

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月15日(15.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/191303 A1

- (51) 国際特許分類:
A23J 3/00 (2006.01) C12N 9/58 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01) C12N 9/62 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01) C12N 9/80 (2006.01)
A23L 27/00 (2016.01) C12P 21/06 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) A23L 33/175 (2016.01)
C12N 9/52 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
C12N 9/54 (2006.01) A23L 33/185 (2016.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/010765
- (22) 国際出願日: 2022年3月11日(11.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-038847 2021年3月11日(11.03.2021) JP
特願 2021-130736 2021年8月10日(10.08.2021) JP
- (71) 出願人: アマノ エンザイム ユーエスエイ カンパニー リミテッド(AMANO ENZYME U.S.A. CO., LTD.) [US/US]; 60124 イリノイ州エルジン マデリーン レーン 1 4 1 5 Illinois (US). 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: 奥田 啓太(OKUDA Keita); 60124 イリノイ州エルジン マデリーン レーン 1 4 1 5 アマノ エンザイム ユーエスエイ カンパニー リミテッド内 Illinois (US). 日浦 恵太(HIURA Keita); 〒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: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PROTEIN DEGRADATION PRODUCT PRODUCTION METHOD AND ENZYME PREPARATION

(54) 発明の名称: タンパク質分解物の製造方法、及び酵素剤

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a practical means for generating cysteine from protein, said means also being suited for use in the field of foodstuffs (foodstuff applications). According to the present invention, provided is a cysteine-containing protein degradation product production method including a step for causing γ -glutamyl peptide hydrolase, filamentous bacteria-derived protease, and bacterial protease to act on a protein material.

(57) 要約: 本発明の課題は、食品分野(食品用途)への利用にも適した、タンパク質からシステインを生成するための実用的な手段を提供することである。本発明によれば、タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる工程を含む、システイン含有タンパク質分解物の製造方法が提供される。



WO 2022/191303 A1

明 細 書

発明の名称： タンパク質分解物の製造方法、及び酵素剤

技術分野

[0001] 本発明はタンパク質からシステインを生成する方法、システイン含有タンパク質分解物の製造のための酵素剤、及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 食品中のタンパク質は栄養素として重要であり、嗜好性の点から主に畜肉や魚介類などの動物性タンパク質が好まれてきた。近年は環境保護の観点や健康意識の高まりから、動物性タンパク質の代替として、植物性タンパク質への需要が増えてきているが、嗜好性の点で課題が多く、物性や呈味性の改良を目的に様々な研究がされてきた。例えば、特許文献1には、トランスグルタミナーゼとプロテアーゼを用いた大豆タンパク質の製造方法において、プロテアーゼが、トランスグルタミナーゼによって上昇した粘度を低下させる目的で用いられることが開示されている。一方、アミノ酸やペプチドは栄養素としてだけでなく、食品の味や風味にも重要な要素である。例えばグルタミン酸やアスパラギン酸は旨味や酸味を、グリシン、アラニン、トレオニン等は甘みを、トリプトファン、イソロイシン、バリン等は苦みを呈する。そのため、タンパク質からアミノ酸やペプチドを生成する研究がされている。特許文献2には、大豆タンパク質にエンドプロテアーゼ活性のみを持つ酵素を二種以上作用させることで低分子ペプチドを生成する方法が開示されている。また、呈味性を付与するために調味料としてのアミノ酸を生成する方法も研究されている。例えば、特許文献3には、蛋白質原料を耐熱性蛋白質分解酵素と耐熱性グルタミナーゼで加水分解することでグルタミン酸含量の多いアミノ酸調味料を得る方法を開示している。

[0003] ところで、システインはメイラード反応物を形成することで肉の風味を付与することが知られている。システインは主に動物由来の原料（毛髪や羽毛）から抽出されており、食品に添加することは好まれない。特許文献4には

、グルタチオンに酸性プロテアーゼとグルタミナーゼを作用させることでシステインを生成する方法が開示されているが、グルタチオンは食品によって含有量に差があり、活用できる場面は限られる。

[0004] また、特許文献5には、グルタミン酸特異的エンドプロテアーゼで大豆タンパク質を処理することにより、遊離アスパラギン酸及び遊離グルタミン酸が増加することが開示されている。さらに特許文献6には、バチルス・リケニフォルミス由来のサブチリシンプロテアーゼ（ALCALASE）又はノカルディオプシス・プラシナ由来セリンプロテアーゼ（SP1）によって大豆タンパク質を処理した場合、ALCALASE 加水分解物よりSP1加水分解物の方が苦みが少ないことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2006-141231号公報
特許文献2：特開平5-252979号公報
特許文献3：特開昭48-82068号公報
特許文献4：WO2021/002195号
特許文献5：特表2008-526261号公報
特許文献6：特表2011-530274号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、食品などのコク味またはうま味を向上できる実用的な手段を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題の下で本発明者らは、酵素によって食品のコク味またはうま味を向上させることを目指して検討を重ねた。その結果、 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素の一つであるグルタミナーゼと糸状菌プロテアーゼ、細菌プロテアーゼの併用によってコク味またはうま味を向上させた食品を製造でき

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。即ち、本発明は下記に掲げる態様の発明を提供する。

[0008] [1] タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる工程を含む、タンパク質分解物の製造方法。

[2] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がグルタミナーゼ、 γ -グルタルトランスフェラーゼ又は γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼである、[1]に記載の方法。

[3] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス属微生物由来グルタミナーゼである、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス・アミロリケファシエンス由来グルタミナーゼである、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス属微生物由来酸性プロテアーゼ又はアスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼである、[1]～[4]のいずれか一項に記載の方法。

[6] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス・オリゼ由来酸性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ由来中性プロテアーゼ、又はアスペルギルス・メレウス由来中性プロテアーゼである、[1]～[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7] 前記細菌プロテアーゼがバチルス属又はジオバチルス属微生物由来プロテアーゼである、[1]～[6]のいずれか一項に記載の方法。

[8] 前記細菌プロテアーゼがジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来プロテアーゼである、[1]～[7]のいずれか一項に記載の方法。

[9] 前記タンパク質材料が動物性タンパク質材料、植物性タンパク質材料又は微生物性タンパク質材料である、[1]～[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10] 前記タンパク質材料が植物性タンパク質材料である、[1]～[9]のいずれか一項に記載の方法。

[11] 前記タンパク質材料がエンドウ豆、大豆、そら豆、ひよこ豆、大麦、小麦、オーツ麦、米、そば、ひえ、あわ、ヘンプ、藻類、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クルミ、ブラジルナッツ、ピーナッツ、ココナッツ由来タンパク質材料である、[1]～[9]のいずれか一項に記載の方法。

[12] [1]～[11]のいずれか一項に記載の方法により製造されるタンパク質分解物を含む、食品。

[13] γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを含む、タンパク質分解物の製造のための酵素剤。

[14] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がグルタミナーゼ、 γ -グルタルトランスフェラーゼ又は γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼである、[13]に記載の酵素剤。

[15] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス属微生物由来グルタミナーゼである、[13]又は[14]に記載の酵素剤。

[16] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス・アミロリケファシエンス由来グルタミナーゼである、[13]～[15]のいずれか一項に記載の酵素剤。

[17] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス属微生物由来酸性プロテアーゼ又はアスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼである、[13]～[16]のいずれか一項に記載の酵素剤。

[18] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス・オリゼ由来酸性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ由来中性プロテアーゼ、又はアスペルギルス・メレウス由来中性プロテアーゼである、[13]～[17]のいずれか一項に記載の酵素剤。

[19] 前記細菌プロテアーゼがバチルス属又はジオバチルス属微生物由来プロテアーゼである、[13]～[18]のいずれか一項に記載の酵素剤。

[20] 前記細菌プロテアーゼがジオバチルス・ステアロサーモフィラス由来プロテアーゼである、[13]～[19]のいずれか一項に記載の酵素剤。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、食品等にコク味またはうま味を付与したり、食品のコク味またはうま味を増強することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、実施例2における固さの評価の結果を示す。

[図2]図2は、実施例2における遊離アミノ酸分析の結果を示す。

[図3]図3は、実施例3における遊離アミノ酸分析の結果を示す。

[図4]図4は、実施例3における遊離アミノ酸分析の結果を示す。

[図5]図5は、実施例3における遊離アミノ酸分析の結果を示す。

[図6]図6は、実施例3における遊離アミノ酸分析の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明によれば、タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる工程を含む、タンパク質分解物の製造方法が提供される。

本発明によればさらに、 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを含む、タンパク質分解物の製造のための酵素剤が提供される。

[0012] タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる工程は、一段階の工程（即ち、タンパク質材料に上記3種類の酵素を同時に作用させる工程）で行ってもよいし、二段階又は三段階の工程（即ち、タンパク質材料に上記3種類のうちの1種又は2種の酵素を作用させる工程と、さらに上記3種類のうちの別の酵素を作用させる工程）で行ってもよい。

[0013] γ -グルタミルペプチド加水分解酵素としては、グルタミナーゼ、 γ -グルタルトランスフェラーゼ又は γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼが

挙げられる。

γ -グルタミルペプチド加水分解酵素としては、微生物由来の γ -グルタミルペプチド分解酵素を使用することができ、その例としては、バチルス属微生物由来のグルタミナーゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼを挙げることができる。

γ -グルタミルペプチド加水分解酵素は、好ましくは、バチルス属微生物由来グルタミナーゼであり、さらに好ましくは、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) 由来グルタミナーゼ (例えば、天野エンザイム株式会社が提供するグルタミナーゼSD-C100S) である。

[0014] 微生物由来 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素は精製品でなくてもよく、例えば、 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を産生する微生物の培養液、破碎液／抽出物、これらの部分精製物等を用いることにしてもよい。2種類以上の微生物由来 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を併用することにもよい。尚、いくつかの微生物由来 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素が市販されており (例えば、上記のグルタミナーゼSD-C100S)、容易に入手及び利用可能である。

[0015] 糸状菌プロテアーゼとしては、好ましくは、アスペルギルス属微生物由来酸性プロテアーゼ、及びアスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼを挙げることができる。

[0016] アスペルギルス属微生物由来の酸性プロテアーゼの例は、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来酸性プロテアーゼ (例えば天野エンザイム株式会社が提供するプロテアーゼM「アマノ」SD及びプロテアーゼHF「アマノ」150SD) である。

[0017] アスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼの例は、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来中性プロテアーゼ、及びアスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来中性プロテアーゼであり、例えば、天野エンザイム株式会社が提供する、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来中性プロテアーゼ (PR-AX、製品名はプロテアックス)、アス

ペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来中性プロテアーゼ (PR-ASD、製品名はプロテアーゼA「アマノ」SD)、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来中性プロテアーゼ (PR-P6SD、製品名はプロテアーゼP「アマノ」6SD)、及びアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来中性プロテアーゼ (PR-AN100SD) である。

[0018] 糸状菌由来プロテアーゼは精製品でなくてもよく、例えば、糸状菌由来プロテアーゼを産生する微生物の培養液、破碎液／抽出物、これらの部分精製物等を用いることにしてもよい。2種類以上の糸状菌由来プロテアーゼを併用することにしてもよい。尚、いくつかの糸状菌由来プロテアーゼが市販されており（例えば、上記のプロテアーゼM「アマノ」SD、プロテアーゼHF「アマノ」150S、並びにプロテアックス、プロテアーゼA「アマノ」SD、プロテアーゼP「アマノ」6SD、PR-AN100SD）、容易に入手及び利用可能である。

[0019] 細菌プロテアーゼとしては、金属プロテアーゼが好ましい。細菌プロテアーゼの由来としては、好ましくは、バチルス属又はジオバチルス属微生物由来プロテアーゼを挙げることができ、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を挙げることができる。細菌プロテアーゼの一例としては、天野エンザイム株式会社が提供するサモアーゼPC10Fを挙げることができる。

[0020] 細菌プロテアーゼは精製品でなくてもよく、例えば、細菌プロテアーゼを産生する微生物の培養液、破碎液／抽出物、これらの部分精製物等を用いることにしてもよい。2種類以上の細菌プロテアーゼを併用することにしてもよい。尚、いくつかの細菌プロテアーゼが市販されており（例えば、上記のサモアーゼPC10F）、容易に入手及び利用可能である。

[0021] γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを含む本発明の酵素剤は、有効成分（上記の3種の酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを含有していてもよい。賦形剤としては乳糖、ソルビトール、D-マンニトール、マルトデキストリン、白糖等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸

塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

[0022] 本酵素剤における有効成分（上記の3種の酵素）の含有量は特に限定されず、適宜設定できる。

本発明の酵素剤は通常、固体状（例えば、顆粒、粉体、シリカや多孔質ポリマー等の表面又は内部に酵素を固定させうる素材に当該酵素を固定化した固定化酵素）又は液体状で提供される。

[0023] タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる条件は、例えば反応温度15°C~70°C、好ましくは30°C~65°C、更に好ましくは40°C~60°Cである。

反応時間及び酵素量は、期待される作用が発揮される限り特に限定されない。反応時間の例として5分~48時間、好ましくは10分~12時間、更に好ましくは15分~6時間を挙げることができる。酵素量については、反応液中の3種類の酵素のうちのそれぞれの酵素の濃度が、例えば0.001%(W/W)~10%(W/W)、好ましくは0.01%(W/W)~2%(W/W)となる量とすることができる。

[0024] タンパク質材料としては、好ましくは、動物性タンパク質材料、植物性タンパク質材料又は微生物性タンパク質材料であり、より好ましくは植物性タンパク質材料である。タンパク質材料の具体例としては、エンドウ豆、大豆、そら豆、ひよこ豆、大麦、小麦、オーツ麦、米、そば、ひえ、あわ、ヘンプ、藻類、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クルミ、ブラジルナッツ、ピーナッツ、ココナッツ由来タンパク質材料を挙げることができる。

[0025] 本発明によれば、メイラード反応を形成可能なシステインを多く含有するタンパク質分解物（システイン含有タンパク質分解物）を製造することができる。メイラード反応を形成可能なシステインは、遊離アミノ酸の状態のシ

ステインの他に、メイラード反応が可能な状態のシステイン残基を有するペプチドも含まれる。好ましくは遊離アミノ酸の状態のシステインが挙げられる。

本発明によればさらに、本発明によるシステイン含有タンパク質分解物の製造方法により製造されるシステイン含有タンパク質分解物を含む、食品が提供される。

[0026] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0027] <実施例 1 >

タンパク質からシステインを効率的に生成する方法の確立を目指して以下の実験を行った。

[0028] 1. システイン生成の検討

(1) 方法

12gの各種タンパク質材料を水に懸濁してタンパク質溶液(15%(W/W)、pH5)を調製した。1.4gの糸状菌プロテアーゼ(プロテアーゼHF「アマノ」150SD、天野エンザイム株式会社)と0.7gのグルタミナーゼ(グルタミナーゼSD-C100S、天野エンザイム株式会社)、0.7gの細菌プロテアーゼ(サモアーゼPC10F、天野エンザイム株式会社)を水20mLに溶解して酵素溶液を調製した。50℃のタンパク質溶液30mLに酵素溶液を1mL添加後、混合して、50℃で2時間処理した。処理液を遠心分離後、上清を回収した。上清に含まれるシステインのチオール基をDTNB試薬を用いて定量した。0.1Mトリス緩衝液(1mMEDTA、pH7.05)2.6mLに25mMEDTA溶液(50mM酢酸アンモニウム、1mMEDTA、pH5.0)0.2mLと適当な濃度に希釈した上清0.2mLを加えて混合後、反応が完了するまで10~15分待った。反応完了後、すぐに412nmの吸光度を測定した。上清の代わりに10μM~50μMのシステイン溶液(1mMEDTA)を用いて

作成した検量線から上清中のシステイン残基の量を算出した。また、呈味性変化を確認するために、上清を塩酸でpH7に中和したものを2 mL取り、20%グルコースを1 mL添加して、30分煮沸することでメイラード反応させたもののコク味を確認した。具体的には、パネラーによる官能評価によって呈味性の変化を確認した。

[0029] (2) 結果

酵素処理によって全てのタンパク質材料において、システインの遊離を確認できた。また、ヘンプタンパク質以外ではメイラード反応物において、肉風味の重要な要素であるコク味の向上も確認できた。ヘンプタンパク質に関しては、ヘンプ特有の風味が強すぎてコク味の変化を確認することが出来なかった。

[0030] [表1]

タンパク質材料	製品名	タンパク含量	システイン量 ($\mu\text{g/g}$ 原料タンパク質)	メイラード反応後のコク味の変化
エンドウタンパク質	PURIS Pea 870 (PURIS社)	80%	3.5	向上
コメタンパク質	Organic brown rice protein (Zen Principle社)	80%	6.4	向上
大豆タンパク質	Soy Protein Isolate (NOW Sports社)	83%	11.5	向上
ヘンプタンパク質	hemp protein (Nutiva社)	50%	13.8	-
アーモンドタンパク質	Almond Protein Powder (Noosh社)	60%	6.8	向上
オーツ麦粉末	Whole Oat (Muscle Feast社)	18%	33.9	向上
藻類タンパク質	Whole Algal Protein (AlgaVia社)	63%	15.3	向上

[0031] <実施例2>

大豆ミート (大豆TVP (Textured Vegetable Pr

rotein) (ダイズラボ 大豆のお肉 ミンチタイプ、マルコメ社) 70gに、105g (1.5倍量)の水を添加し、10分間静置した。上記混合物に、Metolose 8.7g、ひまわり油48.5g、及びサンラバー10 (大豆タンパク粉) 26.7gを均一になるように混合した。上記混合物25gに、下記の表2に示す酵素液1% (大豆TVPに対して)を添加し、50℃において1時間反応させた。反応後、水を6mL添加して成型した後、焼成 (オーブンで110℃、10分)した。得られた焼成物について官能評価 (旨味と香りの5段階評価)を行った。官能評価の結果を表3に示す。酵素なしを基準として数字が大きいほど向上していることを示しており、1は変化なし、4は大きく向上していることを示す。

[0032] [表2]

表2：酵素剤組成：50%糸状菌プロテアーゼ (A) +25%細菌金属プロテアーゼ+25%グルタミナーゼ (細菌金属プロテアーゼとグルタミナーゼは実施例1と同じもの)

	(A)
1	A. oryzae 由来酸性プロテアーゼ (PR-HF150SD)
2	A. oryzae 由来中性プロテアーゼ (PR-AX)
3	A. oryzae 由来中性プロテアーゼ (PR-ASD)
4	A. mellesius 由来中性プロテアーゼ (PR-P6SD)
5	A. oryzae 由来中性プロテアーゼ (PR-AN100SD)
6	A. oryzae 由来酸性プロテアーゼ (PR-MSD)

[0033] [表3]

表3：官能評価の結果

	旨味	香ばしさ
酵素なし	1	1
1	2.5	2
2	3	3
3	3	3
4	3	3
5	3	4
6	2.5	2

[0034] 得られた焼成物の固さを以下の条件において評価した。

使用機器：レオメーター (COMPAC-100II)

押し込み速度：60mm/min

台の移動距離：7 mm

(肉に触れてから7 mmの位置の固さを測定する)

固さの評価の結果を図1に示す。図1の縦軸の単位は、N (ニュートン) である。

[0035] 得られた焼成物における遊離アミノ酸を以下の通り分析した。

焼成物のサンプル1 gに蒸留水1 mLを添加し、混合し、遠心分離した。上清とエタノールとを、上清：エタノール=1：1で混合した(タンパク質の除去)。混合物を遠心分離し、上清を回収し、水で12.5倍に希釈し、精密ろ過膜(MF)でろ過し、HPLC分析を行った。HPLC分析の条件は以下の通りである。遊離アミノ酸の分析結果を図2に示す。

[0036] Agilent HPLC (1260 InfinityII)

A buffer : 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ pH 8.2

B buffer : メタノール : アセトニトリル : 水 = 45 : 45 : 10

カラム : HPH-C18 2.7 μm 3.0 \times 100 mm (Poroshell)

流量 : 0.65 mL/min

0-0.35 min : A : 96%, B : 4%

0.35-13.4 min : A : 43%, B : 57%

13.4-13.5 min : A : 0%, B : 100%

13.5-15.7 min : A : 0%, B : 100%

15.7-15.8 min : A : 96%, B : 4%

15.8-18 min : A : 96%, B : 4%

[0037] <実施例3>

10% (w/v) 植物性タンパク質溶液(エンドウ: pea protein (うすき製薬)、大豆: サンラバー10 (不二製油)) に対して、植物タンパク質重量に対して4%の酵素を添加した(2%糸状菌プロテアーゼ+1%細菌プロテアーゼ+1%グルタミナーゼ)。混合物を50°Cで2時間、

400 rpmで処理して反応させた。反応物を10分間煮沸し、遠心分離し、上清を回収した。得られたサンプル上清について、官能評価及び遊離アミノ酸分析を行った。

[0038] (官能評価)

サンプル上清4 mLを採取し、20%グルコースを2 mL添加した。得られた混合物を煮沸水に入れ、30分間処理し、官能評価を行った。結果を表4に示す。酵素なしを基準として数字が大きいほど向上していることを示しており、1は変化なし、5は大きく向上していることを示す。

[0039] [表4]

原料	酵素	味	匂い	うま味数値
エンドウ	なし	うま味とコク味なし	甘い匂い	1
	1	少しうま味とコク味がある	香ばしい匂い	2
	2	うま味とコク味あり	香ばしい匂い	3
	3	うま味とコク味あり	香ばしい匂い	3
	4	うま味とコク味あり	香ばしい匂い	3
	5	うま味とコク味あり	香ばしい匂い	3
	6	少しうま味とコク味がある	香ばしい匂い	2
大豆	なし	うま味とコク味なし	甘い匂い	1
	1	少しうま味あり	香ばしい匂い	2
	2	うま味強い	香ばしい匂い	3
	3	うま味強い	香ばしい匂い	3
	4	うま味強い	香ばしい匂い	3
	5	うま味強い	香ばしい匂い	4
	6	少しうま味あり	香ばしい匂い	2

[0040] (遊離アミノ酸分析)

サンプル上清とエタノールとを、サンプル上清：エタノール=1：1で混合した(タンパク質の除去)。混合物を遠心分離し、上清を回収し、水で12.5倍に希釈し、精密ろ過膜(MF)でろ過し、HPLC分析(アミノ酸分析)を実施例2と同様の条件で行った。遊離アミノ酸の分析結果を図3～

図6に示す。

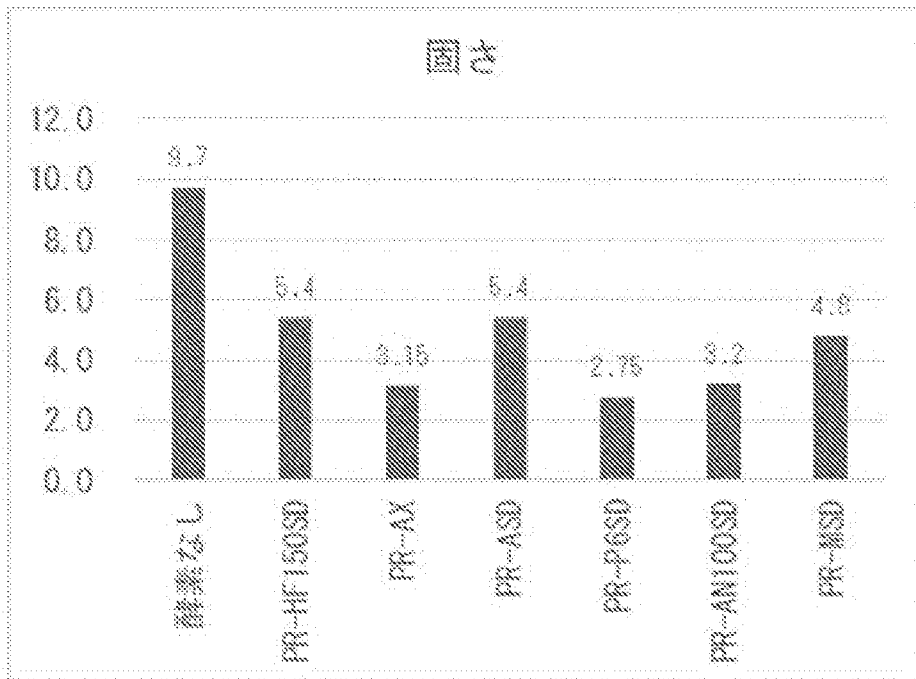
請求の範囲

- [請求項1] タンパク質材料に γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを作用させる工程を含む、システイン含有タンパク質分解物の製造方法。
- [請求項2] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がグルタミナーゼ、 γ -グルタルトランスフェラーゼ又は γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス属微生物由来グルタミナーゼである、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス・アミロリケファシエンス由来グルタミナーゼである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス属微生物由来酸性プロテアーゼ又はアスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス・オリゼ由来酸性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ由来中性プロテアーゼ、又はアスペルギルス・メレウス由来中性プロテアーゼである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記タンパク質材料が動物性タンパク質材料、植物性タンパク質材料又は微生物性タンパク質材料である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 前記タンパク質材料が植物性タンパク質材料である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 前記タンパク質材料がエンドウ豆、大豆、そら豆、ひよこ豆、大麦、小麦、オーツ麦、米、そば、ひえ、あわ、ヘンプ、藻類、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、ペカンナッツ、マカダミアナッツ、ピスタチオ、クルミ、ブラジルナッツ、ピーナッツ、ココナッツ

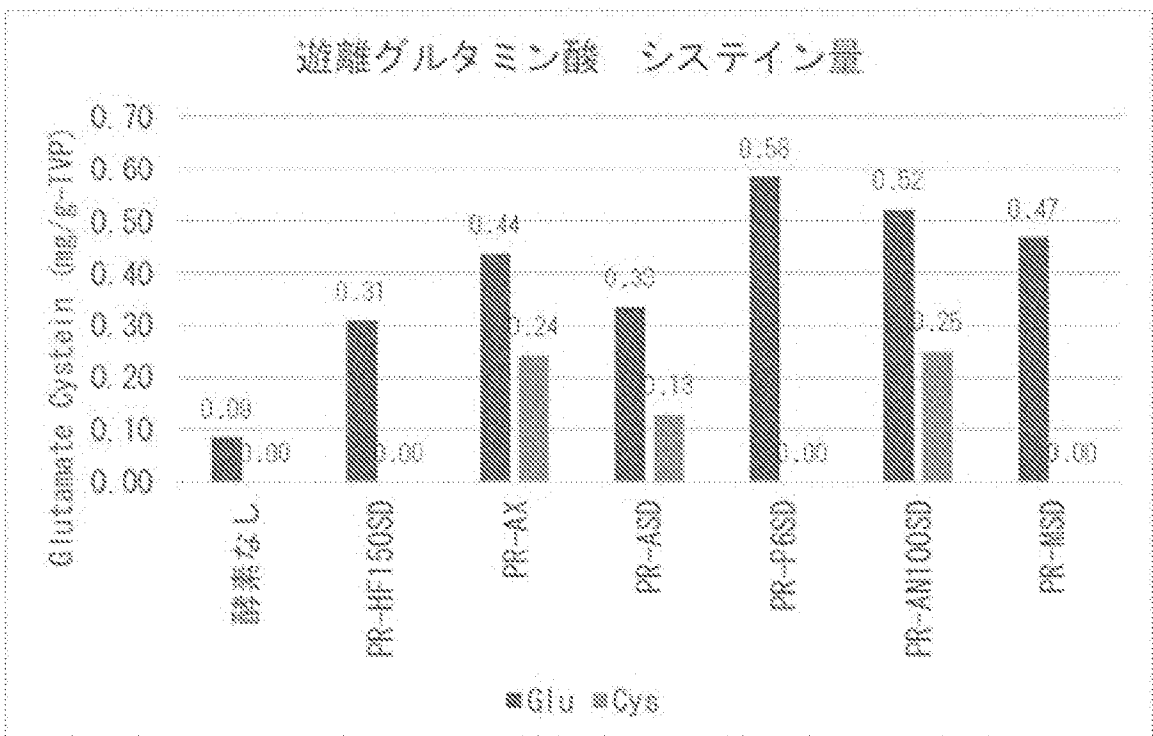
由来タンパク質材料である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項10] 請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法により製造されるシステイン含有タンパク質分解物を含む、食品。
- [請求項11] γ -グルタミルペプチド加水分解酵素、糸状菌由来プロテアーゼ及び細菌プロテアーゼを含む、システイン含有タンパク質分解物の製造のための酵素剤。
- [請求項12] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がグルタミナーゼ、 γ -グルタルトランスフェラーゼ又は γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼである、請求項 11 に記載の酵素剤。
- [請求項13] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス属微生物由来グルタミナーゼである、請求項 11 又は 12 に記載の酵素剤。
- [請求項14] 前記 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素がバチルス・アミロリケファシエンス由来グルタミナーゼである、請求項 11～13 のいずれか一項に記載の酵素剤。
- [請求項15] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス属微生物由来酸性プロテアーゼ又はアスペルギルス属微生物由来中性プロテアーゼである、請求項 11～14 のいずれか一項に記載の酵素剤。
- [請求項16] 前記糸状菌プロテアーゼがアスペルギルス・オリゼ由来酸性プロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼ由来中性プロテアーゼ、又はアスペルギルス・メレウス由来中性プロテアーゼである、請求項 11～15 のいずれか一項に記載の酵素剤。

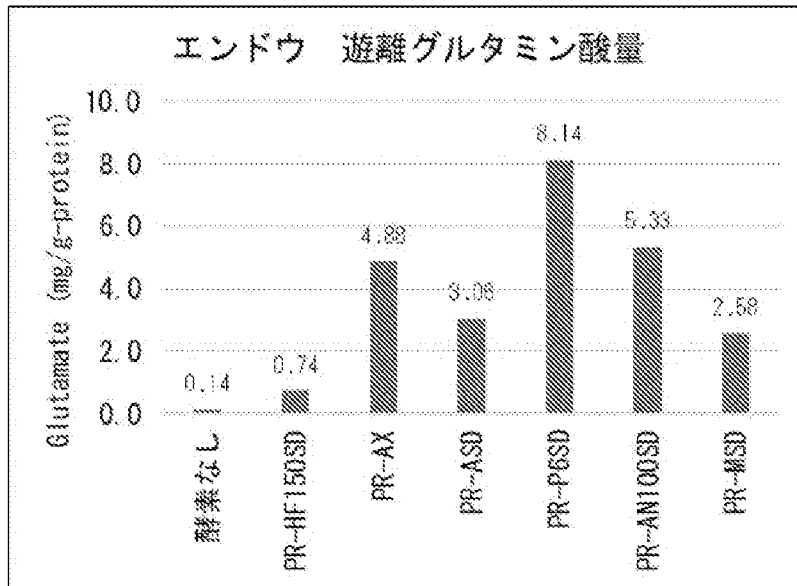
[図1]



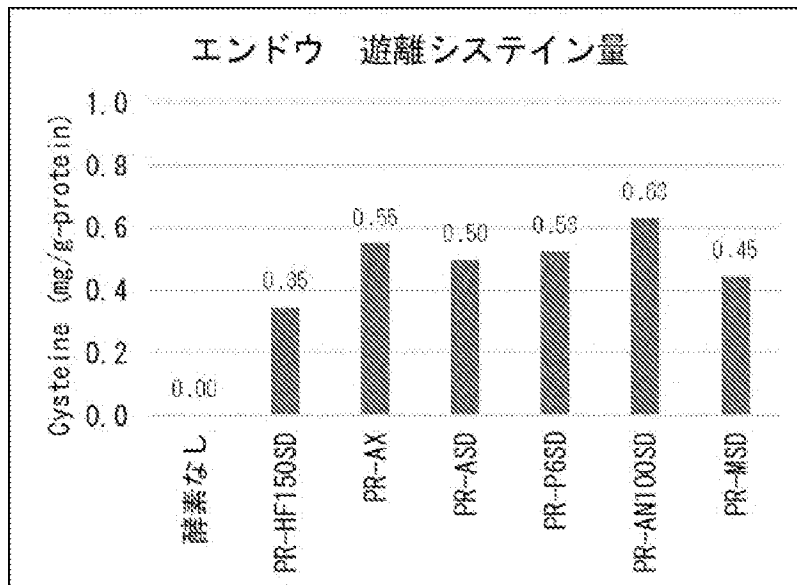
[図2]



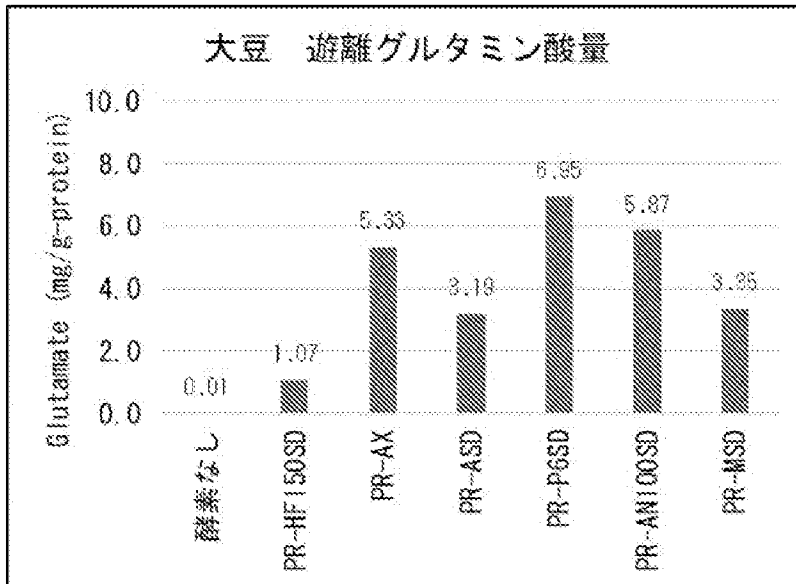
[図3]



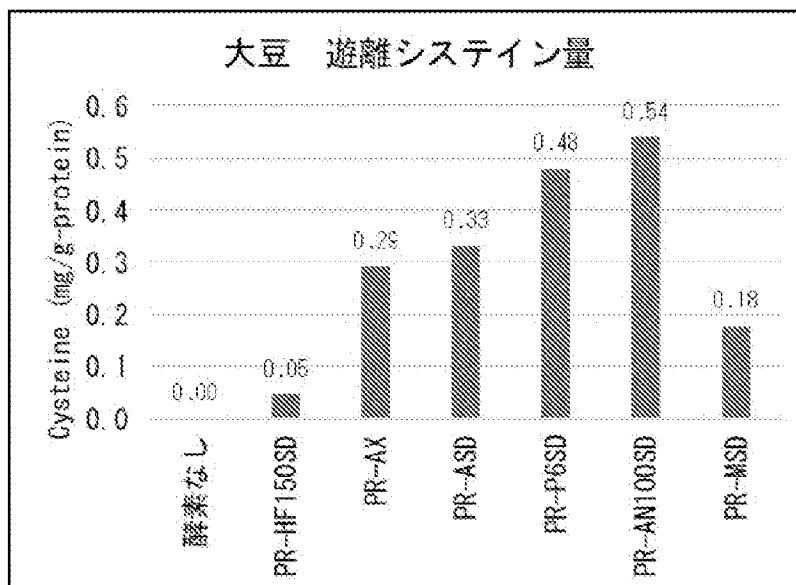
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/010765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>A23J 3/00</i>(2006.01)i; <i>A23J 3/34</i>(2006.01)i; <i>C12P 13/12</i>(2006.01)i; <i>A23L 27/00</i>(2016.01)i; <i>C12N 9/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/52</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/54</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/58</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/62</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/80</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/06</i>(2006.01)i; <i>A23L 33/175</i>(2016.01)i; <i>A23L 33/18</i>(2016.01)i; <i>A23L 33/185</i>(2016.01)i</p> <p>FI: C12P21/06; A23J3/00; A23J3/34; A23L27/00 Z; A23L33/175; A23L33/18; A23L33/185; C12N9/10; C12N9/52; C12N9/54; C12N9/58; C12N9/62; C12N9/80 Z; C12P13/12 B</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A23J3/00; A23J3/34; C12P13/12; A23L27/00; A23L33/175; A23L33/18; A23L33/185; C12N9/10; C12N9/52; C12N9/54; C12N9/58; C12N9/62; C12N9/80; C12P21/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-158495 A (GIVAUDAN SA) 04 September 2014 (2014-09-04) examples, paragraphs [0028], [0034]	10
Y	examples, paragraphs [0028], [0034]	1-16
X	JP 48-082068 A (KIKKOMAN SHOYU CO., LTD.) 02 November 1973 (1973-11-02) experimental example 2, examples	10
Y	experimental example 2, examples	1-16
Y	WO 2021/002195 A1 (AMANO ENZYME INC.) 07 January 2021 (2021-01-07) claims, examples, paragraph [0013]	1-16
A	JP 2001-321118 A (AJINOMOTO CO., INC.) 20 November 2001 (2001-11-20) entire text, all drawings	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 April 2022		10 May 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		
		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/010765

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-158495 A	04 September 2014	US 2011/0045138 A1 example, paragraphs [0024], [0034] EP 2625967 A1 WO 2009/114954 A1	
JP 48-082068 A	02 November 1973	(Family: none)	
WO 2021/002195 A1	07 January 2021	(Family: none)	
JP 2001-321118 A	20 November 2001	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A23J 3/00(2006.01)i; A23J 3/34(2006.01)i; C12P 13/12(2006.01)i; A23L 27/00(2016.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 9/52(2006.01)i; C12N 9/54(2006.01)i; C12N 9/58(2006.01)i; C12N 9/62(2006.01)i; C12N 9/80(2006.01)i; C12P 21/06(2006.01)i; A23L 33/175(2016.01)i; A23L 33/18(2016.01)i; A23L 33/185(2016.01)i FI: C12P21/06; A23J3/00; A23J3/34; A23L27/00 Z; A23L33/175; A23L33/18; A23L33/185; C12N9/10; C12N9/52; C12N9/54; C12N9/58; C12N9/62; C12N9/80 Z; C12P13/12 B</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A23J3/00; A23J3/34; C12P13/12; A23L27/00; A23L33/175; A23L33/18; A23L33/185; C12N9/10; C12N9/52; C12N9/54; C12N9/58; C12N9/62; C12N9/80; C12P21/06</p> <p>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</p> <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 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年													
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																						
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																						
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2014-158495 A (ジボダン エス エー) 04.09.2014 (2014 - 09 - 04) 実施例、 [0028]、 [0034]</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>実施例、 [0028]、 [0034]</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 48-082068 A (キツコーマン醤油株式会社) 02.11.1973 (1973 - 11 - 02) 実験例 2、実施例</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>実験例 2、実施例</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2021/002195 A1 (天野エンザイム株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲、実施例、 [0013]</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2001-321118 A (味の素株式会社) 20.11.2001 (2001 - 11 - 20) 全文、全図</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			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	JP 2014-158495 A (ジボダン エス エー) 04.09.2014 (2014 - 09 - 04) 実施例、 [0028]、 [0034]	10	Y	実施例、 [0028]、 [0034]	1-16	X	JP 48-082068 A (キツコーマン醤油株式会社) 02.11.1973 (1973 - 11 - 02) 実験例 2、実施例	10	Y	実験例 2、実施例	1-16	Y	WO 2021/002195 A1 (天野エンザイム株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲、実施例、 [0013]	1-16	A	JP 2001-321118 A (味の素株式会社) 20.11.2001 (2001 - 11 - 20) 全文、全図	1-16
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	JP 2014-158495 A (ジボダン エス エー) 04.09.2014 (2014 - 09 - 04) 実施例、 [0028]、 [0034]	10																					
Y	実施例、 [0028]、 [0034]	1-16																					
X	JP 48-082068 A (キツコーマン醤油株式会社) 02.11.1973 (1973 - 11 - 02) 実験例 2、実施例	10																					
Y	実験例 2、実施例	1-16																					
Y	WO 2021/002195 A1 (天野エンザイム株式会社) 07.01.2021 (2021 - 01 - 07) 特許請求の範囲、実施例、 [0013]	1-16																					
A	JP 2001-321118 A (味の素株式会社) 20.11.2001 (2001 - 11 - 20) 全文、全図	1-16																					
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																							
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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										
* 引用文献のカテゴリー	“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																						
“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	“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																						
“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	“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																						
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																						
“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																							
<p>国際調査を完了した日</p> <p>18.04.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>10.05.2022</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>布川 莉奈 40 6220</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3443</p>																						

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/010765

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2014-158495	A	04.09.2014	US 2011/0045138 A1 実施例、[0024]、 [0034] EP 2625967 A1 WO 2009/114954 A1	
JP	48-082068	A	02.11.1973	(ファミリーなし)	
WO	2021/002195	A1	07.01.2021	(ファミリーなし)	
JP	2001-321118	A	20.11.2001	(ファミリーなし)	