 3 . 2 . 1 . 9 6 ; 別名 ENDO - H) からなる群から選択される少なくとも一つの N - 結合型グリコシダーゼを用いて当該乳を処理し；そして

c) ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus)、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス (Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus)、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis)、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris)、リューコノストック・メゼンテロイデス亜種クレモリス (Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris)、シュードリューコノストック・メゼンテロイデス亜種クレモリス (Pseudoleuconostoc mesenteroides subsp. cremoris)、ペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス次亜種ジアセチラクティス (Lactococcus

10

20

us lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis)、ラクトバチルス・カゼイ亜種カゼイ(Lactobacillus casei subsp. Casei)、ラクトバチルス・パラカゼイ亜種パラカゼイ(Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei)、ビフィドバクテリウム・ビフィドウム(Bifidobacterium bifidum)及びビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum)からなる群から選択される種に属する微生物を用いて当該乳を発酵させることを含む、方法。

【請求項2】

工程b)が、工程c)の前、又は間に行なわれる、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記動物由来の乳が、ウシ、ヒツジ(sheep)、雌ヒツジ(ewes)、ヤギ、バツファロー又はラクダ由来である、請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の方法により得られるヨーグルト。

【請求項5】

動物由来の乳のヨーグルトを生産するための方法であって、

(i) : 動物由来の乳に、当該動物由来の乳のゲル硬度を増加させる量のO-結合型グリコシダーゼを添加する工程 ; 及び

(ii) : O-結合型グリコシダーゼが当該動物由来の乳のゲル硬度を増加させる条件下でヨーグルトを取得する工程 ;

20

を含み、当該O-結合型グリコシダーゼが、-N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ(EC番号: 3.2.1.49; 別名: GalNAC)である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、有効量のN-結合型グリコシダーゼ及び/又はO-結合型グリコシダーゼを乳に添加することを含む、乳製品(例えばヨーグルト)を製造するための方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

背景技術

乳製品、例えば、発酵乳製品(例えば、ヨーグルト)は、当該技術分野においてよく知られている。

【0003】

当該技術分野において知られているように、粘性、及びゲル硬度などの特性は、関連する乳製品にとって重要な特性である。

【0004】

一般的に言えば、同一の乳組成物を用いてより高い粘性及び/又はゲル硬度を作り出すことができる場合、より少ない乳(又は他の固体)を用いて同一の粘性/ゲル硬度を作り出すことができ、従って、原料を節約する(あるいはより高い収率を得る)ことができる。

40

【0005】

低脂肪発酵乳製品、例えば低脂肪ヨーグルトについて、製品の最適な好ましいテクスチャを得ることは困難であり、より正確には、前記課題は、例えばかかる低脂肪製品において十分に高いテクスチャ粘性を得ることである。

【0006】

タンパク質、典型的には脱脂乳、又は乳清に基づくタンパク質の添加は、低脂肪ヨーグルトにおけるテクスチャを改良するための標準的手段としてみられる。しかしながら、このような解決策は、コストがかかり、添加されたタンパク質はまた全エネルギー含量に寄

50

与するので、低脂肪 / 低カロリー製品のコンセプトに完全には適合しない。

【 0 0 0 7 】

テクスチャの改良に関して、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 9 5 3 1 6 A 1 号明細書の段落 [0 0 0 5] は、いわゆるテクスチャリング剤 (増粘剤、ゲル化剤)、例えばでんぷん、ペクチン、又はゼラチンを添加することを記載する。しかしながら、知られているように、例えばヨーグルト製品において、例えば余分なペクチン又はゼラチンを有することは、好ましくない。

【 0 0 0 8 】

近年のいわゆるテクスチャリング培養物の中でも、細胞外多糖 (E P S) 産生に基づくものは、かかる低脂肪乳製品の粘性を著しく向上させ、例えば国際公開 2 0 0 7 / 0 9 5 9 5 8 A 1 号 (Chr. Hansen A/S) は、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) の株が、発酵乳製品に所望の「ねばねばする」あるいは粘着性のテクスチャを与えることができる E P S を合成することを記載する。

10

【 0 0 0 9 】

従って、例えば低脂肪ヨーグルトについてのテクスチャ粘性に関する課題は、今日、例えばこれらの E P C 産生培養物の使用によりほぼ解決されるとも言うことができる。

【 0 0 1 0 】

しかしながら、A.N. Hassanらの論文 (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003) に記載されるように、いわゆるゲル硬度は、かかる E P S 生産培養物を用いる場合、E P S 非生産培養物と比較して、著しく減少し得る。

20

【 0 0 1 1 】

従って、今日の状況において、例えば低脂肪ヨーグルト製品が有する従来の粘性の課題は、E P C 産生培養物の使用により本質的に解決されているとも言えるが、しかしながら、E P S 培養物の使用は、減少したゲル硬度に関する新たな課題を「作り出している」。

【 0 0 1 2 】

A.N. Hassanらの論文では、要約において低い粘弾性係数に言及しており、当業者に知られているように、この粘弾性係数の特徴は、製品が低い粘弾性係数を有する場合、これが低いゲル硬度を有するという意味で、ゲル硬度に関する。論文の図 1 は、E P S ヨーグルトの剪断応力がより高くなり、当業者に直接的により高い粘性に変換することを示す。

【 0 0 1 3 】

上述のように、乳製品、一般的には例えば発酵乳製品 (例えば、ヨーグルト) にとって、いわゆるゲル硬度は、大変に関連性のある性質である。

30

【 0 0 1 4 】

例えば、低いゲル硬度は、乳製品に望ましくない食感を与え得る。さらに、例えばヨーグルトが低いゲル硬度を有する場合、これは薄くみえ、例えばスプーン又は例えばボウル上から容易にこぼれる。さらに、例えばヨーグルトが低いゲル硬度を有する場合、乳性分離のために、これはシネレシス (下記を参照) を生じやすい。

【 0 0 1 5 】

当該技術分野においてよく知られているように、乳凝固酵素、例えばプロテアーゼであるキモシン (別名レンニン) は、チーズを製造するために用いられ、キモシンは、凝固及びカード形成を引き起す。よく知られているように、チーズの製造は、全てが乳凝固酵素の添加の結果として生ずる三つの工程又は段階 : 1) 塊 (又はソフトゲル) の形成、凝固、又はこの塊の硬化、及び段階的な乳清の排除 (後者のプロセスは、シネレシスと称される) を含む。明らかのように、例えば、ヨーグルトを製造する場合、一般的にこのシネレシス効果、即ち、乳の固体カードと液体乳清への分離を生じることに関心をもたれない。従って、キモシンのような乳凝固酵素の使用は、一般的に、例えばヨーグルトを製造したい場合、好まれない。

40

【 0 0 1 6 】

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 9 5 3 1 7 A 1 号明細書 (Danone) は、発酵乳製品、例えばヨーグルトの生産におけるカップ - カゼイン分解活性を有するプロテアーゼの使

50

用を記載する。前記プロテアーゼは、例えばキモシンでもよい（例えば、前記米国特許出願の[0028]を参照のこと）。前記プロテアーゼ（例えば、キモシン）は、乳中のカゼインを加水分解し、従って、プロテアーゼ（例えば、キモシン）が、ヨーグルト生産にとって望ましくないシネレシス効果を生じさせ得ると、一見したところ思える。しかしながら、段落[0008]は、驚くべきことに、そして予測できないことに、プロテアーゼ、例えばキモシンの使用が、「かかる発酵乳製品にとって許容されないシネレシスを誘導する結果を生ずることなく、テクスチャを改良し、そして特にヨーグルト及び発酵乳の粘性を増加させる」ことを示したことを説明する。

【0017】

米国特許出願公開第2005/0095316A1号明細書（Danone）は、本質的に、
上述の米国特許出願公開第2005/0095317A1号明細書（Danone）における同様の技術的教示に関するが、しかしながら、この米国出願において、関連するプロテアーゼは、細菌プロテアーゼとして定義される（キモシンは、ウシ由来であり、即ちこれは、細菌プロテアーゼではない）。

10

【0018】

米国特許第7560127B2号明細書（DSM）は、チーズ生産における特別な脱グリコシル化酵素の使用を記載する。脱グリコシル化酵素は、乳中に存在するカップカゼイン（ κ -カゼイン）を脱グリコシル化することができる酵素として定義される。後述のように、カゼインはいわゆるO-結合型グリコシル化を有するタンパク質である。従って、この米国特許において言及される脱グリコシル化酵素は、O-結合型グリコシル化タンパク質、例えばカップカゼイン（カップカゼインは、いわゆるO-結合型糖タンパク質である）を脱グリコシル化することができる酵素である。前記米国特許は、1段、51～58行において、「これが、カゼインミセルを安定化する負の電荷を有する、 κ -カゼインと結合した糖であるので、 κ -カゼインの脱グリコシル化が凝固を導くことが、驚くべきことに発見された。この方法における乳の凝固は、 κ -カゼインの大部分がチーズ中に保持されるプロセスをもたらし、キモシンのタンパク質分解活性を用いることよりも、高い収率を得ることができる。」と記載している。

20

【0019】

手短に言えば、この米国特許第7560127B2号明細書は、キモシンの代わりに、言及されたO-結合型関連脱グリコシル化酵素を用いることにより、チーズ生産について要求される凝固が得られることを実質的に記載していると言える。この米国特許第7560127B2号明細書はチーズの生産に関し、そして請求項1においてプロテアーゼ（例えばキモシン）を用いることなくチーズを得ることができることを述べているので、当業者は、O-結合型関連脱グリコシル化酵素の使用が実質的な量のシネレシスを導くに違いないことを、明確に理解する。

30

【0020】

米国特許第7560127B2号明細書が、実質的な量のシネレシスを要求するチーズの生産に関することは、本明細書に関連する。結果として、当業者は、シネレシスが一般的に大変望ましくないヨーグルトのような発酵乳製品にこれを適用することを予測しない。

40

【0021】

さらに、米国特許第7560127B2号明細書は、本明細書に関連するゲル硬度特性について何ら明確に述べておらず、即ち、これは、キモシンの代わりに、記載されるO-結合型脱グリコシル化酵素を使用することに起因する凝固/シネレシス効果にのみ明確に関することと言える。

【0022】

E. Casesらの論文（Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410）は、O-結合型脱グリコシル化酵素（ノイラミニダーゼ；EC3.2.1.18）を用いて化学的に酸性化した乳の脱グリコシル化を記載する。前記乳は、化学物質であるGDLを用いて化学的に酸性化され（p. 2407, section “Acid milk coagulation”を参照

50

のこと)、従って、E. Casesらの論文は、関連する微生物を接種した「発酵乳」製品(例えば、ヨーグルト)を記載しない。

【0023】

E. Casesらの論文は、O-結合型脱グリコシル化酵素であるノイラミニダーゼ(EC3.2.1.18)の使用が、酵素的に処理した乳、及び化学的に酸性化した乳に、より高い最終ゲル硬度を与えることを記載する。

【0024】

E. Casesらの論文が、O-結合型脱グリコシル化酵素であるノイラミニダーゼ(EC3.2.1.18)を使用することの潜在的なシネシス効果に関して何ら述べられていないことは、本明細書に関連する。

10

【0025】

E. Casesらの論文では、用いられるノイラミニダーゼ(EC3.2.1.18)O-結合型脱グリコシル化酵素調製物の純度についての適切な証拠を提供していない。この観点において、これは、用いられる酵素調製物が、いくらかの関連するプロテアーゼ酵素活性を有し、このプロテアーゼ酵素活性が、記載されるゲル硬度効果の原因となり得ることを述べており、上述のように、米国特許出願公開第2005/0095317A1号明細書(Danone)は、プロテアーゼの使用がゲル硬度を改善し得ることを記載する。

【0026】

この疑念の関連性は、E. Casesらの論文(材料及び方法の欄を参照のこと)においてノイラミニダーゼが由来する微生物であるクロストリジウム・パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)が、140超のタンパク質分解酵素を有することが知られているという事実によりさらに強調される(例えば、信頼できるMeropsペプチダーゼデータベース(<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000283;type=peptidase>)を参照のこと)。

20

【0027】

提供される酵素調製物の純度に関する情報がないので、従って、E. Casesらの論文に記載されるゲル硬度に関してこれら自身に影響を与える全ての関連するタンパク質分解酵素の排除までこれが精製されないことは、大変に妥当であるように思われる。

【0028】

当該技術分野において知られるように、O-結合型脱グリコシル化酵素であるノイラミニダーゼ(EC3.2.1.18)はまた、いくらかのN-結合型グリコシダーゼ活性を有し得る。しかしながら、上述のE. Casesらの論文は、ノイラミニダーゼの本明細書に関連する酵素活性がE. Casesらの論文において述べられる場合、ノイラミニダーゼ(EC3.2.1.18)のO-結合型グリコシダーゼ活性についてのみ言及する。

30

【0029】

欧州特許第1489135A1号明細書は、酸性化した乳清乳及びヨーグルトの硬度を増加させるための脱グリコシル化オレウロペイン(オリーブ葉抽出物から得られる)の使用に関するものとして見るることができる。ベータ-グリコシダーゼ(ベータ-1,6-グルコシダーゼ)及びラクターゼは、この文書において、オレウロペインを脱グリコシル化するために「単に」用いられ、即ち、前記酵素は、本明細書において乳/ヨーグルトにおけるゲル硬度を増加させるための活性成分ではない。オレウロペインは、酵素活性を有するタンパク質/ペプチドではない。ベータ-グリコシダーゼは、N-又はO-結合型グリコシダーゼのどちらでもない。本発明の方法は、好ましくは、欧州特許第1489135A1号明細書に開示されるような、の活性化されたオリーブ葉抽出物(又は他の抽出物)の動物乳基質への添加を含まない。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0030】

発明の概要

本発明により解決される課題は、関連する乳製品、例えば、ヨーグルトのような発酵乳

50

製品、特に低脂肪ヨーグルトのような低脂肪発酵乳製品のゲル硬度を改善する／増加させるための新しい方法の提供に見ることができる。さらに、前記の新しい方法は、好ましくは製品の粘性に悪影響を与えるべきではない。

【0031】

前記解決策は、脱グリコシル化酵素（即ちグリコシダーゼ）の使用により、有意に増加した／改善されたゲル硬度を有する乳製品（例えば、ヨーグルト）を得ることができることを発明者らが確認したことに基づく。さらに、発明者らは、本明細書に関連するグリコシダーゼの使用が、有意なシネレシス効果がない態様において行なわれたことを確認した。さらに、発明者らは、本明細書に関連するグリコシダーゼの使用が有意なシネレシス効果がない態様において行われることを確認し、上述のように、有意なシネレシス効果を有しないことは、発酵乳製品、例えばヨーグルトの製造に関して、大変有利である。特に、O-結合型グリコシダーゼの使用に関して、有意なシネレシス効果が存在することなくこれを用いることができることは、発明者らにとって驚きであった。発明者らはまた、脱グリコシル化酵素の使用が、製品の粘性に悪影響を与えないことを確認した。

10

【0032】

本明細書の実施例4は、グリコシダーゼであるPNGase-Fの使用が、低脂肪ヨーグルトの粘性に関して何らの悪影響を与えることなく、有意に増加した／改善したゲル硬度を有する低脂肪ヨーグルトを与えることを示す。

【0033】

本明細書の実施例1に記載されるように、本明細書の実施例において用いられるグリコシダーゼ酵素調製物を、分析し、汚染物質の混入がないこと、即ち、これらが汚染物質、例えばプロテアーゼ酵素活性を含まないことが分かった。

20

【0034】

PNGase-Fが、「N-結合型グリカン」に作用する、即ちN-結合型糖タンパク質を脱グリコシル化するグリコシダーゼであることは、本明細書において興味深いことである。

【0035】

上述のように、カゼインは、O-結合型グリカンを含んでなる糖タンパク質であり、PNGase-F自体は、それ故カゼインを脱グリコシル化することができず、従って、PNGase-Fが本明細書において有益なゲル硬度の結果を与える理由は、例えば米国特許第7560127B2号明細書（上記を参照のこと）に記載されるように、カゼインのグリコシル化に関する機構によるものではあり得ない。

30

【0036】

理論に拘束されることなく要約すれば、発明者らがPNGase-FのようなN-結合型グリコシダーゼが本明細書において作用する（即ち改善されたゲル硬度を与える）ことを例証する事実は、本明細書に関連する改善されたゲル硬度を得る背後にある基本的な機構が、チーズの調製（上記を参照のこと）におけるキモシンの代替としてのO-結合型グリコシダーゼの使用に関する米国特許第7560127B2号明細書において提案される機構に基づく「カゼインの脱グリコシル化」と完全に異なることを説明する。

【0037】

言い換えれば、PNGase-FのようなN-結合型グリコシダーゼが本明細書において作用する（即ち改善されたゲル硬度を与える）という事実は、先行技術、例えば米国特許第7560127B2号明細書を考慮しても、当業者にとって大変に驚くべきことであると言える。

40

【0038】

理論に拘束されることなく、グリコシダーゼ自体の使用が本明細書に関連する改善されたゲル硬度を与えることができることについての考えられる説明は、前記グリコシダーゼが、カゼインでない乳清タンパク質からグリカンを除去することである。

【0039】

例えば、PNGase-FのようなN-結合型グリコシダーゼは、いくつかの乳清糖タ

50

ンパク質、例えばN - グリコシル化されていることが知られている。 - ラクトアルブミンから、N - グリカンを除くことができる。前記乳清タンパク質はまた、いくらか、タンパク質 - ネットワークに携わり、これは適切なゲル硬度を生じる。親水性グリカンの除去及び脱アミノ反応により課せられる荷電変化は、より強固なタンパク質ネットワークの形成に有利であり、それ故、改善されたゲル硬度を得ることができる。

【0040】

理論に拘束されることなく、いくつかの本明細書に関連する乳清糖タンパク質はまた、O - 結合型グリカンを含んでなることが考えられる。

【0041】

従って、発明者らは、O - 結合型グリコシダーゼがまた、本明細書に関連する改善されたゲル硬度を与えることができるか否か試験した。実施例5では、GalNAcのようなO - 結合型グリコシダーゼの使用がまた、本明細書に関連する改善されたゲル硬度を与えることができることを例証する。

10

【0042】

理論的な観点から、PNGase - FのようなN - 結合型グリコシダーゼを用いることの本明細書に関連する利点は、例えばヨーグルト製品の製造に関する限定された（又は限定されていない）望ましくないシネレシス効果である。この理論的な観点についての一つの理由は、PNGase - FのようなN - 結合型グリコシダーゼが、カゼインに作用せず、そして例えば、米国特許第7560127B2号明細書に記載されるように、キモシンの代わりに（カゼインを脱グルコシル化するための）言及されるO - 結合型関連脱グリコシル化酵素を用いることにより、チーズ生産のために要求される凝固（シネレシス）を得ることができることである。本明細書の実施例4では、N - 結合型グリコシダーゼであるPNGase - Fが、ヨーグルトの製造に関して、本明細書において望ましくないシネレシス効果を与えないことを例証した。

20

【0043】

発明者らは、例えば、GalNAcのようなO - 結合型グリコシダーゼについて、ヨーグルトの製造に関する、本明細書において望ましくないシネレシス効果を試験した。本明細書で実施例6に示されるように、O - 結合型グリコシダーゼGalNAcをヨーグルト生産に用いた場合、ヨーグルトの製造に関して望ましくないシネレシス効果がなかったことは、発明者らの驚くことであったと言える。

30

【0044】

本明細書の実施例7では、グリコシダーゼ（本明細書においてPNGase - F）の使用が、乳酸菌（LAB）で酸性化した乳及び化学的に酸性化した乳の双方において、本明細書に関連する改善されたゲル硬度を与えたことを例証する。理論に拘束されることなく、これは、ゲル硬度に関するグリコシダーゼの効果が、生物学的な効果（即ち、前記グリコシダーゼがLAB自体の機能性に関する何かしらのみ影響する効果）よりもむしろ物理的効果（即ち、上述のような乳清タンパク質の脱グリコシル化）であることを示す。

【0045】

上述の実施例では、既に熱処理された乳が用いられ、即ちグリコシダーゼ酵素は、関連する熱処理の後に、乳に添加された。理論に拘束されることなく、例えばPNGase - Fのようなグリコシダーゼはまた、未加工の乳（即ち熱処理されていない乳）に添加され、その後本明細書に関連する熱処理がされる場合、作用する（即ち、本明細書に関連するゲル硬度の改善を生ずる）べきである。

40

【0046】

従って、本発明の第一の態様は、乳製品を製造するための方法であって、以下の工程：

(i) : N - 結合型グリコシダーゼ及び/又はO - 結合型グリコシダーゼを乳基質に添加する工程；

(ii) : 任意で、乳基質を酸性化（例えば、発酵）させ、そして/あるいは任意で乳製品を得るために十分な工程を行なう工程であって、前記十分な工程は、有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に増加したゲル硬度を与える条件下で行なわれ

50

る、工程

を含んでなる方法に関する。

【 0 0 4 7 】

前記乳基質は、動物由来の乳（例えばウシ、ヒツジ、雌ヒツジ、ヤギ、バッファロー、又はラクダ）、及び植物由来の乳（例えば豆乳、オーク乳、米乳、アーモンド乳）からなる群から選択されてもよい。

【 0 0 4 8 】

第一の態様の実施形態は、動物乳製品を製造する方法であって、以下の工程：

(i) : 有効量の N - 結合型グリコシダーゼ及びノ又は O - 結合型グリコシダーゼを動物乳基質に添加する工程；

(i i) 乳製品を得るために十分な工程を行なう工程であって、前記十分な工程は、有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に増加したゲル硬度を与える条件下で行なわれる、工程；

を含み、前記グリコシダーゼが、乳中に存在する - カゼインの脱グリコシル化を行なうことができる O - 結合型グリコシダーゼ（例えば、 - ガラクトシダーゼ、N - アセチル - ガラクトサミニダーゼ [G a l N A C] 及びノイラミニダーゼ）のみである場合、前記動物乳製品が、関連する微生物を接種した発酵乳製品（発酵乳製品は、乳清の有意な除去が生じるチーズ製品ではない）であることを条件とする、方法に関する。

【 0 0 4 9 】

第一の態様の工程 (i i) の「有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に増加したゲル硬度を与える」なる表現は、「有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に改善されたゲル硬度を与える」と代替的に表現することができる。

【 0 0 5 0 】

工程 (i i) の「乳製品を得るために十分な工程を行なう」なる表現は、目的の乳製品（例えば、ヨーグルト）を製造するための関連する十分な工程として理解される。当業者が、例えばヨーグルトの製造に関して、好適な乳酸菌（L A B）培養物を用いた接種を含むかかる十分な工程を完全に知っていることは明らかである。

【 0 0 5 1 】

当業者が、目的の乳製品（例えば、ヨーグルト）のゲル硬度を測定することは、日常業務である。本明細書の実施例 2 では、目的の乳製品のゲル硬度の測定のための好ましい標準的な方法を提供し、好ましくは、本明細書に関連するゲル硬度は、この実施例 2 の方法に従って測定される。上述の A.N. Hassan らの論文（J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003）は、ゲル硬度の測定のための好ましい標準的な方法を記載する。例えば、前記論文の材料及び方法の欄を参照のこと、ここで弾性係数及び粘性弾性係数は測定され、本明細書の実施例 2 にみることができるよう、パラメータである弾性係数及び粘性弾性係数は、ゲル硬度を決定するために用いられ、本明細書の実施例 2 に記載されるように、いわゆる複素係数をこれらから任意で得ることができる。

【 0 0 5 2 】

当業者が目的の乳製品のゲル硬度を測定することは容易であるので、「有効量のグリコシダーゼがその存在の結果として乳製品に改善されたゲル硬度を与える」か否かに関する第一の態様の方法の工程 (i i) の必要条件を決定することはまた、当業者に当然に容易である。

【 0 0 5 3 】

この必要条件を決定するために、当業者は、有効量のグリコシダーゼの存在下、及び不存在下で、工程 (i i) の「乳製品を得るために十分な工程」を単純に行ない、そして添加される量のグリコシダーゼの存在の本明細書に関連するゲル硬度効果を決定する。ゲル硬度が改善されたノ増加した場合、第一の態様の工程 (i) に従って、有効量のグリコシダーゼを乳基質に添加し、有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に改善されたゲル硬度を与える条件下で、工程 (i i) の十分な工程が行なわれる。

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

当業者に知られているように、ゲル硬度を測定するための様々な方法は、絶対値において様々な値を与える。しかしながら、本明細書で述べられるような改善されたゲル硬度の測定に関して、ゲル硬度の相対的な改善、即ち有効量のグリコシダーゼの存在下、及び不存在下での改善が実質的に測定される。

【 0 0 5 5 】

当業者に理解されるように、本明細書の実施例 2、及び A.N. Hassan らの論文に記載されるようなゲル硬度を測定するための方法（比較的小さい計測の不確かさを含む）は、同様の相対的な結果を与え、即ち、用いられる特定の測定方法から独立して、ゲル硬度の相対的な改善に関する同一の結果を得ることができる。

【 0 0 5 6 】

第一の態様の方法の条件を、上述の米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書、及び上述の E. Cases らの論文（Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410）に関する放棄として見ることができる。

【 0 0 5 7 】

上述のように、E. Cases らの論文には、関連する微生物を用いて接種した「発酵乳」製品（例えば、ヨーグルト）が記載されていない。

【 0 0 5 8 】

上述のように、米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書は、本明細書に関連するゲル硬度特性について、何ら明確に述べておらず、即ち、これは、キモシンの代わりに記載される O - 結合型脱グリコシル化酵素の使用に起因する凝固 / シネレシス効果にのみ関すると言することができる。しかしながら、米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書において記載される O - 結合型脱グリコシル化酵素を、チーズ乳製品を製造するプロセスにおいて乳基質に添加することにより、理論的に明らかに、有効量のグリコシダーゼを添加することができ、本明細書に関連する改善されたゲル硬度をおそらく得ることができる。

【 0 0 5 9 】

前記条件は、グリコシダーゼが O - 結合型グリコシダーゼのみである状況に関し、米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書は、N - 結合型グリコシダーゼの使用に関して本明細書における何らの関連性も記載しておらず、従って、第一の態様の工程（i）において添加される有効量のグリコシダーゼ（即ち、1 又は複数のグリコシダーゼを網羅する）が、例えば、N - 結合型グリコシダーゼ及び O - 結合型グリコシダーゼの混合物である場合、これは、前記グリコシダーゼが O - 結合型グリコシダーゼのみである状況ではない。

【 0 0 6 0 】

本明細書において、当業者は、乳製品が米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書に記載されるようなチーズ製品であるか、あるいは別の本明細書に関連する乳製品、例えばヨーグルトのような発酵乳製品であるか日常的に確認することができる。

【 0 0 6 1 】

定義

用語「グリカン」とは、多糖又はオリゴ糖を意味する。グリカンは、単糖残基のホモ又はヘテロポリマーであり、そして直線状であるか、又は分岐している。グリカンはまた、複合糖質、例えば糖タンパク質、糖脂質、又はプロテオグリカンの糖質部分を意味するの

【 0 0 6 2 】

用語「糖タンパク質」は、ポリペプチド側鎖と共有結合的に結合したオリゴ糖鎖（グリカン）を含むタンパク質である。前記糖質は、共翻訳修飾又は翻訳後修飾において、タンパク質と結合する。

【 0 0 6 3 】

用語「グリコシダーゼ」（グリコシドヒドラーゼとも称される）とは、グリコシド結合（linkage） / 結合（bond）の加水分解を触媒する酵素を意味し、グリコシド結合は、炭水化物（糖）分子が別の炭水化物であってもなくてもよい別の基と結合する共有結合の一種である。N - 結合型グリカンを部分的に、あるいは完全に脱グリコシル化するグリコシ

10

20

30

40

50

ダーゼは、本明細書でN - 結合型グリコシダーゼと称される。同様に、O - 結合型グリカン¹⁰を部分的に、あるいは完全に脱グリコシル化するグリコシダーゼは、本明細書でO - 結合型グリコシダーゼと称される。N - 結合型グリコシダーゼなる用語は、当該技術分野においてよく定義された用語であり、当業者は、目的の特定のグリコシダーゼがN - 結合型グリコシダーゼであるか否かを知っている。同様に、O - 結合型グリコシダーゼなる用語は、当該技術分野においてよく定義された用語であり、当業者は、目的の特定のグリコシダーゼがO - 結合型グリコシダーゼであるか否かを知っている。グリコシダーゼは、本明細書において、脱グリコシル化酵素とも称される。

【0064】

用語「グリコシル化」は、グリカンがタンパク質、脂質、又は有機分子と結合する酵素的プロセスである。

【0065】

用語「N - 結合型グリカン」とは、通常、アスパラギン又はアルギニン側鎖の窒素と結合したグリカンを意味する。

【0066】

用語「O - 結合型グリカン」とは、通常、セリン、スレオニン、チロシン、ヒドロキシリジン、又はヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシ酸素、あるいは脂質、例えばセラミド上の酸素と結合したグリカンを意味する。

【0067】

用語「乳酸菌」とは、グラム陽性の微好気性細菌、又は嫌気性細菌を指し、これは、主に生成する酸として乳酸、酢酸、及びプロピオン酸を含む酸の生成と共に糖を発酵する。工業的に最も有用な乳酸菌は、ラクトコッカス属 (Lactococcus) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、ラクトバチルス属 (Lactobacillus) 種、リュウコノストック属 (Leuconostoc) 種、シュードリュウコノストック属 (Pseudoleuconostoc) 種、ペディオコッカス属 (Pediococcus) 種、ブレビバクテリウム属 (Brevibacterium) 種、エンテロコッカス属 (Enterococcus) 種、及びプロピオニバクテリウム (Propionibacterium) 属種を含む「ラクトバチルス」目内で発見されている。加えて、偏性嫌気性細菌の群に属する乳酸を生産する細菌であるピフィズス菌、すなわちピヒトバクテリウム属 (Bifidobacterium) 種は、一般的に乳酸菌の群に含まれる。これらは、単独で、又は他の乳酸菌と組み合わせ、しばしば食品培養物として用いられる。

【0068】

用語「乳基質」とは、本発明の方法に従って酵素的処理（あるいは発酵）に供することができる任意の未加工の及び/又は加工された乳原料でもよい。従って、有用な乳基質としては、限定することなく、任意の乳若しくはタンパク質を含む乳様製品の溶液/懸濁液、例えば、全脂肪乳若しくは低脂肪乳、脱脂乳、バターミルク、再構成された粉乳、コンデンスミルク、乾燥乳、乳清、乳清透過物、乳糖、乳糖の結晶化由来の母液、乳清タンパク質濃縮物、又はクリームが挙げられる。言うまでもなく、乳基質は、任意の哺乳動物（哺乳動物）に由来してもよく、例えば実質的に純粋な哺乳動物乳、又は再構成された粉乳でもよい。好ましくは、乳基質中の少なくとも一部のタンパク質は、乳中に天然に生じるタンパク質、例えばカゼイン又は乳清タンパク質でもよい。しかしながら、タンパク質の一部は、乳中に天然に生じないタンパク質でもよい。発酵の前に、前記乳基質は、当該技術分野において知られている方法に従って均質化及びパスツリーゼーションされてもよい。

【0069】

用語「乳」とは、任意の哺乳動物、例えばウシ、ヒツジ、雌ヒツジ、ヤギ、バッファロー、又はラクダを搾乳することにより得られる乳状分泌物として理解される。好ましい実施形態では、前記乳は牛乳である。乳なる用語はまた、非動物又は植物由来（例えば野菜、又は穀物由来）の「乳」、例えば豆乳、オーク乳、米乳、アーモンド乳を含む。他の由来としては、綿、小麦、麦芽、トウモロコシ、ジャガイモ、豆、ルピナス、及びモロコシである。任意で、前記乳は、例えば酸（クエン酸、酢酸、又は乳酸）の添加により酸性化

10

20

30

40

50

され、あるいは例えば水と混合される。乳は、未加工でも、例えば濾過、攪拌、パステライゼーション、均一化等により加工されてもよく、あるいは再構成された乾燥乳でもよい。本発明による「牛乳」の重要な例は、パステライゼーションした牛乳である。前記乳が、細菌を接種される前、間、及び/又は後に、酸性化され、グリコシダーゼで処理され、混合され、又は加工されてもよいことは、理解される。

【0070】

本明細書において、乳製品なる用語は、N - 又はO - 結合型グルコシダーゼを用いて乳基質を処理することにより製造される製品であり、任意で、前記製品はまた、発酵又は酸性化される。前記用語は、発酵乳製品（飲料用、攪拌型又はセット型でもよい）及びチーズを含む。

10

【0071】

本明細書で用いられるように、「均質化すること」とは、可溶性懸濁液又はエマルジョンを得るために激しく混合することを意味する。均質化が発酵の前に行われる場合、これは、乳から分離しないように、乳脂肪を小さいサイズに分散させるように行われてもよい。これは、乳を高圧で小孔に強制的に通すことにより達成されてもよい。

【0072】

本発明の方法において、「発酵」とは、微生物の作用を介した、糖質のアルコール又は酸への変換を意味する。好ましくは、本発明の方法における発酵は、乳酸への乳糖の変換を含む。

20

【0073】

ラクトバチラス種、及びストレプトコッカス・サーモフィラスの細菌を含む乳酸菌は、乳製品、例えば発酵乳製品の生産のために、バルクスターター増殖のための凍結若しくは凍結乾燥された培養物、あるいは発酵ベッセル若しくはバットへの直接接種を意図したいわゆる「直接バット投入 (Direct Vat Set)」（DVS）培養物のいずれかとして、通常、乳業に供給される。かかる培養物は、一般的に「スターター培養物」又は「スターター」と呼ばれる。

【0074】

任意で、前記発酵乳基質を、微生物を不活性にするための熱処理に供することができる。

【0075】

発酵乳製品の生産に用いられる発酵プロセスはよく知られており、当業者は、好適な処理条件、例えば温度、酸素、微生物の量及び特性、並びに処理時間を選択する方法をよく知っている。言うまでもないが、発酵条件は、本発明の達成を支持するために、すなわち、発酵乳製品を得るために選択される。

30

【0076】

本明細書において、ヨーグルトスターター培養物は、少なくとも一つのラクトバチルス株、例えばラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) 株、及び少なくとも一つのストレプトコッカス・サーモフィルス株を含む細菌培養物である。これに従って、ヨーグルトは、ラクトバチルス株及びストレプトコッカス・サーモフィルス株を用いて乳に接種し、そして発酵させることにより得られる発酵乳製品である。

40

【0077】

用語「スプーン用」とは、スプーンを用いて食べられるものとして理解されるべきである。用語「スプーン用乳製品」は、攪拌された製品を含む。用語「攪拌型製品」とは、具体的には、発酵後に、発酵段階下で形成された凝塊の破壊及び液体化をもたらす機械的処理を受けた発酵乳製品を意味する。機械的処理は、一般的に、これに限らないが、攪拌、ポンピング、濾過、又はゲルの均一化により、あるいは他の成分と混合することにより得られる。

【0078】

用語「セット型製品」とは、スターター培養物が接種され、そして接種する工程に続いてパッケージされ、その後パッケージ中で発酵される乳に基づく製品を含む。

50

【 0 0 7 9 】

用語「飲料用製品」は、飲料、例えば「飲むヨーグルト」及び同様の物を含む。用語「飲むヨーグルト」は、典型的に、ラクトバチルス属種及びストレプトコッカス・サーモフィルスの組み合わせによる発酵により生産される乳製品を網羅する。飲むヨーグルトは、典型的に、8%以上の乳固体非脂肪含量を有する。さらに、飲むヨーグルト飲料についての生存培養物カウントは、典型的に1mlあたり、少なくとも 10^6 細胞形成単位(CFU)である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 8 0 】

発明の詳細な説明

10

動物乳製品

一般的に言えば、動物乳製品(即ち、動物乳に基づく製品)を含む本明細書で好ましい乳製品のpHは、pH3~pH6.5、より好ましくは、pH3.5~pH5.75である。

【 0 0 8 1 】

当業者に知られているように、例えば好適な乳酸菌培養物で発酵させることにより、乳製品の適切なpHを得ることができる。しかしながら、当業者に知られているように、要求されるpHを得るために、好適な酸(例えば、乳酸)を単純に添加してもよい。あるいは、要求されるpHを得るために、ラクトン(例えば、GDLラクトン)を単純に添加してもよく、あるいは、要求されるpHを得るために、他の既知の方法(例えば、酵素法、又は二酸化炭素での圧力飽和(pressureatiation)を用いてもよい。

20

【 0 0 8 2 】

上述のように、本明細書で記載されるようなゲル硬度を改善するためのグリコシダーゼの使用は、いわゆる低脂肪乳製品に関して特に有用である。

【 0 0 8 3 】

従って、好ましい実施形態では、第一の態様の方法の工程(i)に用いられる乳基質は、低脂肪含量、即ち3.5%未満の脂肪含量、より好ましくは1.5%脂肪未満の脂肪含量、さらにより好ましくは0.75%未満の脂肪含量を有する乳基質である。

【 0 0 8 4 】

上述のように、記載されるような、ゲル硬度を改善するためのグリコシダーゼの使用の有利な点は、十分に適切なゲル硬度を得るために、例えば低脂肪乳製品のタンパク質含量を増加させる必要がないことであり、それ故最終低脂肪乳製品(例えば、低脂肪ヨーグルト)の合計カロリー/エネルギー含量を更に最小化する。

30

【 0 0 8 5 】

従って、好ましい実施形態では、最終乳製品(例えば、ヨーグルト)は、100gの乳製品あたり、150キロカロリー未満の合計カロリー/エネルギー含量を有し、より好ましくは、前記最終乳製品(例えば、ヨーグルト)は、100gの乳製品あたり、100キロカロリー未満の合計カロリー/エネルギー含量を有する。知られているように、当業者が目的の乳製品のカロリー含量を測定することは、日常業務である。

【 0 0 8 6 】

乳製品の好ましい例は、発酵乳製品又はチーズである。好ましい実施形態では、前記乳製品は発酵乳製品である。

40

【 0 0 8 7 】

好ましい実施形態では、前記発酵乳製品は、ヨーグルト、代替培養ヨーグルト、バターミルク、アシドフィルス乳、ケフィア、クミス及びクオークからなる群から選択される少なくとも一つの発酵乳製品である。最も好ましくは、発酵乳製品は、ヨーグルトである。

【 0 0 8 8 】

本明細書において、用語「ヨーグルト」及び「発酵乳」は、これらの通常の意味を有する。米国特許出願公開第2005/0095316A1号明細書及び米国特許出願公開第2005/0095317A1号明細書(双方ともにDanone)では、これらの用語はフラ

50

ンスにおける関連する公式な布告／規則に従って定義され、下記は、実質的にこれらの用語の同一の標準的な既知の定義に言及される。

【 0 0 8 9 】

当業者に知られているように、「ヨーグルト又は発酵乳」製品を得るために、乳清の有意な除去がされるべきではなく、パステライゼーションと少なくとも同等な熱処理がされるべきであることは、特に思い出される。発酵乳製品、例えばヨーグルトを製造するための好適な関連する熱処理は、例えば、15秒～30分間の85～98の熱処理である。標準的なパステライゼーションと少なくとも同等な熱処理の適用により、乳基質の乳清タンパク質は、多かれ少なかれ（これらの約25～99%）変性する。

【 0 0 9 0 】

当業者に明らかなように、ヨーグルト又は発酵乳製品は、「乳清の有意な除去がされるべきではない」ので、ヨーグルト又は発酵乳製品は、米国特許第7560127B2号明細書（上記を参照のこと）に記載されるように、チーズ製品ではない。

【 0 0 9 1 】

用語「発酵乳」は、脱脂された、又は脱脂されていない、あるいは乳構成物で富化した又は富化していない、脱脂された、又は脱脂されていない、濃縮された、又は濃縮されていない乳で調製された乳製品であって、パステライゼーションと少なくとも同等の熱処理に供され、それぞれの製品の特徴である種に属する微生物が接種される乳製品に関する。これらに含まれる遊離の乳酸の量は、消費者に販売される時に、好ましくは100グラムあたり0.6グラム未満であるべきではない。発酵乳は、好ましくは、これらを腐らせることを防ぐことが可能な温度において、消費者に販売される時にまで維持されるべきである。

【 0 0 9 2 】

用語「ヨーグルト」は、好ましくは特定の好熱性乳酸菌のみ、例えばラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 及びストレプトコッカス・サーモフィルスの発達のみによる、適切な、そして従来慣習に従って得られる発酵乳を意味し、これは好ましくは、同時に接種され、そして好ましくは最終した製品中で、乳を含む部分に関して表される1グラムあたり、好ましくは少なくとも10百万の細菌の割合で、生存しているべきである。

【 0 0 9 3 】

発酵乳製品は、通常、

(A) : $10^5 \sim 10^{13}$ c f u / m l (好ましくは $10^6 \sim 10^{11}$ c f u / m l) の乳酸菌 (L A B) 培養物を動物乳基質に接種し；及び

(B) : 10 ~ 55 の温度において、2 ~ 120時間、乳基質を発酵させることにより得られる。

【 0 0 9 4 】

当業者に知られているように、乳酸菌の好適な種としては、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) (例えばラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) 又はラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*))、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) (例えばストレプトコッカス・サーモフィルス)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*) (例えばラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*))、リユーコノストック属 (*Leuconostoc*) (例えばリユーコノストック・ラクティス (*Leuconostoc lactis*)、リユーコノストック・メゼンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)) が挙げられる。

【 0 0 9 5 】

前記乳基質を、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクスの株及びストレプトコッカス・サーモフィルスの株からなる発酵体を用いて接種した場合、前記製品は一般的にヨーグルトであると理解される。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

当該技術分野において知られるように、用語「代替培養ヨーグルト」とは、ストレプトコッカス・サーモフィルス及び任意のラクトバチルス属種の培養物を用いることにより製造される発酵乳製品を意味する。

【 0 0 9 7 】

当該技術分野において知られるように、用語「アシドフィルス乳」とは、ラクトバチルス・アシドフィルスの培養物を用いることにより製造される発酵乳製品を意味する。

【 0 0 9 8 】

当該技術分野において知られるように、用語「ケフィア」とは、強い特殊な関係において増殖するケフィアグレイン、ラクトバチルス・ケフィリ (*Lactobacillus kefir*)、リュウコノストック属、ラクトコッカス属、及びアシネトバクター (*Acetobacter*) の種から調製されるスターター培養物を用いることにより製造される発酵乳製品を意味する。ケフィアグレインは、乳糖発酵性酵母 (クイヴェロマイセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*))、及び非乳糖発酵性酵母 (サッカロマイセス・ユニスポラス (*Saccharomyces unisporus*))、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及びサッカロマイセス・エキシグス (*Saccharomyces exiguus*) の双方で構成される。

10

【 0 0 9 9 】

当該技術分野において知られるように、用語「クミス」とは、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス及びクイヴェロマイセス・マルキシアヌスの培養物を用いることにより製造される発酵乳製品を意味する。

20

【 0 1 0 0 】

好ましい実施形態では、前記乳製品は、細胞外多糖 (EPS) を合成することができるラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス及びストレプトコッカス・サーモフィルスを含むヨーグルト乳酸菌培養物での接種により製造されるヨーグルトであり、この好ましい実施形態は、前記ヨーグルトが低脂肪ヨーグルトである場合、即ち、第一の態様の工程 (i) に用いられる乳基質が、低脂肪含量、即ち 3.5% 未満の脂肪含量、より好ましくは 1.5% 脂肪未満の脂肪含量、さらにより好ましくは 0.75% 脂肪未満の脂肪含量を有する乳基質である場合、特に関連する。

【 0 1 0 1 】

上述のように、先行技術は、多数の EPS を産生するストレプトコッカス・サーモフィルスのかかる株を記載する (例えば国際公開 2007/095958A1 号 (Chr. Hansen A/S) を参照のこと)。従って、当業者は、目的の特定の株が EPS を合成することができるか否かを日常的に確認することができる。

30

【 0 1 0 2 】

本明細書において考えられる関連する理論的なビジネスシナリオの例は、会社が、本明細書に記載のグリコシダーゼの使用により乳濃縮物 / 粉末を製造し、その後、例えば改善された / 増加したゲル硬度を有するヨーグルトを得るために彼らのヨーグルト生産においてこれを使用するヨーグルト生産者にこの乳濃縮物 / 粉末を販売することであり、即ち彼らが、ヨーグルト生産自体の間にグリコシダーゼの何らかの更なる追加をすることなく、改善されたゲル硬度を得ることができることである。当業者に理解されるように、このような理論的なビジネスシナリオは、本明細書で述べられるような第一の態様の方法の範囲内の方法の例でもよい。乳濃縮物 / 粉末は、第一の態様の方法の動物乳製品の例として見ることができる。さらに、本明細書において当業者に理解されるように、最終のヨーグルトは、乳へのグリコシダーゼの予めの添加により、改善された / 増加したゲル硬度を有し、即ち、前記ヨーグルト生産者はまた、本明細書に記載されるような第一の態様の方法の範囲内で、活動を行なう。

40

【 0 1 0 3 】

グリコシダーゼ

上述のように、用語「グリコシダーゼ」(グリコシドヒドラーゼとも称される)とは、グリコシド結合 (linkage) / 結合 (bond) の加水分解を触媒する酵素を意味し、グリコ

50

シド結合は、炭水化物（糖）分子が、別の炭水化物である、又は別の炭水化物でない別の基と結合する共有結合の一種である。上述のように、グリコシダーゼはまた、本明細書において脱グリコシル化酵素とも称される。

【0104】

前記グリコシダーゼは、天然のグリコシダーゼでもよく、あるいは、これは天然のグリコシダーゼの変異体 / 突然変異体でもよく、当業者に知られているように、酵素の重要な酵素活性（本明細書ではグリコシダーゼ活性）を維持しながら、例えば、酵素の安定性を改善するために、目的の酵素（本明細書ではグリコシダーゼ）の突然変異誘発された変異体を作製してもよい。

【0105】

例えば、（特に、前記乳製品が発酵乳製品、例えばヨーグルトである場合に）望ましくないシネシスを最小化するために、前記グリコシダーゼは、N - 結合型グリコシダーゼであることが好ましい。

【0106】

上述のように、N - 結合型グリコシダーゼなる用語は、当該技術分野においてよく定義されている用語であり、当業者は、目的の特定のグリコシダーゼがN - 結合型グリコシダーゼであるか否かを知っている。さらに、先行技術は、多数の様々な本明細書において好適なN - 結合型グリコシダーゼを記載する。

【0107】

本明細書において好適なN - 結合型グリコシダーゼの例は、ペプチド - N (4) - (N - アセチル - ベータ - グルコサミニル) アスパラギンアミダーゼ (EC 番号 : 3 . 5 . 1 . 5 2 ; 代替名 : N - グリコシダーゼ - F 又は PNGase - F) 及びエンド - - N - アセチルグルコサミニダーゼ H (EC 番号 : 3 . 2 . 1 . 9 6 ; 代替名 ENDO - H) からなる群から選択される少なくとも一つのグリコシダーゼでもよい。

【0108】

直前に記載のN - 結合型グリコシダーゼは、N - 結合型グリコシダーゼ活性を有するが、本明細書において有意なO - 結合型グリコシダーゼ活性を有しないグリコシダーゼとして、本明細書において記載される。従って、前記N - 結合型グリコシダーゼが、本明細書に関連するO - 結合型グリコシダーゼ活性を有しない（例えばO - 結合型グリコシダーゼ活性がない）N - 結合型グリコシダーゼであることが本明細書において好ましい。

【0109】

前記方法において用いられるPNGase - Fとしても知られるN - グリコシダーゼ - Fは、フラボバクテリウム・メシソセプトイクム (*Flavobacterium mesingosepticum*) 由来でもよいアスパラギンアミダーゼ (EC 3 . 5 . 1 . 5 2) である。これは、糖タンパク質からのN - 結合型オリゴ糖の完全且つ無傷の切断を触媒する。これは、PNGase - Fの名称でNew England Biolabs Inc.からの市販品として得られ、あるいは本明細書の実施例1に記載のプラスミド及び方法を用いて行ったように、大腸菌 (*Escherichia coli*) のような株において組み換え生産されてもよい。ENDO - Hとしても知られるエンド - - N - アセチルグルコサミニダーゼ H (EC 3 . 2 . 1 . 9 6) は、ストレプトマイセス・プリカタス (*Streptomyces plicatus*) から得てもよい。ENDO - Hは、N - 結合型グリコシル化の二つのN - アセチルグリコサミン間のグリコシド結合の加水分解を触媒することができる。これはENDO - Hの名称でNew England Biolabs Inc.からの市販品として得られる。

【0110】

好適なO - 結合型グリコシダーゼの例は、- N - アセチル - ガラクトサミニダーゼ (EC 番号 : 3 . 2 . 1 . 4 9 ; 代替名 : GalNAC) ; - ガラクトシダーゼ (EC 番号 : 3 . 2 . 1 . 2 2) ; 及びノイラミニダーゼ (EC 番号 : 3 . 2 . 1 . 1 8) からなる群から選択される少なくとも一つのグリコシダーゼでもよい。

【0111】

GalNACは、- 結合型D - N - アセチル - ガラクトサミン残基の加水分解を触媒

10

20

30

40

50

する非常に特異的なエキソグリコシダーゼである。これはNew England Biolabs Inc.からの市販品として得られる。

【0112】

上述のように、O-結合型グリコシダーゼなる用語は、当該技術分野においてよく定義されている用語、当業者は、目的の特定のグリコシダーゼがO-結合型グリコシダーゼであるか否かを知っている。さらに、先行技術は、多数の様々な本明細書において好適なO-結合型グリコシダーゼを記載する。

【0113】

グリコシダーゼの有効量/活性は、本明細書において、当該技術に従って決定される。

【0114】

当該技術によれば、N-結合型グリコシダーゼ(例えば、PNGase-F及びENDO-H)について、1活性単位は、10 μ lの全反応容量において、37 $^{\circ}$ Cで1時間、10 μ gの変性したRNase-Bから、>95%の糖質を除去するのに要求される酵素の量として定義される。

【0115】

GalNAc(O-結合型グリコシダーゼ)について、1活性単位は、10 μ lの全反応容量において、37 $^{\circ}$ Cで1時間、1nmolの(GalNAc 1-3)(Fuc 1-2)Gal 1-4Glc-7-アミノ-4-メチル-クマリン(AMC)から>95%の末端-D-N-アセチル-ガラクトサミンを切断するのに要求される酵素の量として定義される。

【0116】

多くの本明細書に関連するグリコシダーゼ酵素は、New England Biolabs社から市販されている(本明細書に関連するグリコシダーゼ活性単位の特定の標準的な定義に関する詳細については、New England Biolabs社の製品カタログ(例えば彼らのウェブページ上でオンラインで利用可能)を参照のこと)。

【0117】

第一の態様の方法の工程(i)

第一の態様の本明細書に記載される方法の工程(i)は、「(i):有効量のN-結合型グリコシダーゼ及び/又はO-結合型グリコシダーゼを動物乳基質に添加すること」と読める。

【0118】

本明細書において当業者に理解されるように、前記N-結合型グリコシダーゼ及び/又はO-結合型グリコシダーゼは、実質的に純粋なグリコシダーゼ組成物、例えば前記グリコシダーゼ活性が、グリコシダーゼ組成物それ自体の全酵素活性の少なくとも5%を示すグリコシダーゼ組成物として動物乳基質に通常添加される。これはまた、グリコシダーゼ活性が、グリコシダーゼ組成物の全酵素活性の少なくとも25%を示すグリコシダーゼ組成物、あるいはグリコシダーゼ組成物の全酵素活性の少なくとも50%を示すグリコシダーゼ組成物でもよい。多くの場合、かかる実質的に純粋なグリコシダーゼ組成物が、グリコシダーゼ組成物の全酵素活性の少なくとも90%を示すグリコシダーゼ組成物であることが好ましい。

【0119】

有効量のグリコシダーゼは、一つの特別な種類のグリコシダーゼ(例えば、PNGase-F)であってもよく、あるいは本明細書に関連するグリコシダーゼ酵素の混合物(例えば、二つの異なるN-結合型グリコシダーゼ、又は一つのN-結合型及び一つのO-結合型グリコシダーゼ)でもよい。

【0120】

第一の態様の方法の工程(i)において添加されるグリコシダーゼが、N-結合型グリコシダーゼであることが好ましい場合、これは、工程(i)において有効量のN-結合型グリコシダーゼが添加されるべきであり、このN-結合型グリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品に改善されたゲル硬度を与えることを当然に意味する。しかしながら、

10

20

30

40

50

N - 結合型グリコシダーゼが好まれる場合、これは、工程 (i) において任意の O - 結合型グリコシダーゼが添加されるべきでないことを当然に意味しない。同様のことは、O - 結合型グリコシダーゼが好まれる場合に適用され、即ち、工程 (i) において O - 結合型グリコシダーゼが添加されるべきであるが、N - 結合型グリコシダーゼはまた添加されてもよい。これと対称的に、そして当業者に明らかなように、前記グリコシダーゼが、O - 結合型グリコシダーゼのみである場合、第一の態様の工程 (i) において、N - 結合型グリコシダーゼは添加されるべきではない。同様のことは、前記グリコシダーゼが、N - 結合型グリコシダーゼのみである場合に適用され、第一の態様の工程 (i) において、O - 結合型グリコシダーゼは添加されるべきではない。

【 0 1 2 1 】

10

当該技術分野において知られるように、乳製品は、一般的に熱処理がされる。当該技術分野において知られるように、典型的に超高温において、カゼインミセルが不可逆的に凝集する (又は「凝固する」) ので、熱処理は、沸点未満の温度が用いられる。

【 0 1 2 2 】

本明細書において、パスツリゼーションした動物乳製品に関する用語「パスツリゼーションした」とは、標準的なパスツリゼーション工程を意味する (即ち乳の好適な熱処理を含む) 。本明細書において、目的の特定の乳製品がパスツリゼーションした動物乳製品であるか否かを当業者が知っていることは明らかである。

【 0 1 2 3 】

当業者に理解されるように、標準的なパスツリゼーション工程は、約 1 5 ~ 2 0 秒間の約 7 1 ~ 7 2 での熱処理である。

20

【 0 1 2 4 】

上述のように、「ヨーグルト又は発酵乳」製品を得るために、乳清の有意な除去がされないべきであり、そして、パスツリゼーションと少なくとも同等の熱処理がされるべきであることは、特に思い出される。発酵乳製品、例えばヨーグルトを製造するための好適な関連する熱処理は、例えば、1 5 秒 ~ 3 0 分間の 8 5 ~ 9 8 での熱処理である。

【 0 1 2 5 】

用いられる熱処理の種類に依存して、前記熱処理は、例えば、1 秒足らず ~ 3 0 分間の、6 5 ~ 1 5 0 の温度を用いることによる乳の熱処理でもよい。

【 0 1 2 6 】

30

上述のように、前記乳製品が、発酵乳製品、例えばヨーグルトである場合、パスツリゼーションと少なくとも同等の熱処理がされるべきである。前記グリコシダーゼは、工程 (i) において、熱処理工程、即ち 1 秒足らず ~ 3 0 分間の、6 5 ~ 1 5 0 の温度を用いることによる乳の熱処理の前又は後に添加されてもよい。

【 0 1 2 7 】

場合によっては、グリコシダーゼが既に熱処理された乳に添加されることが好ましい。上述のように、前記乳製品が発酵乳製品である場合、前記乳基質は関連する乳酸菌 (L A B) 培養物を用いて接種され、発酵される。

【 0 1 2 8 】

前記乳製品が発酵乳製品である場合、前記グリコシダーゼは、乳酸菌 (L A B) 培養物を乳基質に接種する前に、一緒に、又は後に添加することができる。

40

【 0 1 2 9 】

乳製品に関連して、一般的に、前記乳基質の pH が pH 6 を下回る前に、前記グリコシダーゼが添加されることは、好ましい。

【 0 1 3 0 】

発酵乳製品に関連して、前記グリコシダーゼが、関連する乳酸菌発酵工程が終了する前に、即ち、好ましくは前記乳の pH が pH 6 を下回る前に添加されることは、好ましい。

【 0 1 3 1 】

1 m l の乳あたり 1 0 活性単位 ~ 1 m l の乳あたり 1 0 0 活性単位のグリコシダーゼの添加は、本明細書に関連する有効量のグリコシダーゼを得るために十分であり、即ち本明

50

細書本明細書に関連する改善されたゲル硬度を得るために十分である。特別な目的に関する場合、多くのグリコシダーゼ、例えば 1 ml の乳あたり最大 20000 活性単位のグリコシダーゼを添加することができる。上述のように、グリコシダーゼの有効量 / 活性は、当該技術に従って本明細書で決定される。

【0132】

第一の態様の方法の工程 (i i)

第一の態様の本明細書に記載される方法の工程 (i i) は、「 (i i) : 動物乳製品を得るために十分な工程を行なうことであって、前記十分な工程は、有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として改善されたゲル硬度を乳製品に与える条件下で行なわれる、工程」と読むことができる。

10

【0133】

上述のように、目的の動物乳製品を得るために十分な工程を行なうことは、当業者にとって日常業務であり、例えば、乳製品が例えばヨーグルトである場合、当業者は当然に、目的のヨーグルトを得るための十分な工程を知っている。有効量のグリコシダーゼが、乳製品に改善されたゲル硬度を与える条件に関して、これらの条件が、グリコシダーゼ酵素自体が十分な期間、活性を有する条件であることは明らかである。

【0134】

本明細書の実施例に示されるように、発明者らは、本明細書に関連する乳製品、例えばヨーグルトを製造するための通常の好適な条件 (例えば、温度、pH 等) において、多くの様々なグリコシダーゼ酵素が好適な活性を有することを確認した。

20

【0135】

要するに、そして当業者に理解されるように、好ましい、本明細書に関連するグリコシダーゼ活性を得るための好ましい条件は、用いられる特異的なグリコシダーゼ酵素 (例えば、PNGase-F)、及び製造される特定の乳製品 (例えば、ヨーグルト) に依存する。

【0136】

本明細書において、前記グリコシダーゼが本明細書に関連する改善されたゲル硬度を与える好適な反応条件の例は、

- ・ 10 ~ 50 の温度 (例えば 20 ~ 40) ;
- ・ pH 3 ~ pH 9 の pH (例えば pH 4 ~ pH 7.5、3 ~ 7、又は 3 ~ 6.5) ;
- ・ 10 分 ~ 120 時間の期間 (例えば 1 時間 ~ 120 時間、又は 0.5 ~ 5 時間)

30

でもよい。

【0137】

好ましい実施形態では、工程 (i i) におけるグリコシダーゼの存在は、乳製品に 1.25 倍改善されたゲル硬度 ; より好ましくは乳製品に 1.50 倍改善されたゲル硬度を与え ; さらにより好ましくは工程 (i i) におけるグリコシダーゼの存在は、乳製品に 1.7 倍改善されたゲル硬度を与える。

【0138】

上述のように、発明者らは、グリコシダーゼの使用が最終乳製品の粘性に悪影響を与えないことを確認した。

40

【0139】

従って、好ましい実施形態では、有効量のグリコシダーゼが、その存在の結果として乳製品の粘性に関して悪影響を与えない条件下で行われる。

【0140】

当業者が目的の乳製品 (例えば、ヨーグルト) の粘性を測定することは、日常業務である。本明細書の実施例 2 は、目的の乳製品の粘性の測定のための好ましい標準的な方法を提供し、好ましくは本明細書に関連する粘性は、この実施例 2 の方法に従って測定される。上述の A.N. Hassan らの論文 (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003) はまた、粘性の測定のための好ましい標準的な方法を記載する。例えば、論文の材料及び方法の欄、並びに図 1 を参照のこと、ここで剪断応力は測定され、本明細書の実施例 2 にみることができる

50

ように、パラメータである剪断応力は粘性の基準として用いられる。

【0141】

当業者が目的の乳製品の粘性を測定することは容易であるので、「工程(i i)が、有効量のグリコシダーゼがその結果として乳製品の粘性に関して悪影響を与えない条件下で行われる」か否かに関する、第一の態様の方法の工程(i i)の好ましい実施形態を決定することは、当然に当業者に容易である。

【0142】

この必要条件を決定するために、当業者は、有効量のグリコシダーゼの存在下及び不存在下において、工程(i i)の「乳製品を得るために十分な工程」を単純に行い、そしてその結果、添加された量のグリコシダーゼの存在の本明細書に関連する粘性効果を決定する。

10

【0143】

本明細書の実施例にみられるように、本明細書に記載されるようにグリコシダーゼを用いることにより改善された粘性を実際に得ることができる。

【0144】

従って、好ましい実施形態では、工程(i i)におけるグリコシダーゼの存在は、乳製品に1.10倍に増加した粘性を与え；より好ましくは乳製品に1.20倍に増加した粘性を与える。

【0145】

当業者に理解されるように、例えば本明細書の実施例2及びA.N. Hassanらの論文に記載されるような粘性を測定するための方法(比較的小さい計測の不確かさを含む)は、同一の相対的な結果を与え、即ち用いられる方法に独立して、粘性の相対的な改善に関する同一の結果を得ることができる。

20

【0146】

上述のように、本明細書の実施例は、N-結合型グリコシダーゼ及びO-結合型グリコシダーゼの双方が、ヨーグルトの製造に関して望ましくないシネレシス効果を与えないことを例証した。

【0147】

従って、好ましい実施形態では、工程(i i)は、有効量のグリコシダーゼがその存在の結果として、乳製品のシネレシス効果を増加させない条件下で行われる。この、シネレシス効果を増加させないことは、前記乳製品が、発酵乳製品、例えばヨーグルトである場合、特に適切である。

30

【0148】

当業者が目的の乳製品(例えばヨーグルト)のシネレシス効果を測定することは、日常業務である。本明細書の実施例3では、目的の乳製品のシネレシスの測定のための好ましい標準的な方法を提供し、好ましくは、本明細書に関連するシネレシスは、この実施例3の方法に従って、測定される。実質的に、実施例3のシネレシス効果を測定するための標準的な方法は、目的の乳製品の適切な保存、及び目的の乳製品の上部の乳清の量の測定に基づく。

【0149】

40

当業者が目的の乳製品のシネレシスを測定することは容易であるので、「工程(i i)が、有効量のグリコシダーゼがその結果として乳製品に対するシネレシス効果を増加させない条件下で行われる」か否かに関する、第一の態様の方法の工程(i i)の好ましい実施形態を決定することは、当然に当業者に容易である。この必要条件を決定するために、当業者は、有効量のグリコシダーゼの存在下及び非存在下における工程(i i)の「乳製品を得るために十分な工程」を単純に行い、その結果、添加された量のグリコシダーゼの存在の本明細書において関連するシネレシス効果を決定する。

【0150】

本発明はまた、乳製品を生産するための方法に関し、前記方法は

a) 乳基質を提供し；

50

b) N - 結合型グリコシダーゼ活性を有する酵素を用いて乳基質を処理し ; 及び
 c) 任意で、微生物、例えば乳酸菌を用いて乳基質を発酵させること
 を含む。興味深い実施形態において、工程 b) は、工程 c) の前又は間に行なわれる。

【 0 1 5 1 】

上述のように、前記乳基質は、任意の動物又は非動物起源に由来してもよい。

【 0 1 5 2 】

前記乳製品は、好ましくは、増粘剤及び / 又は安定化剤、例えばペクチン、ゼラチン、でんぷん、修飾でんぷん、カラギーナン、アルギネート、及びグアーガムを実質的に添加することなく、あるいは全く添加することなく生産される。

【 0 1 5 3 】

興味深い実施形態では、前記微生物は、多糖、例えばエキソ多糖 (EPS) を産生する乳酸菌及び / 又は微生物である。

【 0 1 5 4 】

前記微生物は、乳酸菌でもよく、そして好ましくは、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ラクトバチルス・デルブルッキー亜種ブルガリクス、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、リュウコノストック・メゼンテロイデス亜種クレモリス (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)、シュードリュウコノストック・メゼンテロイデス亜種クレモリス (*Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス次亜種ジアセチラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*)、ラクトバチルス・カゼイ亜種カゼイ (*Lactobacillus casei* subsp. *Casei*)、ラクトバチルス・パラカゼイ亜種パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*)、ビフィドバクテリウム・ビフィドウム (*Bifidobacterium bifidum*) 及びビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) からなる群から選択される種に属してもよい。

【 0 1 5 5 】

本発明の任意の方法の興味深い実施形態は、

・前記乳基質が酸性化の前にパスツリゼーションに供され、酵素処理がパスツリゼーション前に行なわれる方法 ;

・前記乳基質が、N - 結合型グリコシダーゼ活性を有する酵素を用いた処理の前に、熱処理に供される方法 ;

・前記乳製品が、セット型発酵乳製品、飲料用発酵乳製品、及びスプーン用発酵乳製品からなる群から選択される方法 ;

・前記乳製品が、8 % 未満の乳固体非脂肪含量を有する方法 ;

・前記乳製品が、2 % 未満の脂肪含量を有する方法 ;

・前記乳製品が、0 . 5 % 未満の脂肪含量を有する方法 ;

・前記乳製品が、パッケージされている方法 (即ち、前記方法はパッケージングを含む) ; 及び / 又は

・前記グリコシダーゼが、
 - N - アセチル - ガラクトサミニダーゼ ; GalNAc)
 ;
 - ガラクトシダーゼ ; ノイラミニダーゼ ; ペプチド - N (4) - (N - アセチル - ベータ - グルコサミニル) アスパラギンアミダーゼ ; N - グリコシダーゼ - F ; PNGase - F ; エンド -
 - N - アセチルグルコサミニダーゼ H ; ENDO - H 及び EC 3 . 2 . 1 . 4 9、EC 3 . 2 . 1 . 1 8、EC 3 . 2 . 1 . 2 2、EC 3 . 5 . 1 . 5 2、又は EC 3 . 2 . 1 . 9 6 に分類される任意の酵素からなる群から選択される方法
 である。

【 0 1 5 6 】

本明細書では、好適なパッケージに (好適な量の) 製品を「パッケージング」することは、製品が例えばヒト、又はヒトの集団に摂取され得るように、配布可能な形態において製品を得るための、製品の最終パッケージングに関する。好適なパッケージは、従って、

10

20

30

40

50

ボトル、容器、パッケージ、又は同様物であり、好適な量は、例えば10ml～5000mlであってもよいが、パッケージ中の量は、50ml～1000mlであることが、目下好ましい。かかるパッケージされた製品は、本発明の一部である。

【0157】

更なる態様では、本発明はまた、本発明の方法により得ることができる乳製品に関連する。

【0158】

なお更なる態様では、本発明は、N-結合型グリコシダーゼ及び/又はO-結合型グリコシダーゼを乳基質に添加することを含む方法により得ることができる乳製品に関連する。前記グリコシダーゼは、所望のゲル硬度を与えるための「有効量」が添加されるべきである。

10

【0159】

本発明の乳製品は、グリコシダーゼを用いた処理の前、及び/又は間、及び/又は後に、乳酸菌を用いた接種により発酵することができる。

【0160】

前記乳製品を、例えば、10ml～5000mlの範囲の容量を有する密閉容器、例えば25ml～1500mlの容量、又は50ml～1000mlの容量を有する容器にパッケージすることができる。

【0161】

更なる態様では、本発明は、乳製品、例えば発酵乳製品（例えばヨーグルト）又はチーズ（例えばフレッシュチーズ、フロマージュ・フレ、クオーク等）の調製のための方法における、N-結合型グリコシダーゼの使用に関する。

20

【0162】

本発明はまた、乳製品、例えば発酵乳製品（例えばヨーグルト）又はチーズ（例えばフレッシュチーズ、フロマージュ・フレ、クオーク等）のテクスチャ（例えばゲル硬度又は剛性）を改善するための方法における、N-結合型グリコシダーゼの使用に関する。

【0163】

現在好ましい実施形式では、本発明は、乳製品、例えばヨーグルトの食感を改善するための、N-結合型及び/又はO-結合型グリコシダーゼ活性を有する酵素の使用に関する。

30

【0164】

前記使用は、前記乳製品が、多糖、例えばエキソ多糖（EPS）を産生する乳酸菌を用いて生産されることを含む。

【0165】

本発明を記載する明細書において（特に添付の特許請求の範囲において）、用語「a」、「an」、及び「the」並びに同様の指示語の使用は、本明細書で他に指示されない限り、あるいは文脈により明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の双方を網羅すると解釈される。用語「含むこと（comprising）」、「有すること（having）」、「含むこと（including）」、及び「含むこと（containing）」は、他に記載のない限り、開放式用語（すなわち、「限定せずを含むこと（including, but not limited to）」を意味する）として解釈される。本明細書での値の範囲の記述は、本明細書で他に指示のない限り、範囲内にあるそれぞれの別個の値を個別に示す簡単な方法として役割を果たすことが意図されるにすぎず、それぞれの別個の値は、これがあたかも本明細書で個別に詳述されるように、本明細書中に組み込まれる。本明細書で記述される全ての方法は、本明細書で他に指示のない限り、あるいは文脈により明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で行なうことができる。本明細書で提供されるありとあらゆる実施例、又は例示的な言語（例えば、「例えば（such as）」）の使用は、本発明をより説明することを意図するにすぎず、他に請求のない限り、本発明の範囲について制限を課すものではない。本明細書におけるいかなる言語も、本発明の実施に必須である任意の請求されない要素を指すものとして解釈されるべきでない。

40

50

【実施例】

【0166】

実施例

実施例1：グリコシダーゼ

本明細書に記載される方法に用いられるグリコシダーゼの例としては、アスパラギンアミダーゼ、アセチルグルコサミニダーゼ、又はガラクトサミニダーゼが挙げられる。本方法に用いられるPNGase-Fとしても知られるN-グリコシダーゼ-Fは、アスパラギンアミダーゼ(EC 3.5.1.52)であり、フラボバクテリウム・メシゴセプチクムに由来してもよい。これは、糖タンパク質からN-結合型オリゴ糖の完全且つ無傷の切断を触媒する。これは、PNGase-Fの名称でNew England Biolabs Inc.から市販品として得てもよく、あるいはLoo et al (Protein Expression and Purification 24, 90-98, 2002)に記載されているプラスミド及び方法を用いて我々が行なったように、大腸菌のような株において組み換え生産されてもよい。ENDO-Hとしても知られるENDO-N-アセチルグルコサミニダーゼH(EC 3.2.1.96)は、例えば、ストレプトマイセス・プリカタスに由来してもよい。ENDO-Hは、N-結合型グリコシル化の二つのN-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合の加水分解を触媒する。これは、ENDO-Hの名称でNew England Biolabs Inc.から市販品として得ることができる。N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ(EC 3.2.1.49)は、スレオニン又はセリンからN-結合型D-N-アセチル-ガラクトサミン残基の加水分解を触媒する大変に特異的なエキソグリコシダーゼである。これは、N-アセチル-ガラクトサミニダーゼの名称でNew England Biolabs Inc.から購入して得ることができる。自社で生産されたPNGase-Fについて、我々は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、続くクーマシーブリリアントブルー(CBB)染色を用いて、高い(> 95%)純度を確認した。さらに純度を確認するために、プールした酵素を、SDS-PAGEにより分離し、銀を用いて染色した。出現したバンドを、次にPNGase-Fの存在、そしてPNGase-Fのみであることを確認するために、質量分析により分析した。

【0167】

自社で精製されたPNGase-Fの潜在的な特定のタンパク質分解活性を、基質としてウシ-カップ-カゼイン(Sigma-Aldrich)を用いたタンパク質分解アッセイにおいて評価した。このアッセイでは、我々は、ヨーグルト発酵において生じる天然のpH降下と似た様々なpH値におけるタンパク質分解活性を試験した。前記システムに挑戦するために、我々は、本発明の方法における濃度よりも20倍高い酵素濃度を用い、そしてそれぞれのpH値において4時間インキュベートした。これらの条件下で、我々は、特定のタンパク質分解活性についての何らの証拠も発見しなかった。

【0168】

結論：

上述の結果に基づいて、いわゆる自社で生産されたPNGase-Fに汚染物質の混入がないことは、明らかであった。供給者により記載されるように、上述の他の市販のグリコシダーゼに、汚染物質の混入はなかった。

【0169】

実施例2：ゲル硬度及び粘性を測定するための方法

ゲル硬度を、自動サンプルチェンジャーを備えたAnton Paarレオメーター(Physica DS Rレオメーター+ASC)の使用により測定した。測定ローター(measuring bob)を20mlのサンプルを含む測定カップ中に置き、これを手で攪拌し、13 に加熱した。ローター(bob)をサンプル中に置いた後、待機時間を適用した。次にゲル硬度を振動により測定した。本明細書において、前記株(strain)を、0.3%の一定に維持し、周波数を0.5 Hzから30 Hzまで増加させた。前記測定から、弾性係数(G')及び粘性係数(G'')を計算することができ、そしてこれらから複素係数(G^*)を得た。

【数 1】

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

1 Hzにおける G^* を、ゲル硬度の基準として用い、そして様々なサンプルの比較のために用いた。

【0170】

同様の装置（Anton Paarレオメーター）を用いて、前記粘性を、10秒毎に測定点（剪断応力）を設けて、剪断速度を0.2707 1/sから300 1/sまで増加させることにより測定した。前記剪断速度を、10秒毎に測定点（剪断応力）を設けて剪断速度を275 1/sから0.2707 1/sまで減少させた。300 1/sにおける剪断応力を製品の粘性の基準として用いた。

10

【0171】

結論：

ゲル硬度及び粘性を測定するための上記の標準的な方法に基づいて、本明細書に記載の動物乳製品を製造するための方法に従って、グリコシダーゼの添加により、目的の乳製品のゲル硬度及び/又は粘性が改善されたか否かを当業者が決定することは、日常業務である。

20

【0172】

実施例3：シネレシスを測定するための方法

シネレシスの量を測定するための二つの異なる方法が本発明において用いられる。

方法1：50mlのヨーグルト（実施例4のように生産される）をエッペンドルフチューブに入れ、冷所（5）で14日間保存し、その後ヨーグルトの上部の乳清の量を定規（mm）で測定する。当業者に明らかなように、目的の乳製品の保存により、ヨーグルト以外の別の乳製品のシネレシス効果を測定し、そして目的の乳製品の上部の乳清の量を測定してもよい。

【0173】

方法2：脱脂乳を2%脱脂粉乳（SMP、生産者）で補強し、冷蔵庫に一晩置いた。前記バッチを90で20分間熱処理した。75ml乳溶液を、0.02% YoFlex（登録商標）Advance 2.0ヨーグルト培養物（Chr. Hansen A/S, Denmarkから得ることができる）及び酵素（PNGase又はGalNACのいずれか）とともに、100mlの容量フラスコに入れた。乳、培養物、及び酵素の合計重量を記録した。前記溶液を43に加熱し、pH4.55まで発酵させ、その後フラスコを冷所に7日間置いた。7日後、ヨーグルトの上部の前記乳清を、注ぎ出し、重量を測定した。シネレシスの量を、その後パーセンテージとして計算した。当業者に明らかなように、目的の乳製品の保存により、例えば目的のヨーグルト培養物でない別の物で発酵させることにより、ヨーグルト以外の別の乳製品のシネレシス効果を測定し、保存し、そして目的の乳製品の上部の乳清の量を測定することができる。

30

40

【0174】

結論：

シネレシス効果を測定するための上記の標準的な方法に基づいて、本明細書に記載の動物乳製品を製造するための方法に従って、グリコシダーゼの添加により、目的の乳製品に対する有意なシネレシス効果を有するか否かを当業者が確認することは、日常業務である。

【0175】

実施例4：（21スケール）に関するPNGaseFの影響

2リットルの脱脂乳（0.1%脂肪、Arla Express, Slagelse）を1.6%脱脂粉乳（SMP、生産者）で補強し、冷蔵庫に一晩置いた。前記溶液を90で20分間熱処理し

50

、43 に冷却し、0.02% YoFlex (登録商標) Advance 2.0 (Chr. Hansen A/S, Denmarkから得られる)、及び10ml PNGase-F又は対照サンプルとして50mM NaClを含む10mlの20mM リン酸Na緩衝液pH7.5のいずれかで接種し、pH4.55まで発酵させた。pH4.55に達した場合、前記ヨーグルトを攪拌し、後処理ユニット(PTU)を通過させ、前記ヨーグルトを25で2barの背圧に供した。最終製品を5日目にレオメーター分析に供した。

【0176】

【表1】

表1

自社製PNGase-Fの不存在下、及び存在下における低脂肪ヨーグルトの調製の2スケール実験の実験結果

	複素係数 (Pa)	(300 1/s) における剪断応力	シネレシス (mm)
Advance 2.0	29.2 ± 0.86	63.7 ± 0.61	8
Advance 2.0 + PNGase-F (250 U/ml 乳)	51.0 ± 0.57	70.7 ± 0.2	4

N-グリコシダーゼについて、1活性単位は、10 µlの合計反応容量において、37°Cで1時間に10 µgの変性RNase-Bから>95%の糖質を除去するのに必要とされる酵素の量として定義される。

【0177】

表1の数値は、PNGase-Fが低脂肪ヨーグルトのゲル硬度を増加させることを示す。これらの条件下で、対照と比較して75%を有した。PNGase-Fの存在下において得られる粘性は、対照サンプルに匹敵する、あるいは僅かに優れる。本明細書ではデータを示さないが、我々は、PNGase-F処理に応じたゲル硬度の増加が、用量依存的であることを発見した。我々はまた、実施例3の方法1を用いてシネレシスを評価し、シネレシスがPNGase-F処理に応じて減少したことを発見した。

【0178】

結論：

上記の結果は、PNGase-Fが、低脂肪ヨーグルトのゲル硬度を増加させることを例証する。この実験の条件下で、対照と比較して75% (即ち1.75倍)を有した。さらに、シネレシスが、PNGase-F処理に応じて減少することを発見した。PNGase-Fの存在下において得られる粘性は、対照サンプルに匹敵する、あるいは僅かに優れる。

【0179】

実施例5：低脂肪ヨーグルトにおける様々なグリコシダーゼの試験

ヨーグルトを20mlのレオメーターカップ中で直接製造した。この結果、セット型ヨーグルトを得た。脱脂乳(0.1%脂肪、Arla Express, Slagelse)を2%脱脂粉乳(SMP、生産者)で補強し、冷蔵庫に一晩置いた。前記溶液を90で20分間熱処理し、43に冷却し、0.02% YoFlex (登録商標) Advance 2.0 (Chr. Hansen A/S, Denmarkから得られる)及び様々なグリコシダーゼで接種し、発酵させた(表1)。前記サンプルを冷蔵庫に置き、レオロジーを、実施例2に従って、3日目に測定した。

【0180】

10

20

30

40

【表2】

表2

市販のグリコシダーゼの存在下及び不存在下における低脂肪ヨーグルトの調製物の20 ml カップラボスケール実験の実験結果。この表中の全ての試験された酵素は、New England Biolabs Inc. から得た。

	濃度 (U/ml 乳)	ゲル硬度 (Pa)
Advance 2.0 + PNGase-F	250	608 ± 32.5
Advance 2.0 + ENDO-H	250	564 ± -
Advance 2.0 + α-N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	50	482 ± 19.8
Advance 2.0	0	391 ± 7.5

10

N-グリコシダーゼであるPNGase-F及びEndo-Hについて、1単位は表1において定義される。α-N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ、O-グルコシダーゼについて、1単位は、10 μlの合計反应用量において、37°Cで1時間に1 nmolの(GalNAc α1-3)(Fuc α1-2)Gal α1-4Glc-7-アミノ-4-メチル-クマリン(AMC)から>95%の末端のα-D-N-アセチル-ガラクトサミンを切断するのに要求される酵素の量として定義される。

【0181】

全ての試験されたグリコシダーゼ、N-グルコシダーゼ、及びO-グルコシダーゼGalNAcについて、前記ゲル硬度が、著しく改善されたことが分かった。試験された濃度において、市販のPNGase-Fは、低脂肪ヨーグルトのゲル硬度に関してと最も強力な効果を有することが分かった。

20

【0182】

結論：

上記結果は、全ての試験されたグリコシダーゼ、N-グルコシダーゼ、及びO-グルコシダーゼであるGalNAcについて、ゲル硬度が著しく改善されたことが分かった。

【0183】

実施例6：O-結合型グリコシル化に作用するグリコシダーゼを用いたシネレシス実験
米国特許第7,560,127号明細書では、O-グルコシダーゼであるGalNAcが、チーズカード/凝固形成を導くことができることが示されている。我々は、本明細書において、低脂肪ヨーグルトにおけるGalNAcが与えるシネレシス形成に関する効果を分析した。前記実験は、実施例3の方法2に記載されるように行なった。ヨーグルトを100mlのレオメーターカップ中で直接製造した。この結果、セット型ヨーグルトが得られた。脱脂乳(0.1%脂肪, Arla Express, Slagelse)を2%脱脂粉乳(SMP, Arla Express, Slagelse)で補強し、冷蔵庫に一晩置いた。前記溶液を90°Cで20分間熱処理し、43°Cに冷却し、0.02%YoFlex(登録商標)Advance 2.0(Chr. Hansen A/S, Denmarkから得られる)及び1mlの乳あたり100Uの濃度のGalNAcで接種した。酵素を含まない対照サンプルについて、21日後の乳清のパーセンテージが0.3±0.04%である一方で、酵素処理されたサンプルについての乳清画分は、0.2±0.08%であった。驚くべきことに、それ故GalNAcを用いた処理は、同一の培養物で発酵させた対照サンプルと比較した場合、シネレシスを増加させなかったことが分かった。米国特許第7,560,127号明細書は、O-結合型グリカンの除去がカード形成、及びその結果乳清の分離を導くことを示唆しているので、この結果は予測されなかった。

30

40

【0184】

結論：

上記の結果は、ヨーグルトの生産の間、試験されたO-結合型グリコシダーゼがシネレシスを引き起さなかったことを例証する。

【0185】

50

実施例 7 : L A B で酸性化した乳及び化学的に酸性化した乳

本実験において、我々は、P N G a s e - F の効果が酸性化の機構に依存するか否かを評価することを望んだ。実験的に、発酵させたヨーグルト及び化学的にグルコノ - ラクトン (G D L) で酸性化したヨーグルトにおける P N G a s e - F の効果を比較することにより行なった。9 . 5 % の乾燥物からなる乳に、表 3 に示されるように、Y o F l e x (登録商標) A d v a n c e 2 . 0 又はグルコノ - ラクトン (G D L) のいずれか、及び P N G a s e - F を接種し、43 に加熱し、p H 4 . 5 5 まで発酵させた。サンプルを 5 で 3 日間保存後、サンプルを攪拌器で攪拌し、レオメーターカップに注ぎ、レオロジーを実施例 2 及び 3 に従って測定した。表 3 に表される結果は、P N G a s e - F の効果が物理的現象として記載されてもよいことを確認した。化学的に酸性化したヨーグルトは、A d v a n c e 2 . 0 培養物よりもより硬いゲルを生成した。しかしながら、酸性化の双方の方法について、P N G a s e - F の添加がゲル硬度を改善したことは明らかである。

【 0 1 8 6 】

【表 3】

表3

酸性化のためにAdvance 2.0又はGDLを用いたPNGase-Fの存在下における低脂肪ヨーグルトの調製の200 mlラボスケール実験の実験結果

	濃度 (U/ml 乳)	ゲル硬度 (Pa)
Advance 2.0+ PNGase-F	250	35.3 ± 7.8
Advance 2.0	0	24.7 ± 0.9
GDL + PNGase-F	250	148.0 ± 7.0
GDL	0	121.5 ± 6.4

【 0 1 8 7 】

結論：

上記の結果は、酸性化の双方の方法について、P N G a s e - F の添加がゲル硬度を改善したことが明らかであることを例証する。

【 0 1 8 8 】

本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載され、これは、本発明を実施するための発明者らに知られている最良の態様を含む。これらの好ましい実施形態の変形は、先の記載を読んだ場合、当業者に明らかになる。発明者らは、当業者が必要に応じてかかる変形を用いることを予測し、発明者らは、本発明が本明細書に特別に記載されない限り、本発明が実施されることを意図する。従って、本発明は、準拠法により許容される添付の請求項に列挙される主題の全ての改変及び同等物を含む。さらに、これらの全ての可能な変形における上述のエレメントの任意の組み合わせは、本明細書に特に示されない、あるいは明らかに本明細書に矛盾しない限り、本発明により包含される。

【 0 1 8 9 】

参考文献

- 1 . 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 9 5 3 1 6 A 1 号明細書 (Danone)
- 2 . 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 9 5 3 1 7 A 1 号明細書 (Danone)
- 3 . 国際公開 2 0 0 7 / 0 9 5 9 5 8 A 1 号 (Chr. Hansen A/S)
- 4 . A.N. Hassan et al (J. Dairy Sci : 86:1632-1638; 2003)
- 5 . 米国特許第 7 5 6 0 1 2 7 B 2 号明細書 (DSM)
- 6 . E. Cases et al (Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410)

10

20

30

40

50

7 . 欧州特許第 1 4 8 9 1 3 5 A 1 号

8 . R. Scott, (1986), Cheesemaking process, second ed., Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

9 . G. Bylund, (1995), Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden

1 0 . F. Kosikowski, (1982), Cheese and fermented foods, second ed., Kosikowski & Associates, New York

【 0 1 9 0 】

本特許文書に引用される全ての参考文献は、参照によりこれらの全体において本明細書に組み込まれる。

フロントページの続き

- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (72)発明者 ヨーナス ヤコブセン
デンマーク国, デーコー - 2 1 0 0 コペンハーゲン エー, ホー. ペー. エルムス ガーデ
3 6 エステー.
- (72)発明者 サンドラ レケ ビンド
デンマーク国, デーコー - 2 4 0 0 コペンハーゲン エンペー, レイル. 1, 6. サル, グラ
ースブルベバイ 2 5
- (72)発明者 カーステン ブルーン クビスト
デンマーク国, デーコー - 1 8 1 4 フレゼレクスベア セー, 1. テーペー, カーリト エトラ
ルス バイ 2 2

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0146603 (US, A1)
ヨーグルト製品の凝固性に対する新しいアプローチ, 2006年 8月, 「はじめに」の項, U
RL, <http://lin.alic.go.jp/alic/month/dome/2006/aug/chousa-1.htm>
月報「畜産の情報」, 日本, 2006年 8月, 「はじめに」のカラム, URL, [http://lin.a
lic.go.jp/alic/month/dome/2006/aug/index2.htm](http://lin.alic.go.jp/alic/month/dome/2006/aug/index2.htm)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23C 1/00 - 23/00