(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
2021年12月23日(23.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/256507 A1

(51) 国際特許分類:
A23C 11/10 (2021.01) *A23L 11/60* (2021.01)
A23L 5/00 (2016.01) *A23L 11/65* (2021.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/022866

(22) 国際出願日： 2021年6月16日(16.06.2021)

(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 2020-103889 2020年6月16日(16.06.2020) JP

(71) 出願人:合同酒精株式会社(**GODO SHUSEI CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０ Chiba (JP).

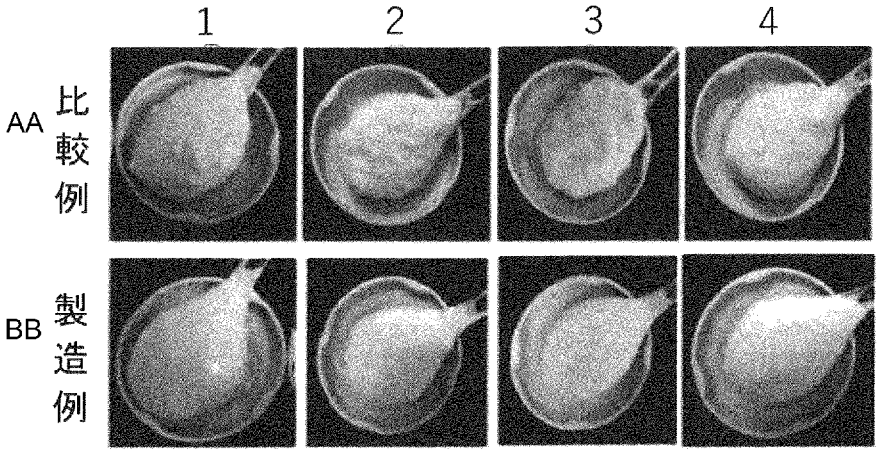
(72) 発明者: 品田 敦子 (**SHINADA, Atsuko**); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０ 合同酒精株式会社内 Chiba (JP). 馬場 将弘(**BABA, Masahiro**); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０ 合同酒精株式会社内 Chiba (JP). 平間 岳史(**HIRAMA, Takeshi**); 〒2710064 千葉県松戸市上本郷字仲原２５０ 合同酒精株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 伊藤 温 (**ITOH, Atsushi**); 〒1040045 東京都中央区築地４－１－１ 東劇ビル４階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING PLANT-BASED MILK FERMENTATION PRODUCT

(54) 発明の名称： 植物性ミルク発酵物の製造方法



AA Comparative examples
BB Production examples

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a production method for producing a plant-based milk fermentation product by making a protease or a cellulase act on a plant-based milk, whereby it is possible to produce a plant-based milk fermentation product having a reduced bitter taste without the need to perform an enzyme deactivation process. The method for producing a plant-based milk fermentation product comprises carrying out a first step for mixing a plant-based milk with a lactic acid bacterium to produce a mixed solution and a second step for fermenting the mixed solution in this order, and is characterized in that a step for adding a protease originated from the genus Paenibacillus or

WO 2021/256507 A1

［続葉有］

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, 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)）

a protease originated from the genus Trichoderma to the plant-based milk or the mixed solution (a protease addition step) or a step for adding a cellulase originated from the genus Trichoderma to the plant-based milk or the mixed solution (a cellulase addition step) is carried out prior to the completion of the second step.

(57) 要約：本発明は、植物性ミルクにプロテアーゼまたはセルラーゼを作用させた植物性ミルク発酵物において、酵素失活工程を行わなくても苦味の少ない植物性ミルク発酵物を得ることができる製造方法を提供することを目的とする。植物性ミルクと、乳酸菌と、を混合し、混合液を得る第１工程と、前記混合液を発酵させる第２工程と、を順次行う植物性ミルク発酵物の製造方法であって、上記第２工程が終了する前に、前記植物性ミルク又は前記混合液にペニバチルス属由来のプロテアーゼまたはトリコデルマ属由来のプロテアーゼを添加する工程（プロテアーゼ添加工程）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼを添加する工程（セルラーゼ添加工程）を行うことを特徴とする植物性ミルク発酵物の製造方法。

明　細　書

発明の名称 ： 植物性ミルク発酵物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、植物性ミルク発酵物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 植物性ミルクは植物から採れる。大豆から得られる植物性ミルクとして豆乳がある。この豆乳に乳酸菌を加え発酵させた、豆乳発酵物が知られている（例えば、特許文献１参照）。

特許文献１には、大豆乳に蛋白分解酵素を作用させた後に乳酸菌スタータを接種発酵せしめた大豆飲料が記載されている。実施例には、大豆から得た豆乳にパパインを反応させて酵素処理豆乳を得た後、乳酸菌スタータ（ラクトバチルス・ブルガリカスとラクトバチルス・アシドフィラスの培養液を所定の割合で混合した混合液）を加え、３５～４０℃で６～１２時間発酵させることが記載されている。得られた飲料は、苦味が評価されている。

豆乳に蛋白分解酵素（プロテアーゼ）を作用させると、乳酸菌スタータで発酵させても苦味が生じる問題があった。

[0003] この問題を改善する方法として、例えば、特許文献２に記載の方法が挙げられる。

特許文献２には、ペプチド結合加水分解酵素により豆乳を加水分解する酵素処理工程と、前記ペプチド結合加水分解酵素を失活させて発酵基質を得る酵素失活工程と、前記発酵基質をラクトバチラス・ブレビス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｂｒｅｖｉｓ）に属する乳酸菌で発酵する発酵工程と、を備える、豆乳発酵物の製造方法が記載されている。

上記酵素失活工程の実施により、発酵工程におけるペプチド結合加水分解酵素による加水分解を抑えることができるため、豆乳発酵物の苦味を低減できることが記載されている（段落００３１）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開昭５５－０８８６５２号公報

特許文献2：特開２０１３－２１５１０７号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献２は、豆乳にペプチド結合加水分解酵素（プロテアーゼ）を作用させた後、乳酸菌による豆乳の発酵工程前に酵素失活工程を挿入することで、豆乳発酵物に苦味を生じしにくくしたことを特徴とする。

しかしながら、酵素失活工程には、６０℃～１００℃で３０分間～１２０分間を要することから（段落００３２）、当該工程を行わなくても苦味の少ない豆乳発酵物を得る方法が求められていた。

苦味のある食品は消費者に好まれない傾向にある。苦味の少ない豆乳発酵物のみならず、苦味の少ない植物性ミルク発酵物についても潜在的な需要がある。

[0006] そこで、本発明は、豆乳等の植物性ミルクにプロテアーゼ等の酵素を作用させた植物性ミルク発酵物において、酵素失活工程を行わなくても苦味の少ない植物性ミルク発酵物を得ることができる製造方法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] 本発明者らは、植物性ミルクに特定のプロテアーゼまたはセルラーゼを添加して乳酸菌発酵することにより、酵素失活工程を行わなくても苦味の少ない植物性ミルク発酵物を得ることができることを見出し、本発明を完成した。

[0008] （Ａ）植物性ミルクと、乳酸菌と、を混合し、混合液を得る第１工程と、

前記混合液を発酵させる第２工程と、

を順次行う植物性ミルク発酵物の製造方法であって、

上記第２工程が終了する前に、前記植物性ミルク又は前記混合液にペニバ

チルス属由来のプロテアーゼまたはトリコデルマ属由来のプロテアーゼを添加する工程（プロテアーゼ添加工程）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼを添加する工程（セルラーゼ添加工程）を行うことを特徴とする植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｂ）前記プロテアーゼ添加工程または前記セルラーゼ添加工程を前記第１工程と略同時に行うことを特徴とする（Ａ）記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｃ）前記ペニバチルス属由来のプロテアーゼの添加量または前記トリコデルマ属由来のプロテアーゼの添加量が、前記植物性ミルクの全質量を基準として０．００１～２０．０ＰＵ／ｇである、（Ａ）又は（Ｂ）記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｄ）前記セルラーゼの添加量が、前記植物性ミルクの全質量を基準として、ＦＰａｓｅ活性が０．００１～１Ｕ／ｇであり、ＣＭＣａｓｅ活性が０．０００１～２２Ｕ／ｇである、（Ａ）～（Ｃ）のいずれかに記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｅ）前記植物性ミルクに含まれるタンパク質が０．１質量％～２０質量％の範囲にある、（Ａ）～（Ｄ）のいずれかに記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｆ）前記プロテアーゼ添加工程及び前記セルラーゼ添加工程を行うことを特徴とする（Ａ）～（Ｅ）のいずれかに記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（Ｇ）前記プロテアーゼが、下記の（１）～（５）の性質を有することを特徴とする（Ａ）～（Ｆ）のいずれかに記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

（１）ペニバチルス属に属する細菌により産生され、

（２）ｐＨ５．５～９．０で安定であり、至適ｐＨが７．０～８．０であり、

（３）２０～７５℃で作用し、至適温度が５０～６０℃であり、

（４）ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量が３２，０００～３４，０００Ｄａと推定されるプロテアーゼ

（Ｈ）前記植物性ミルクが、豆乳、アーモンドミルク、オーツミルクおよびマカダミアナッツミルクから選択される少なくとも一種またはこれらの抽出物または濃縮物を含む（Ａ）～（Ｇ）のいずれかに記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、豆乳等の植物性ミルクに特定のプロテアーゼまたは特定のセルラーゼを作用させた豆乳発酵物等の植物性ミルク発酵物において、酵素失活工程を行わなくても苦味の少ない植物性ミルク発酵物を得ることができる製造方法を提供することができる。当該製造方法によれば、乳酸菌の発酵促進作用が認められ、発酵時間を短くすることができる。

上記製造方法によって得られた豆乳発酵物は、滑らかな食感であり、離水が少なく、大豆臭が低減する効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]製造例１～４及び比較例１～４の豆乳発酵物を撹拌した後、スプーンですくいとったときの外観写真である。

[図2]製造例５～８及び比較例５～８の豆乳発酵物を撹拌した後スプーンですくい取ったときの外観写真である。

[図3]製造例１～４及び比較例１～４の豆乳発酵物の破断強度解析結果である。

[図4]製造例５～８及び比較例５～８の豆乳発酵物の破断強度解析結果である。

[図5]製造例１～４及び比較例１～４の豆乳発酵物のテクスチャ解析結果である。

[図6]製造例５～８及び比較例５～８の豆乳発酵物のテクスチャ解析結果である。

[図7]製造例１～４及び比較例１～４の豆乳発酵物の発酵経過を示した図であ

る。

[図8]製造例５～８及び比較例５～８の豆乳発酵物の発酵経過を示した図である。

[図9]参考例１及び比較例９の豆乳発酵物の発酵経過を示した図である。

[図10]製造例９～１１及び比較例１０の豆乳発酵物の破断強度解析結果である。

[図11]製造例９～１１及び比較例１０の豆乳発酵物の離水率の評価結果である。

[図12]製造例９～１１及び比較例１０の豆乳発酵物の発酵経過を示した図である。

[図13]製造例１２～１６及び比較例１１の豆乳発酵物の破断強度解析結果である。

[図14]製造例１２～１６及び比較例１１の豆乳発酵物の離水率の評価結果である。

[図15]製造例１２～１６及び比較例１１の豆乳発酵物の発酵経過を示した図である。

[図16]製造例１９及び比較例１３のアーモンドミルク発酵物について、発酵経過（左上）、破断強度解析（右上）、離水抑制（左下）およびテクスチャ解析（右下）を評価した結果である。

[図17]製造例２１及び比較例１５のアーモンドミルク発酵物について、発酵経過（左上）、破断強度解析（右上）、離水抑制（左下）およびテクスチャ解析（右下）を評価した結果である。

[図18]製造例２２及び比較例１６のオーツミルク発酵物について、発酵経過を示した図である。

[図19]製造例２３及び比較例１７のマカダミアナッツミルク発酵物について、発酵経過を示した図である。

[図20]製造例２４及び比較例１８のオーツミルク発酵物について、発酵経過を示した図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明に係る豆乳発酵物等の植物性ミルク発酵物の製造方法は、

豆乳等の植物性ミルクと、乳酸菌と、を混合し、混合液を得る第１工程と、

前記混合液を発酵させる第２工程と、

を順次行う植物性ミルク発酵物の製造方法であって、

上記第２工程が終了する前に、前記植物性ミルク又は前記混合液にペニバチルス属由来のプロテアーゼを添加する工程またはトリコデルマ属由来のプロテアーゼを添加する工程（プロテアーゼ添加工程）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼを添加する工程（セルラーゼ添加工程）を行うことを特徴とする。植物性ミルクにペニバチルス属由来のプロテアーゼまたはトリコデルマ属由来のセルラーゼを作用させた後、当該プロテアーゼまたは当該セルラーゼを失活させる別途の工程を設ける必要はない。ペニバチルス属由来のプロテアーゼ（以下、Ｐプロテアーゼという場合がある）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼ（以下、Tセルラーゼという場合がある）を作用させた豆乳等の植物性ミルクに苦味は生じないことに加え、この豆乳等の植物性ミルクを乳酸菌発酵しても豆乳発酵物等の植物性ミルク発酵物に苦味は生じない。Pプロテアーゼまたはセルラーゼの添加量が増えるにつれ、植物性ミルクに苦味を生じる場合があるが、当該植物性ミルクを乳酸菌発酵することによって、苦味は低減する。植物性ミルク発酵物に苦味を生じた場合、Ｐプロテアーゼまたはセルラーゼの添加量を減少してもよく、Ｐプロテアーゼまたはセルラーゼの反応時間を減少させても良い。

ここでいう別途の工程とは、ＰプロテアーゼおよびTセルラーゼを失活させるための専用工程を新たに設けることをいい、第１工程または第２工程においてＰプロテアーゼおよびTセルラーゼが失活する場合は含めない。第１工程または第２工程においてＰプロテアーゼおよびTセルラーゼが失活しても良い。Ｐプロテアーゼは中性域で作用しやすく、酸性では失活する性質がある。トリコデルマ属由来のプロテアーゼ及びＴセルラーゼは弱酸性域に至適ｐＨ

があり、発酵経過しても失活しにくい性質がある。

例えば、乳酸菌による豆乳の発酵が進むにつれｐＨが低下することに伴い、Ｐプロテアーゼ活性は減少し、トリコデルマ属由来のプロテアーゼおよびTセルラーゼ活性は維持される。第２工程の進行に伴いＰプロテアーゼ活性の低下が進み、豆乳発酵物のｐＨによってはＰプロテアーゼが失活する場合または機能しない状態で存在する場合もある。豆乳のみならず、他の植物性ミルクにおいても、植物性ミルクの発酵が進むにつれｐＨが低下する傾向にある。

[0012] プロテアーゼ添加工程およびセルラーゼ添加工程は、第１工程の前または第１工程と略同時から選択される１つ以上のタイミングで、行うことが好ましい。２以上のタイミングで行うことも可能である。プロテアーゼ添加工程後に、豆乳に含まれるタンパク質の分解が行われる。プロテアーゼ添加工程とセルラーゼ添加工程を同時に行っても良いし、別々に行っても良い。

本発明においては、第１工程と略同時にプロテアーゼ添加工程およびセルラーゼ添加工程を行うことが好ましい。略同時とは、使用する乳酸菌の生育速度によって変化する相対的なものであって、使用する乳酸菌が誘導期に該当することを意味する。使用する乳酸菌が複数存在する場合、その少なくとも一つが誘導期に該当すればよい。使用する乳酸菌が誘導期に該当する時期にプロテアーゼ添加工程およびセルラーゼ添加工程を行うことで、乳酸菌による豆乳等の植物性ミルクの発酵速度が向上する。

[0013] 以下、本発明に使用することができる材料を中心に説明する。

[0014] ≪植物性ミルク発酵物の原材料≫

＜Ｐプロテアーゼ＞

Ｐプロテアーゼは、以下の性質を有する。

（１）ペニバチルス属に属する細菌により産生され、

（２）至適ｐＨは７．０～８．０であり、

（３）ｐＨ５．５～９．０で安定である中性プロテアーゼであり、

（４）２０～７５℃で作用し、至適温度が５５℃であり、

（５）電気泳動法による分子量が３２，０００～３４，０００Ｄａと推定される。

ペニバチルス属は旧来バチルス属に分類されていたが、近年再分類され、新たな属として提案された。上記の性質を有するプロテアーゼは、バチルス・ポリミキサから再同定されたペニバチルス・ポリミキサ或いはペニバチルス・エスピーを含む別の種から得ることができる。文献等によっては、バチルス・ポリミキサと表示されている場合があるが、同義である。

[0015] Ｐプロテアーゼは、詳細には、次の性質を有する。

（ａ）作用

中性プロテアーゼとしての一般的性質を示し、ｐＨの中性範囲でカゼイン、ヘモグロビンなどの蛋白質を分解してペプチド乃至遊離のアミノ酸を生成する。

酸化インシュリンのＢ鎖に対してはＰｈａ（１）－Ｖａｌ（２）、Ｈｉｓ（５）－Ｌｅｕ（６）、Ｈｉｓ（１０）－Ｌｅｕ（１１）、Ｇｌｕ（１３）－Ａｌａ（１４）、Ａｌａ（１４）－Ｌｅｒ（１５）、Ｌｅｒ（１５）－Ｔｙｒ（１６）、Ｔｙｒ（１６）－Ｌｅｕ（１７）、Ｌｅｕ（１７）－Ｖａｌ（１８）、Ｇｌｙ（２３）－Ｐｈｅ（２４）、Ｐｈｅ（２４）－Ｐｈｅ（２５）、Ｐｈｅ（２５）－Ｔｙｒ（２６）及びＬｙｓ（２９）－Ａｌａ（３０）の１２ヶ所のペプチド結合を切断することが確認されている。

（ｂ）安定ｐＨ範囲

安定ｐＨ範囲：５．５～９．０の範囲で極めて安定である。

（ｃ）作用適温の範囲

２０℃～７５℃の範囲で作用し、至適温度は５０～６０℃である。最適温度は５５℃である。

（ｄ）ｐＨ、温度などによる失活の条件

ｐＨ３．０以下及びｐＨ１０．０以上では、活性は完全になくなる。また、６５℃、１０分間の加熱処理により、完全に失活する。

（ｅ）阻害、活性化及び安定化

エチレンジアミンテトラアセテート（ＥＤＴＡ）、クエン酸、Ｏ－フェナンスロリン、２，２－ジピリジル、フッ化ソーダのごとき、金属キレート剤、及びＮ－ブロモサクシニイミド（ＮＢＳ）、沃素のごとき酸化剤によって阻害される。

カルシウムイオンにより安定化され、活性には亜鉛イオンが必要である。

（ｆ）分子量

電気泳動法による分子量は、３２，０００～３４，０００Ｄａと推定される。

[0016] プロテアーゼは、その触媒部位により、以下の５種類に分類される。酸性プロテアーゼ（触媒部位；アスパラギン酸、例；ペプシン）、金属プロテアーゼ（触媒部位；金属）、セリンプロテアーゼ（触媒部位；セリン、例；トリプシン）、システインプロテアーゼ（触媒部位；システインのようなＳＨ基をもつアミノ酸、例えば、パパイン）、及び、これらのうち少なくとも２つを混合した混合型（例えば、アクチナーゼＡＳ）である。本発明で使用するＰプロテアーゼは、中性金属プロテアーゼに分類される。後述するように、中性プロテアーゼの場合、発酵によって豆乳のｐＨが低下することで失活するため、本発明を使用した豆乳発酵物中においてＰプロテアーゼは失活している状態または機能していない状態で存在する。

[0017] Ｐプロテアーゼはエンド型の中性金属プロテアーゼである。エンド型のプロテアーゼは、タンパク質を大まかに分解し、低分子化する作用を有する。豆乳等の植物性ミルクにプロテアーゼを作用させると、多くの場合において、苦味を呈する。しかし、豆乳等の植物性ミルクにＰプロテアーゼを作用させても苦味はほとんど生じない。酸味が増すことでフレッシュさが増大するとともに、豆乳臭が低減する効果がある。

[0018] （原料生物の種類）

プロテアーゼは、微生物を含む、非常に広範囲の生物から単離されている。好ましいプロテアーゼは、価格や反応性の面から微生物由来プロテアーゼである。例えば、このようなプロテアーゼとしては、バチルス(Bacillus)属

又はペニバチルス属（paenibacillus）、ジオバチルス属（Geobacillus）、アスペルギルス(Aspergillus)属、リゾプス属（Rhizopus）、リゾムコール属（Rhizomucor）ストレプトマイセス属（Streptomyces）に属する微生物由来のプロテアーゼ、乳酸菌由来のプロテアーゼなどが挙げられる。本発明の酵素として使用できるＰプロテアーゼは、ペニバチルス属（paenibacillus）由来のプロテアーゼであり、具体的には、Paenibacillus polymyxa、Paenibacillus macerans、Paenibacillus pabuli、Paenibacillus peoriae、Paenibacillus thiaminolyticus、Paenibacillus validus、Paenibacillus glucanolyticus、Paenibacillus kobensis、Paenibacillus lautus、Paenibacillus alginolyticus、Paenibacillus alvei、Paenibacillus amylolyticus、Paenibacillus chitinolyticus、Paenibacillus chondroitinus、Paenibacillus curdlanolyticus、Paenibacillus durus、Paenibacillus ehimensis、Paenibacillus sp.からなる群から選択される微生物（細菌）に由来するプロテアーゼである。

[0019] Ｐプロテアーゼは、精製酵素、半精製酵素、粗製酵素、破砕菌体（好ましくは凍結乾燥品）などのいずれの形態でもよい。植物性ミルクに含まれるタンパク質の分解作用を有していればよいが、植物性ミルクに含まれるタンパク質を分解する多くのプロテアーゼは苦味や異味を生じやすいという理由から、ペニバチルス(Paenibacillus)属、特にPaenibacillus polymyxa、又は、１６ｓ　ｒＤＮＡの相同性がPaenibacillus polymyxaの配列と比較して９８％以上であるPaenibacillus属に属する微生物（細菌）、に由来する前述の性質を有する金属プロテアーゼであることが好ましい。これらの属に由来する金属プロテアーゼは、植物性ミルクに添加した場合であっても、植物性ミルクに含まれるタンパク質を分解する作用を有し、かつ、植物性ミルク発酵物に苦味が生じない。酸味が増すことでフレッシュさが増大するとともに、豆乳臭等の植物性ミルク由来の臭いが低減する効果がある。

[0020] 本発明に好適な金属プロテアーゼは、植物性ミルク発酵物の一般的な醗酵温度である４３℃において、アゾカゼインを基質としてｐＨ４．５で、１時

間反応させた場合の残存活性が１０％以下である。当該性質により、植物性ミルク発酵物に当該プロテアーゼ活性が残存せず、保存時に、当該プロテアーゼが植物性ミルク発酵物に悪影響を与えないことが可能となる。

[0021]（Ｐプロテアーゼの製法）

本発明に使用されるＰプロテアーゼは、従来の一般的な方法で微生物から回収され、精製されたものであることができる。従って、当該プロテアーゼの生産は、遺伝子組換え又は非遺伝子組換えによって実施することができる。例えばPaenibacillus polymyxa　ＮＢＲＣ　１５３０９株をＤｉｆｃｏ社製ニュートリエント培地等で培養し、培養物からろ過又は遠心した培養上清として得ることができる。Paenibacillus polymyxaの有効成分（タンパクおよび遺伝子）を同定し、その遺伝子を他の微生物に組み替えて生産しても良い。また、得られた培養上清液をカラムクロマトグラフィーや硫安分画などによって適宜精製して用いることもできる。得られた酵素液の形状は液状の他、スプレードライや凍結乾燥により粉末状にしても良い。その際には日常的に用いられる安定剤や賦形剤を添加しても良い。

[0022]（Ｐプロテアーゼの添加量）

Ｐプロテアーゼは、植物性ミルクの全質量を基準として、０．００１～２０．０ＰＵ／ｇの範囲内であることが好ましく、０．００５～１０．０ＰＵ／ｇの範囲内であることがより好ましく、０．０１～１０．０ＰＵ／ｇの範囲で添加することがさらに好ましく、０．０１～５．０が特に好適である。より好適には０．２５～５．０ＰＵ／ｇの範囲で添加することができる。本範囲内であれば、植物性ミルク発酵物の硬さのムラが減少し、食感がなめらかになるからである。Ｐプロテアーゼの添加量が多くなるほど、Ｐプロテアーゼ無添加の植物性ミルク発酵物と比較して、植物性ミルク発酵物の硬度が下がる（柔らかくなる）傾向にある。特に植物性ミルク発酵物のなかでも、豆乳発酵物やアーモンドミルク発酵物がこの傾向が強い。

[0023]　上記のＰプロテアーゼの添加量（酵素量）は、以下の方法により定義される酵素量１．０ＰＵに基づいて酵素重量当たりの酵素活性として算出するこ

とができる。０．６％カゼイン水溶液（ｐＨ７．５、２ｍＭ酢酸カルシウム含有５０ｍＭトリス塩酸緩衝液）に酵素希釈液１ｍＬを添加し、３０℃で１０分間反応後、トリクロロ酢酸試薬（ｐＨ４．０、１．８％無水酢酸ナトリウム、１．８％トリクロロ酢酸、１．９８％酢酸）５ｍＬを加えて反応を停止し、更に３０℃で３０分静置し、濾過後、２７５ｎｍの吸光度を測定する。この条件下で１分間に１μｇのチロシンに相当するアミノ酸を遊離する酵素量（酵素活性）を１ＰＵ（Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｕｎｉｔ）と定義する。

[0024] ＜Tセルラーゼ＞

Tセルラーゼは、以下の性質を有する。

（１）トリコデルマ属に属するカビにより産生され、

（２）至適ｐＨは4.0～5.5であり、

（３）ｐＨ4.0～6.0で安定であり、至適pHは5.0である。

（４）30～75℃で作用し、至適温度が55～60℃である。

[0025] （Tセルラーゼの製法）

本発明に使用されるTセルラーゼは、従来の一般的な方法で微生物から回収され、精製されたものであることができる。従って、当該セルラーゼの生産は、遺伝子組換え又は非遺伝子組換えによって実施することができる。例えば、市販のTrichoderma reesei株を炭素源にセルロースを含む培地等で培養し、培養物からろ過又は遠心した培養上清として得ることができる。Trichoderma reeseiの有効成分（タンパクおよび遺伝子）を同定し、その遺伝子を他の微生物に組み替えて生産しても良い。また、得られた培養上清液をカラムクロマトグラフィーや硫安分画などによって適宜精製して用いることもできる。得られた酵素液の形状は液状の他、スプレードライや凍結乾燥により粉末状にしても良い。その際には日常的に用いられる安定剤や賦形剤を添加しても良い。

Tセルラーゼには夾雑酵素としてのプロテアーゼが含まれていることが好ましい。

[0026] （Ｔセルラーゼの添加量）

Ｔセルラーゼは、植物性ミルクの全質量を基準として、FPase活性として0.0001～1U/g（終濃度）の範囲内で使用することが好ましく、0.0005U/g～0.5U/gの範囲内で使用することがより好ましく、0.001～0.1U/gの範囲内で使用することがさらに好ましい。セルラーゼを植物性ミルクの全質量を基準として、CMCase活性として0.001～22U/g（終濃度）の範囲内で使用することが好ましく、0.005～15U/gの範囲内で使用することがより好ましく、0.01～10U/gの範囲内で使用することがさらに好ましい。

Ｔセルラーゼは、上記のFPase活性またはCMCase活性の少なくとも一方を有することが好ましく、両者を兼ね備えていることが好ましい。

[0027] 上記のＴセルラーゼの添加量（酵素量）は、以下の方法により定義される酵素量に基づいて酵素重量当たりの酵素活性として算出することができる。

1FP単位とは、緩衝液で希釈した酵素液をセルロース濾紙片50mgに作用させ、0.05Mクエン酸緩衝液（pH4.8）中で50℃、60分間の条件で生成する還元糖の量をジニトロサリチル酸法により測定した場合に、１分間に１μモルのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を指称するものである。セルラーゼの使用量が前記範囲の下限値以下の場合には豆乳中の不溶物の分解が充分ではなく、発酵促進効果が得られない。又、上限値以上の場合には不経済である。

１CMC単位とは、酵素液をカルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）５mgに作用させ、0.05Mクエン酸緩衝液（pH4.8）中で50℃、30分間の条件で生成する還元糖の量をジニトロサリチル酸法により測定した場合に、１分間に１μモルのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を指称するものである。

[0028] Ｔセルラーゼの添加量は、上記のFPase活性およびCMCase活性の他に、プロテアーゼ活性を指標としてもよい。Ｔセルラーゼに含まれるプロテアーゼ活性は、Pプロテアーゼの活性値と同様の方法で測定することができる。

Ｔセルラーゼに含まれるプロテアーゼ活性を指標にする場合、その添加量は、植物性ミルクの全質量を基準として、０．００１～２０．０ＰＵ／ｇの

範囲内であることが好ましく、０．００５～１０．０ＰＵ／ｇの範囲内であることがより好ましく、０．０１～１０．０ＰＵ／ｇの範囲で添加することがさらに好ましく、０．０１～５．０が特に好適である。より好適には０．２５～５．０ＰＵ／ｇの範囲で添加することができる。Ｔセルラーゼに含まれるプロテアーゼ活性は、Ｐプロテアーゼの活性測定方法と同じ方法を使用すれば良い。

Ｔセルラーゼに含まれるＦＰａｓｅ活性、ＣＭＣａｓｅおよびプロテアーゼ活性は上述した範囲を全て兼ね備えたものであってもよく、必要に応じて、それぞれの活性を上述した範囲で組み合わせて使用することができる。

[0029] ＴセルラーゼのＣＭＣａｓｅはｐＨ安定域が３．５～６．０であり、ＦＰａｓｅのｐＨ安定域は４．５～７．５である。

[0030] ＜乳酸菌スターター＞

本発明の植物性ミルク発酵物は、その製造方法において乳酸菌スターターを用いる。本発明において、使用する乳酸菌としては、特に限定はされないが、例えば、Lactobacillus.delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus paracaseiなど従来使用されている乳酸菌が使用できる。これら乳酸菌スターターの入手方法としては、一般に流通している市販品を購入することができるし、独自に分離した菌株を使用することもできる。尚、同一種の乳酸菌を複数組み合わせて使用しても、或いは、異なる種の乳酸菌を複数組み合わせて使用してもよい。また、スターターと同時にビフィズス菌などのプロバイオティクス菌を同時に添加して使用してもよい。ビフィズス菌は増殖しにくい性質があるため、植物性ミルク発酵物中でビフィズス菌が増殖すること（特に他の菌（別の乳酸菌を含む）が共存する場合）は有利な効果である。

[0031] （乳酸菌スターターの添加量）

乳酸菌スターターの添加量としては、特に限定はされない。一般的な量を添加することができる。例えば、クリスチャン・ハンセン社凍結乾燥スターターを使用する場合、植物性ミルクを基準として、０．１～０．５ｍｇ／ｇ

であるが、乳酸菌の生育が可能な添加量であれば、添加量は特に限定されない。

[0032] ＜植物性ミルク＞

植物性ミルクは植物から採れる。植物性ミルクの原料としては、豆類、ナッツ類および穀物類を使用することができる。豆類のミルク原料としては、例えば、豆乳、ビーナッツが挙げられる。ナッツ類の原料としては、例えば、アーモンド、クルミ、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ、カシューナッツ、ピーカンナッツ、マカダミアナッツが挙げられる。穀物類のミルクの原料としては、例えば、米、オーツ麦が挙げられる。これらの植物性ミルクは、常法により製造することができる。植物性ミルクの市販品を使用しても良い。植物性ミルクの原料としては、これらを単独または複数を使用することができる。植物性ミルクを製造した後、混合して使用しても良い。

[0033] 植物性ミルクに含まれるタンパク量は０．１質量％～２０質量％の範囲にあることが好ましく、０．３質量％～１５質量％の範囲にあることがより好ましく、１．０～１０質量％の範囲にあることがさらに好ましい。植物性ミルクに含まれるタンパク量が多くなるにつれ、植物性ミルクが凝固しやすくなり、植物性ミルク発酵物がゲル化しやすくなるとともに、当該発酵物のゲル強度が向上しやすくなる。植物性ミルクに含まれるタンパク量が少なくなると、植物性ミルクは凝固しにくくなり、植物性ミルク発酵物が液体状になりやすくなる。

ゲル化した植物性ミルク発酵物を破砕・均質化することで液体状のミルク発酵物を得ることも可能である。植物性ミルク発酵物の形状は、所望の特性に応じて決定すればよい。

植物性ミルクに含まれるタンパク量は、ブラッドフォード法やローリー法で測定することができる。

[0034] 本発明における植物性ミルクの全質量には、添加する酵素量以外の全質量が含まれる。すなわち、植物性ミルクの質量に加え、後述する添加物の質量も含まれる。

植物性ミルクは植物性物質を使用したものであればよい。例えば、植物性ミルク粉末を水等に溶解したもの、植物からの抽出物（固体でも液体であってもよい）を水等に溶解したものおよび植物タンパク（固体でも液体であってもよい）を水等に溶解したものならびに必要に応じて添加物を加えたものを使用しても良い。植物性物質を選択するときには、タンパク量を指標にすることができる。

[0035]（豆乳）

本発明における豆乳はＪＡＳ規格における豆乳、調製豆乳及び豆乳飲料が含まれる。すなわち本発明における豆乳は、大豆から熱水等によりたんぱく質その他の成分を溶出させ、繊維質を除去して得られた乳状の飲料（「大豆豆乳液」と言う）であるものをいい、大豆固形分が８％以上である（無調整）豆乳、大豆固形分が６％以上である調製豆乳、大豆固形分が２％以上である豆乳飲料（果汁系）および大豆固形分が４％以上である豆乳飲料（その他）を含む。これらを組み合わせて使用しても良い。

[0036] 豆乳に含まれる大豆固形分は、２～３０質量％であることが好ましく、２～２０質量％であることがより好ましく、５～１５質量％であることがさらに好ましい。

下限値未満では豆乳発酵物が固まり難く、離水が増えるおそれがある。

上限値超では豆乳発酵物の滑らかさが不足するおそれや、豆乳発酵物が固まりすぎてしまう可能性がある。

本発明の豆乳発酵物は、固形物及びゲル状の物（例えば、ヨーグルト）を意味するが、豆乳発酵物を飲料にした、豆乳発酵飲料である場合は、上記大豆固形分は５質量％未満であってもよく、３質量％未満であってもよく、２質量％未満であってもよい。

[0037]＜任意成分＞

本発明の植物性ミルク発酵物には、必要に応じ、各種成分を添加することができる。具体例としては、植物性ミルク発酵物の安定化に寄与する金属塩類、各種糖類、アスコルビン酸、グリセリン等、使い勝手をよくするための

賦形剤である澱粉、デキストリン、緩衝作用を有する無機塩類、乳由来成分である乳糖、乳清、乳タンパク類、ゲル化剤である寒天、ゼラチン、ペクチン等、植物性ミルクの濃度調整に使用する水、植物からの抽出物（液状、固体、粉末）を挙げることができる。

[0038]（他の酵素）

本発明の植物性ミルク発酵物の製造方法においては、液状、粉末状等の各種酵素製品を添加することもできる。この酵素製品は特に限定されないが、例えば、ラクターゼ、グルコースイソメラーゼ、グルコースオキシダーゼ、トランスグルタミナーゼ、リパーゼ、第２のセルラーゼ、アミラーゼ、イヌリナーゼ、第２のプロテアーゼから選択される１種又は複数種であり、市販の製品を用いることができる。

上記の酵素製品は、豆乳にＰプロテアーゼまたはＴセルラーゼを添加するときと略同時に添加すればよい。

[0039] 本発明に使用することができる第２のセルラーゼとしては、動植物界に存在するセルラーゼを使用することができる。特に微生物由来のセルラーゼを使用することが好ましく、例えば、アセトバクター（Acetobacter）属、シュードモナス（Pseudomonas）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、チエトミウム（Chaetomium）属、フザリウム（Fusarium）属、ペニシリウム（Penicillium）属、ノイスポラ（Neurospora）属、ペリクラリア（Pellicularia）属、スポロトリクム（Sporotrium）属、ステレウム（Stereum）属、トリコデルマ（Trichoderma）属、トラメテス（Trametes）属、イルペックス（Irpex）属、コルティシウム（Corticium）属、バチルス（Bacillus）属、ペニバチルス属（Paenibacillus）等の微生物が産生するセルラーゼが例示される。セルラーゼは粗製のものであっても精製したものであっても使用可能であり、ヘルミラーゼ等の他の酵素が混在していてもよい。複数のセルラーゼを混合して使用してもよい。

[0040] 第２のプロテアーゼとしては、バチルス(Bacillus)属、ジオバチルス属（Geobacillus）、アスペルギルス(Aspergillus)属、リゾプス属（Rhizopus）、

リゾムコール属（Rhizomucor）ストレプトマイセス属（Streptomyces）に属する微生物由来のプロテアーゼ、乳酸菌由来のプロテアーゼなどを使用できる。具体的には、好ましいプロテアーゼは、Bacillus licheniformis、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Bacillus sp.、Geoacillus caldoproteolyticus、Aspergillus sp.、Aspergillus oryzae、Aspergillus melleus、Lactobacillus helveticus、Lactobacillus bulgaricus及びStreptococcus thermophilusからなる群から選択される微生物に由来するプロテアーゼである。

[0041] ≪植物性ミルク発酵物の性質≫

＜食感の評価＞

本発明で得られる植物性ミルク発酵物の有する食感（なめらかさ、粘性）、硬度の評価（破断強度解析）については、株式会社山電社製、クリープメータ（ＲＥ２－３３００５Ｃ）を使用した物性値に基づいて行うことができる。

[0042] （なめらかさ）

食感における「なめらかさ」については、クリープメータによる波形の直線性に基づき、評価をすることができる。より波形に乱れがない（直線に近い）ことにより、食感として、よりなめらかであるといえる。

[0043] （粘性）

粘性（糸引き性：テクスチャ解析）については目視及び後述するプランジャ上昇時の接線の傾きで評価できる。接線の傾きがより小さくなれば、植物性ミルク発酵物がより粘性を有し、より濃厚感を有し、植物性ミルク発酵物に口中でよりまとまる感覚を付与できると考えられる。

[0044] （硬度）

本発明で得られる植物性ミルク発酵物の硬度は、後述する破断強度解析により、評価することができる。具体的な物性値として、カードをくずさずクリープメータによりプランジャを押し下げた場合に、カードが崩れる時点の荷重（Ｎ）を「破断点」（クリープメータにより自動計算される値）として

、その硬度を評価することが可能である。

[0045] ≪植物性ミルク発酵物の製造方法≫

本発明の植物性ミルク発酵物の製造方法は、植物性ミルクと、乳酸菌と、を混合し、混合液を得る第１工程と、混合液を発酵させる第２工程と、を順次行い、第２工程が終了する前に、前記原料乳及び／又は前記混合液にＰプロテアーゼを添加する工程またはトリコデルマ属由来のプロテアーゼを添加する工程（プロテアーゼ添加工程）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼを添加する工程（セルラーゼ添加工程）を含むものであればよく、具体的な製造方法は特に限定されない。例えば、その製造方法は、（１）豆乳等の植物性ミルクに乳酸菌スターターとＰプロテアーゼ、トリコデルマ属由来のプロテアーゼまたはＴセルラーゼを所定の濃度で同時に添加する、（２）４３℃で１０～１５分間程度撹拌する、（３）得られた混合液をガラス容器に分注し、４３℃で４～６時間または４～５時間発酵させる、（４）得られた豆乳発酵物等の植物性ミルク発酵物は１日以上４～５℃で冷蔵保存する、等の工程を含むものである。

[0046] ≪植物性ミルク発酵物の用途≫

植物性ミルク発酵物を破砕し、液状化した植物性ミルク発酵飲料としてもよい。

実施例

[0047] 以下、実施例（製造例）及び比較例によって、本発明を説明するが、本発明は実施例（製造例）、比較例に限定されるものではない。

[0048] ≪豆乳発酵物の製造≫

＜製造例１＞

（材料）

豆乳：有機調製豆乳（スジャータ製、大豆固形分１０質量％）

Ｐプロテアーゼ：Paenibacillus polymyxa ＮＢＲＣ １５３０９株をＤｉｆｃｏ社製ニュートリエント液体培地に植菌し、３０℃で２日間培養した培養液を１００００ｇで１０分間遠心した上清を透析によって脱塩して用いた

。尚、当該プロテアーゼは、前述の（ａ）～（ｆ）の性質を有するものであった。

乳酸菌スターター：乳酸菌粉末ＦＤ－ＤＶＳ　ＹＦ－Ｌ８１２　Ｙｏ－Ｆｌｅｘ（クリスチャン・ハンセン社製：Lactobacillus. delbrueckii subsp. 及びStreptococcus. thermophilusの混合である）。

ビフィズス菌：Bifidobacterium animalis ssp. lactis　ＢＢ１２株（クリスチャンハンセン社製）

（製造方法）

豆乳を滅菌済みガラス容器に入れ、乳酸菌スターターＹＦ－Ｌ８１２と、ビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼを同時に添加した。豆乳を基準としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、中性プロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）とした（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加した豆乳は、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で５時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例１の豆乳発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0049] ＜製造例２＞

豆乳を無調整豆乳（マルサンアイ社製、大豆固形分９質量％）とした以外は、製造例１と同様にして、製造例２の豆乳発酵物を得た。

[0050] ＜製造例３＞

豆乳を調製豆乳（キッコーマン製、大豆固形分８質量％以上）とした以外は、製造例１と同様にして、製造例３の豆乳発酵物を得た。

[0051] ＜製造例４＞

豆乳を無調整豆乳（ふくれん製、大豆固形分９質量％）とした以外は、製造例１と同様にして、製造例４の豆乳発酵物を得た。

[0052] 乳酸菌スターターをＦＤ－ＤＶＳ　ＹＣ－３８０　Ｙｏ－Ｆｌｅｘ（クリ

スチャン・ハンセン社製：Lactobacillus. delbrueckii subsp. 及びStreptococcus. thermophilusの混合である）を使用した以外は製造例１～４と同様にして、製造例５～８の豆乳発酵物を調製した。

[0053] ＜比較例１～８＞

Ｐプロテアーゼを使用しなかった以外は、製造例１～８と同様にして、比較例１～８の豆乳発酵物を得た。

[0054] ≪評価≫

＜試験例１（豆乳発酵物の外観）＞

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物の外観を目視で確認した。比較例１～８の豆乳発酵物には不定形の粒状物（以下、ダマという場合がある）を多数確認した。これに対し、製造例１～８の豆乳発酵物は滑らかな状態で存在し、不定形の粒状物はほとんど確認することはできなかった。

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物を均一になるよう撹拌した後、スプーンですくいとったときの外観写真を図１（製造例１～４及び比較例１～４）及び図２（製造例５～８及び比較例５～８）に示した。

[0055] ＜試験例２（食感についての物性評価）＞

（破断強度解析）

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物について、物性の測定を行った。物性の測定は、山電社製のクリープメータ（ＲＥ２－３３００５Ｃ）を使用して行った。破断強度解析は、カードを崩さずに行った。製造例１～４及び比較例１～４の結果を図３に、製造例５～８及び比較例５～８の結果を図４に示した。破断強度解析においては、プランジャの圧入速度を１ｍｍ／ｓ、サンプル厚さを３０ｍｍ、プランジャ形状を径１６ｍｍの円柱（治具　No.3）、測定歪率を５０％、ロードセルの規格を２Ｎに設定した。

[0056] 図３及び４に示されるように、Pプロテアーゼを添加すると豆乳発酵物の破断に係る荷重（応力）が小さくなっていることから、当該豆乳発酵物の表面及び全体が柔らかくなっていることが分かる。酵素無添加の比較例１～８の豆乳発酵物は、各製造例に比べると硬く、カード内部の硬さにムラがある（

点線の凸凹波形）ことが分かる。一方、Pプロテアーゼを添加するとカード内部の硬さのムラが減少し（実線の波形）、食感がなめらかになると解される。

[0057]（テクスチャ解析）

テクスチャ解析は、スプーンで豆乳発酵物を撹拌した後、専用カップに入れて測定した。撹拌は、撹拌してもダマの大きさが小さくならなくなるまで行った。テクスチャ解析においては、プランジャの圧入速度を５ｍｍ／ｓ、サンプル厚さを１５ｍｍ、プランジャ形状を径１６ｍｍの円柱型、測定歪率を６６．６６％、ロードセルの規格を２Ｎに設定した。この設定により、テクスチャ解析では、プランジャをカード内に１０ｍｍ挿入し、続いてプランジャを上昇させ、プランジャへの荷重変化が測定された。製造例１～４及び比較例１～４の結果を図５に、製造例５～８及び比較例５～８の結果を図６に示した。プランジャの挿入により増加した荷重は、プランジャの上昇に伴いマイナス値を示し、た。Pプロテアーゼを添加した場合、酵素無添加と比較して付着性（荷重ゼロ以下の面積）が減少した。

[0058]＜試験例３（離水率の評価）＞

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物をスプーンで撹拌後、５ｇの豆乳発酵物を１５ｍＬ容目盛り付きスクリューキャップチューブへ分注したのち、３６００ｒｐｍ／ｍｉｎ（KOKUSAN製、H-19F MR）、４℃の条件で１０分間遠心分離した。その後、分離した水分量の質量を測定し、次式で離水率を算出した。

離水率（％）＝（分離した水分量の質量／サンプル質量）×１００

上記の方法で離水率を求めた後、製造例の離水率を比較例の離水率で除した後、１００を乗じることで、製造例による離水抑制効果（％）を求めた。

得られた結果を表１に示した。Pプロテアーゼを添加することによって、各製造例の豆乳発酵物の離水率は低くなった。製造例による離水抑制効果は、約４０％～６０％の範囲となった。豆乳発酵物を製造するときにPプロテアーゼを使用することで、離水を抑制することは意外な効果であった。

[0059] [表1]

	離水率（%）		製造例による離水抑制効果（%）
	比較例	製造例	
例1	20.8	11.8	56.7
例2	33.6	14.5	43.2
例3	34.9	16.3	46.7
例4	30.7	13.6	44.3
例5	19.5	12.5	64.1
例6	31.7	14.4	45.4
例7	34.1	19.3	56.6
例8	30.9	19.4	62.8

[0060] ＜試験例４（発酵促進作用の評価）＞

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物を製造するまでの間、１時間ごとにｐＨを測定した。製造例１～４及び比較例１～４の発酵経過を図７に、製造例５～８及び比較例５～８の発酵経過を図８に示した。

Ｐプロテアーゼを使用した製造例１～８の豆乳発酵物において、ｐＨが下がりやすくなる傾向を確認した。いずれも発酵時間が３０分間～１時間短縮した。

[0061] ＜試験例５（官能評価）＞

製造例１～８及び比較例１～８の豆乳発酵物の官能評価を行った。評価者は豆乳発酵物の研究開発に携わる者６名が行った。大豆臭、酸味及び滑らかさの評価は下記に示す４段階評価とした。平均値を求めた。得られた結果を表２（製造例１～４及び比較例１～４）、表３（製造例５～８及び比較例５～８）に示した。

１：感じない、またはわずかに感じる

２：やや感じる

３：感じる

４：強く感じる

[0062]

[表2]

	比較例１	製造例１	比較例２	製造例２	比較例３	製造例３	比較例４	製造例４
大豆臭	2.6	1.6	1.8	1.2	1.8	1.4	2.4	1.8
酸味	2.0	2.4	1.4	2.6	1.2	2.8	1.8	2.4
滑らかさ	1.0	3.4	1.0	3.2	1.0	3.2	1.2	2.8
コメント	・青臭い ・不味い	・滑らか ・大豆臭なし ・無脂肪発酵乳様	・ボソボソ ・豆腐様	・滑らか ・まろやか ・濃厚さあり ・クリーミー	・青臭い ・味が腐敗	・滑らか ・香ばしい	・ボソボソ	・コクあり ・なめらか ・酸味強い ・クリーミー

[0063] [表3]

	比較例５	製造例５	比較例６	製造例６	比較例７	製造例７	比較例８	製造例８
大豆臭	2.2	1.6	1.4	1.2	1.8	1.4	1.8	1.5
酸味	1.4	2.0	1.4	2.2	1.6	2.2	1.6	1.0
滑らかさ	1.0	3.0	1.0	3.2	1.0	2.8	1.2	3.0
コメント	・青臭い ・不味い	・滑らか ・美味しい	・大小のダマ ・ボソボソ	・滑らか ・美味しい	・ボソボソ	・滑らか ・クリーミー ・美味しい	・大小のダマ	・滑らか ・若干大豆臭

[0064] Ｐプロテアーゼを使用して豆乳発酵物を調製することで、酸味の向上に加え、大豆臭・青臭さが低減されることが示された。当該豆乳発酵物には、苦味は発生せず、美味しい評価が多数であった。また、ふんわり、口当たりが軽いといったコメントもあった。

Ｐプロテアーゼを使用しない豆乳発酵物は、外観から不定形の粒状物（ダマ）を多数確認した。当該豆乳発酵物は口の中において、ザラツキとして確認することができた。Ｐプロテアーゼを使用した場合にはザラツキを確認することはできず、滑らかな性状で食感および口当たりが良いことを確認した。

[0065] ＜参考例１＞

Pプロテアーゼとともにセルラーゼ（合同酒精株式会社製　商品名セルラーゼF）を同時に添加した以外は、製造例１と同様にして、参考例１の豆乳発酵物を得た。

セルラーゼFを１％（v/w）で添加した（FPaseとして1U/g以上、CMCaseとして22U/g以上、プロテアーゼ活性として３．４ＰＵ／ｇ、いずれも終濃度）。

CMCaseは、1FP単位を求めたときの基質であるセルロース濾紙片50mgのかわりに、カルボキシメチルセルロースナトリウム5mgを用いた以外は同様にして求めた。

[0066] ＜比較例９＞

Pプロテアーゼ及びセルラーゼを使用しなかった以外は、参考例１と同様にして、比較例９の豆乳発酵物を得た。

[0067] ＜試験例６（セルラーゼを併用したときの発酵促進作用の評価）＞

参考例１及び比較例９の豆乳発酵物を製造するまでの間、１時間ごとにｐＨを測定した。その発酵経過を図９に示した。

Pプロテアーゼ単独では発酵促進効果が30分以下であったが（図７左）、セルラーゼFを併用した参考例１の豆乳発酵物においては発酵促進効果が1時間となった。ただし、参考例１の豆乳発酵物においては、使用した豆乳のタンパク質に対するセルラーゼFの添加量が多いことから、苦味を生じた。参考例１で使用した豆乳のタンパク質量（５．０％（ｗ／ｖ））が他の製造例で使用した豆乳のタンパク質量よりも多いこと、参考例１で使用した豆乳には味覚に影響するガンマ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）が０．００２％含まれていることから、参考例１の豆乳発酵物は他の豆乳発酵物と異なる挙動を示したものと推測される。このような豆乳を使用する場合、セルラーゼの添加濃度を低くすること、または反応時間を短縮することにより、セルラーゼとPプロテアーゼによる発酵促進効果を維持しながら、苦味が発生しない豆乳発酵物を得ることが期待される。

[0068] ＜製造例９＞

製造例３と同様にして、製造例９の豆乳発酵物を得た。

[0069] ＜製造例１０＞

Pプロテアーゼのかわりに Tセルラーゼ（合同酒精株式会社製　商品名セルラーゼF）を１．０％添加（FPaseとして1U/g以上、CMCaseとして22U/g以上、プロテアーゼ活性として３．４ＰＵ／ｇ、いずれも終濃度）した以外は、製造例９と同様にして、製造例１０の豆乳発酵物を得た。

[0070] ＜製造例１１＞

Ｐプロテアーゼとともに Ｔセルラーゼ（合同酒精株式会社製　商品名セルラーゼF）を１．０％添加した以外は、製造例９と同様にして、製造例１１の豆乳発酵物を得た。

[0071] ＜比較例１０＞

Ｐプロテアーゼを使用しなかった以外は、製造例９と同様にして、比較例１０の豆乳発酵物を得た。

[0072] ＜評価＞

製造例９～１１、および比較例１０の豆乳発酵物について、試験例２と同様に破断強度解析、試験例３と同様に離水率の評価、試験例４と同様に発酵促進作用の評価を行った。結果を図１０～１２に示した。

図１０に示すように、豆乳発酵物の滑らかさが向上した順に、Pプロテアーゼと Tセルラーゼを併用したもの（酵素併用）、Tセルラーゼを添加したもの、Ｐプロテアーゼを添加したものとなった。

図１１に示すように、豆乳発酵物の離水抑制効果が高かった順に、Pプロテアーゼと Tセルラーゼを併用したもの、Tセルラーゼを添加したもの、Ｐプロテアーゼを添加したものとなった。

図１２に示すように、Ｐプロテアーゼと Ｔセルラーゼを併用したものおよびTセルラーゼの添加により１．５時間の発酵促進効果を確認した。Ｐプロテアーゼを添加したものは１時間の発酵促進効果を確認した。

Ｐプロテアーゼ単独使用、Ｐプロテアーゼと Ｔセルラーゼの併用、Ｔセルラーゼ単独使用ともに、大豆臭が減少し、苦味は生じなかった。

[0073] ＜製造例１２＞

製造例２と同様にして製造例１２の豆乳発酵物を得た。

[0074] ＜製造例１３～１５＞

Pプロテアーゼのかわりに Tセルラーゼ（合同酒精株式会社製　商品名セルラーゼF）を０．１％、０．５％および１％添加した以外は、製造例１２と同様にして、製造例１３～１５の豆乳発酵物を得た。

[0075] ＜製造例１６＞

Pプロテアーゼとともに Tセルラーゼを１．０％添加した以外は、製造例１２と同様にして、製造例１６の豆乳発酵物を得た。

[0076] ＜比較例１１＞

Pプロテアーゼ及び Tセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例１２と同様にして、比較例１１の豆乳発酵物を得た。

[0077] ＜評価＞

製造例１２～１６および比較例１１の豆乳発酵物について、試験例２と同様に破断強度解析、試験例３と同様に離水率の評価、試験例４と同様に発酵促進作用の評価、試験例５と同様に官能評価を行った。結果を図１３～１５に示した。

図１３に示すように、豆乳発酵物の滑らかさが向上した順に、Pプロテアーゼと Tセルラーゼを併用したもの、Tセルラーゼを１．０％添加したもの、Tセルラーゼを０．５％添加したもの、Ｐプロテアーゼを添加したものとなった。

図１４に示すように、豆乳発酵物の離水抑制効果が高かった順に、Ｐプロテアーゼを添加したもの、Pプロテアーゼと Tセルラーゼを併用したもの、Tセルラーゼを１．０％添加したもの、Tセルラーゼを０．５％添加したもの、Tセルラーゼを０．１％添加したものとなった。

図１５に示すように、Ｐプロテアーゼ添加または Tセルラーゼ０．５％添加により０．５時間の発酵促進効果、Ｔセルラーゼ１％添加により１時間の発酵促進効果を確認した。ＰプロテアーゼおよびＴセルラーゼ１％添加を併用したもので１．５時間の発酵促進効果を確認した。

Ｐプロテアーゼ単独使用、ＰプロテアーゼとＴセルラーゼの併用、Ｔセルラーゼ単独使用ともに、大豆臭が減少し、苦味は生じなかった。

[0078] ≪アーモンドミルク発酵物の製造≫

使用したアーモンドミルクに関する情報は以下の通りである。エネルギー、たんぱく質及び脂質は、いずれもアーモンドミルク１００ｍＬ中の値であ

る。

[0079] [表4]

メーカー	商品名	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	アーモンドペースト
グリコ	アーモンド効果(砂糖不使用)	19	0.5	1.5	アーモンドペースト
マルサンアイ	毎日おいしいローストアーモンドミルク	48	1.6	3.4	
筑波乳業(濃いアーモンドミルク)	香ばしロースト	62	3	5.2	アーモンド
	まろやかプレーン	62	2.7	5.4	
	濃厚プレーン	75	3.2	6.6	

[0080] ＜製造例１７＞

市販のアーモンドミルク（グリコ製、商品名：アーモンド効果(砂糖不使用)）を滅菌済みガラス容器に入れ、乳酸菌スターターＹＦ－Ｌ８１２と、ビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼを同時に添加した。アーモンドミルクを基準としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、Ｐプロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）とした（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加したアーモンドミルクを、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で８時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例１７のアーモンドミルク発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0081] ＜製造例１８＞

市販のアーモンドミルク（マルサンアイ製、商品名：毎日おいしいローストアーモンドミルク）とした以外は、製造例１７と同様にして、製造例１８のアーモンドミルク発酵物を得た。

[0082] ＜比較例１２＞

Pプロテアーゼを使用しなかった以外は、製造例１７と同様にして、比較例１２のアーモンドミルク発酵物を得た。

[0083] ＜評価＞

製造例１７～１８のアーモンドミルク発酵物を評価した結果を以下に示す

。表中の「ゲル形成」は、アーモンドミルク発酵物の外観観察によるものであり、他の評価項目は上述した試験例に準じて試験した。相対的な評価内容については、比較例１２のアーモンドミルク発酵物との対比内容を示す。なお、いずれのアーモンドミルク発酵物においても苦味は生じなかった。

[0084] [表5]

製造例	ゲル形成	発酵促進	破断強度	テクスチャー変化	離水抑制効果	食べた評価
17	無し	１時間促進	変化無し	無し	無し	・脂っぽさが少ない。 ・やや酸味が強い。 ・ややダマが小さい。
18	無し	２時間促進	変化無し	無し	無し	

[0085] ＜製造例１９＞

市販のアーモンドミルク（筑波乳業製、商品名：濃いアーモンドミルク(香ばしロースト)）を滅菌済みガラス容器に入れ、乳酸菌スターターＹＦ－Ｌ８１２と、ビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼ、Ｔセルラーゼまたは Ｐプロテアーゼ及びＴセルラーゼを同時に添加した。アーモンドミルクを基準としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、Ｐプロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼ添加濃度は３．４（ＰＵ／ｇ）とした（いずれも終濃度）。Ｐプロテアーゼ及びＴセルラーゼを加えた系においては、Ｐプロテアーゼを１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼを３．４（ＰＵ／ｇ）となるように添加した（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加したアーモンドミルクを、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で６時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例１９のアーモンドミルク発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0086] ＜製造例２０＞

市販のアーモンドミルク（筑波乳業製、商品名：濃いアーモンドミルク(ま

ろやかプレーン））とした以外は、製造例１９と同様にして、製造例２０のアーモンドミルク発酵物を得た。

[0087] ＜製造例２１＞

市販のアーモンドミルク（筑波乳業製、商品名：濃いアーモンドミルク(濃厚プレーン)）とした以外は、製造例１９と同様にして、製造例２１のアーモンドミルク発酵物を得た。

[0088] ＜比較例１３～１５＞

Pプロテアーゼ、Tセルラーゼ、Pプロテアーゼ及びTセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例１９と同様にして、比較例１３のアーモンドミルク発酵物を得た。

Pプロテアーゼ、Tセルラーゼ、Pプロテアーゼ及びTセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例２０と同様にして、比較例１４のアーモンドミルク発酵物を得た。

Pプロテアーゼ、Tセルラーゼ、Pプロテアーゼ及びTセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例２１と同様にして、比較例１５のアーモンドミルク発酵物を得た。

[0089] ＜評価＞

製造例１９～２１及び比較例１３～１５のアーモンドミルク発酵物について、豆乳発酵物と同様の評価を行った。いずれのアーモンドミルク発酵物もゲル化することを確認した。製造例１７～１８のアーモンドミルク発酵物ではゲル化しなかったため、異なる結果となった。アーモンドミルク中のたんぱく質量が増えるにつれ、ゲル化しやすくなることが示唆された。いずれも苦味は生じておらず、用途・目的によってタンパク質量を決定すれば良いことが示唆された。

[0090] 製造例１９および比較例１３の結果を図１６に示した。製造例２０および比較例１４の結果は図１６とほぼ同様であったため省略した。

図１６に示すように、PプロテアーゼまたはＴセルラーゼを添加することにより、離水抑制効果および破断強度の低下を確認した。Ｐプロテアーゼと Ｔ

セルラーゼを併用することによりその効果は増大した。Ｔセルラーゼを単独またはＰプロテアーゼと併用することにより、発酵促進効果を確認した。

[0091] 製造例２１および比較例１５の結果を図１７に示した。

図１７に示すように、Ｐプロテアーゼを添加することにより、アーモンドミルク発酵物のゲル強度が向上した。図１６とは異なる結果となった。理由は不明であるが、アーモンドミルクに含まれる成分の違い（脂質、ｐＨ調整剤の有無（製造例１９および２０では添加されているが、製造例２１では添加無し）による初発ｐＨの違い）により、アーモンドミルク中の基質に対する酵素の反応性に変化があったものと推測される。

Ｔセルラーゼを添加することにより、アーモンドミルク発酵物のゲル強度の低下および離水抑制効果を確認した。

[0092] 製造例１９～２１のアーモンドミルク発酵物における官能評価は以下の通りであった。いずれも酵素添加区で共通する内容である。なお、いずれのアーモンドミルク発酵物においても苦味は生じなかった。

酵素添加区のほうが少しダマが小さくなりやすい。

ダマが小さくなるためか、スプーンから落とした際の落ち方が滑らかであった。

酵素が入ると酸味が増す。Tセルラーゼが入るとコクが増すのか、味の重厚感が出る印象であった。

[0093] ≪オーツミルク発酵物の製造≫

＜製造例２２＞

市販のオーツミルク（ダノン製、商品名：アルプロ「オーツミルク」、ベースはオーツ麦、タンパク量は０．３質量％（ｗ／ｖ））を滅菌済みガラス容器に入れ、乳酸菌スターターＹＦ－Ｌ８１２と、ビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼ、ＴセルラーゼまたはＰプロテアーゼ及びＴセルラーゼを同時に添加した。オーツミルクを基準としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、Ｐプロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼ添加濃度は３．４（ＰＵ／ｇ）と

した（いずれも終濃度）。Ｐプロテアーゼ及びＴセルラーゼを加えた系においては、Ｐプロテアーゼを１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼを３．４（ＰＵ／ｇ）となるように添加した（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加したオーツミルクを、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で６時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例２２のオーツミルク発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0094] ＜比較例１６＞

Pプロテアーゼ、Tセルラーゼ、Pプロテアーゼ及びTセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例２２と同様にして、比較例１６のオーツミルク発酵物を得た。

[0095] ＜評価＞

製造例２２および比較例１６のオーツミルク発酵物における発酵経過を図１８に示した。

Ｐプロテアーゼは若干発酵促進効果が見られ、Tセルラーゼを添加することにより発酵促進効果を確認した。

いずれのオーツミルク発酵物においてもゲルは形成されなかった。

酵素を添加することで、酸味の種類が変化し、渋みが増強することを確認した。いずれのオーツミルク発酵物においても苦味は確認されなかった。目的に応じて酵素を使用できることが示唆された。

[0096] ≪マカダミアナッツミルク発酵物の製造≫

＜製造例２３＞

市販のマカダミアナッツミルク（キッコーマン製、商品名：マカダミアミルク、ベースはマカダミアナッツペースト、タンパク量は０．３質量％（ｗ／ｖ））を滅菌済みガラス容器に入れ、乳酸菌スターターＹＦ－Ｌ８１２と、ビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼ、ＴセルラーゼまたはＰプロテアーゼ及びＴセルラーゼを同時に添加した。マカダミアナッツミルクを基準

としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、Ｐプロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼ添加濃度は３．４（ＰＵ／ｇ）とした（いずれも終濃度）。Ｐプロテアーゼ及びＴセルラーゼを加えた系においては、Ｐプロテアーゼを１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼを３．４（ＰＵ／ｇ）となるように添加した（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加したマカダミアナッツミルクを、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で６時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例２３のマカダミアナッツミルク発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0097] ＜比較例１７＞

Pプロテアーゼ、Tセルラーゼ、Pプロテアーゼ及びTセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例２２と同様にして、比較例１７のマカダミアナッツミルク発酵物を得た。

[0098] ＜評価＞

製造例２３および比較例１７のマカダミアナッツミルク発酵物における発酵経過を図１９に示した。

Ｐプロテアーゼに発酵促進効果を確認した。Tセルラーゼを添加することにより若干の発酵促進効果を確認した。

いずれのマカダミアナッツミルク発酵物においてもゲルは形成されなかった。

酵素を添加することで、酸味の種類が変化し、渋みが増強することを確認した。いずれのマカダミアナッツミルク発酵物においても苦味は確認されなかった。目的に応じて酵素を使用することができるが示唆された。

[0099] ≪オーツミルク発酵物の製造≫

＜製造例２４＞

水８６．３質量％に、市販のオーツ麦粉（商品名：オートフラワー、原材

料（原産地（燕麦／オート麦／からす麦　使用割合１００％（アメリカ／カナダ）、たんぱく質１３．１５％）３質量％及び市販のソラマメプロテイン（バイオアクティブズ社製、商品名：そら豆プロテイン、タンパク質８６．０質量％）１．５質量％を分散させ懸濁液を得た。キビ多糖７質量％に、タピオカでんぷん２質量％と、ＣＭＣを０．２質量％混ぜたものを上記懸濁液に加え、９５℃、５分間殺菌したものをオーツミルクとした。

上記のオーツミルクにビフィズス菌ＢＢ１２と、Ｐプロテアーゼまたは Ｔセルラーゼを同時に添加した。オーツミルクを基準としたとき、スターター添加濃度は０．１ｍｇ／ｇ、ＢＢ１２添加濃度は０．０５ｍｇ／ｇ、Ｐプロテアーゼ添加濃度は１．０（ＰＵ／ｇ）、Ｔセルラーゼ添加濃度は３．４（ＰＵ／ｇ）とした（いずれも終濃度）。スターター、ＢＢ１２、Ｐプロテアーゼを添加したオーツミルクを、恒温水槽中において４３℃で１０～１５分程度撹拌した。続いて、ガラス容器（東洋ガラス社製、容量９０ｍＬ）に分注し、４３℃で６時間醗酵した。醗酵調製物は１日以上冷蔵保存（４～５℃）し、製造例２４のオーツミルク発酵物を得た。

上記の製造方法において、別途の酵素失活工程は行わなかった。

[0100] ＜比較例１８＞

Pプロテアーゼまたは Tセルラーゼを使用しなかった以外は、製造例２４と同様にして、比較例１８のオーツミルク発酵物を得た。

[0101] ＜評価＞

製造例２４および比較例１８のオーツミルク発酵物における発酵経過を図２０に示した。

発酵促進効果が得られた順に、Tセルラーゼ添加区、Pプロテアーゼ添加区であった。

オーツミルク発酵物中の乳酸菌数及びビフィズス菌数について、Tセルラーゼ添加区、Pプロテアーゼ添加区で増加した。

比較例とPプロテアーゼを添加したオーツミルク発酵物は、緩い状態ではあるが、ゲルを形成した。Tセルラーゼを添加したオーツミルク発酵物は、液状

でとろみがあり、Pプロテアーゼを添加したオーツミルク発酵物は付着性が減少した。

Pプロテアーゼ添加区では比較例より酸味が強く、比較例より口中ですっと溶ける性状であった。Tセルラーゼ添加区では比較例より酸味がかなり強い結果となった。いずれのオーツミルク発酵物も苦味は生じなかった。

請求の範囲

[請求項1] 植物性ミルクと、乳酸菌と、を混合し、混合液を得る第１工程と、
前記混合液を発酵させる第２工程と、
を順次行う植物性ミルク発酵物の製造方法であって、
上記第２工程が終了する前に、前記植物性ミルク又は前記混合液にペニバチルス属由来のプロテアーゼまたはトリコデルマ属由来のプロテアーゼを添加する工程（プロテアーゼ添加工程）またはトリコデルマ属由来のセルラーゼを添加する工程（セルラーゼ添加工程）を行うことを特徴とする植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項2] 前記プロテアーゼ添加工程または前記セルラーゼ添加工程を前記第１工程と略同時に行うことを特徴とする請求項１記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項3] 前記ペニバチルス属由来のプロテアーゼの添加量または前記トリコデルマ属由来のプロテアーゼの添加量が、前記植物性ミルクの全質量を基準として０．００１～２０．０ＰＵ／ｇである、請求項１又は２記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項4] 前記セルラーゼの添加量が、前記植物性ミルクの全質量を基準として、ＦＰａｓｅ活性が０．００１～１Ｕ／ｇであり、ＣＭＣａｓｅ活性が０．０００１～２２Ｕ／ｇである、請求項１～３のいずれか１項に記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項5] 前記植物性ミルクに含まれるタンパク質が０．１質量％～２０質量％の範囲にある、請求項１～４のいずれか１項に記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項6] 前記プロテアーゼ添加工程及び前記セルラーゼ添加工程を行うことを特徴とする請求項１～５のいずれか１項に記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

[請求項7] 前記プロテアーゼが、下記の（１）～（４）の性質を有することを特徴とする請求項１～６のいずれか１項に記載の植物性ミルク発酵物

の製造方法。

（１）ペニバチルス属に属する細菌により産生され、

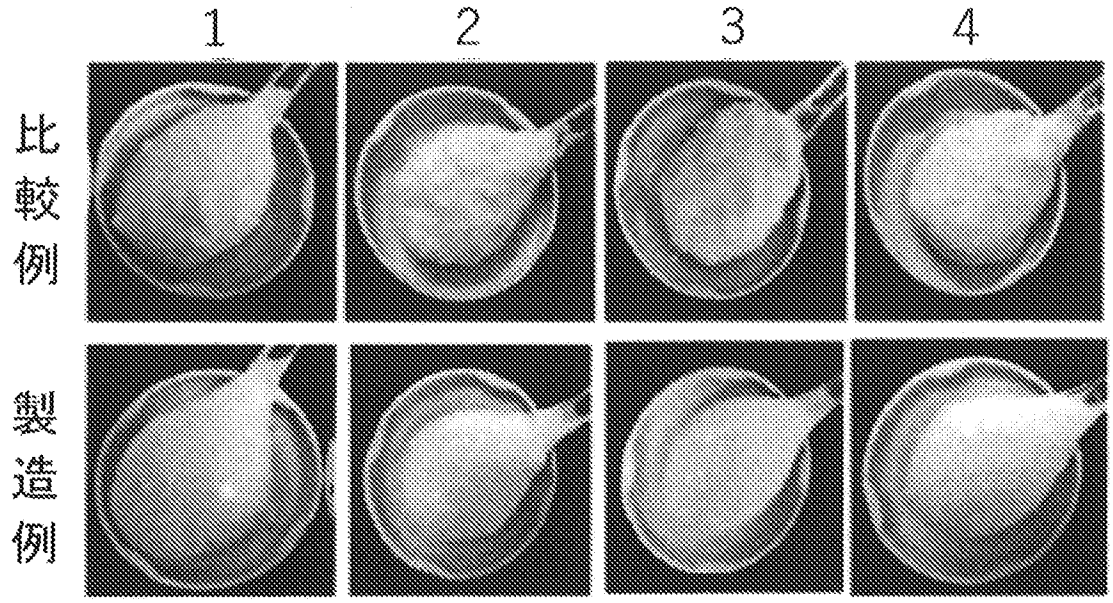
（２）ｐＨ５．５～９．０で安定であり、至適ｐＨが７．０～８．０であり、

（３）２０～７５℃で作用し、至適温度が５０～６０℃であり、

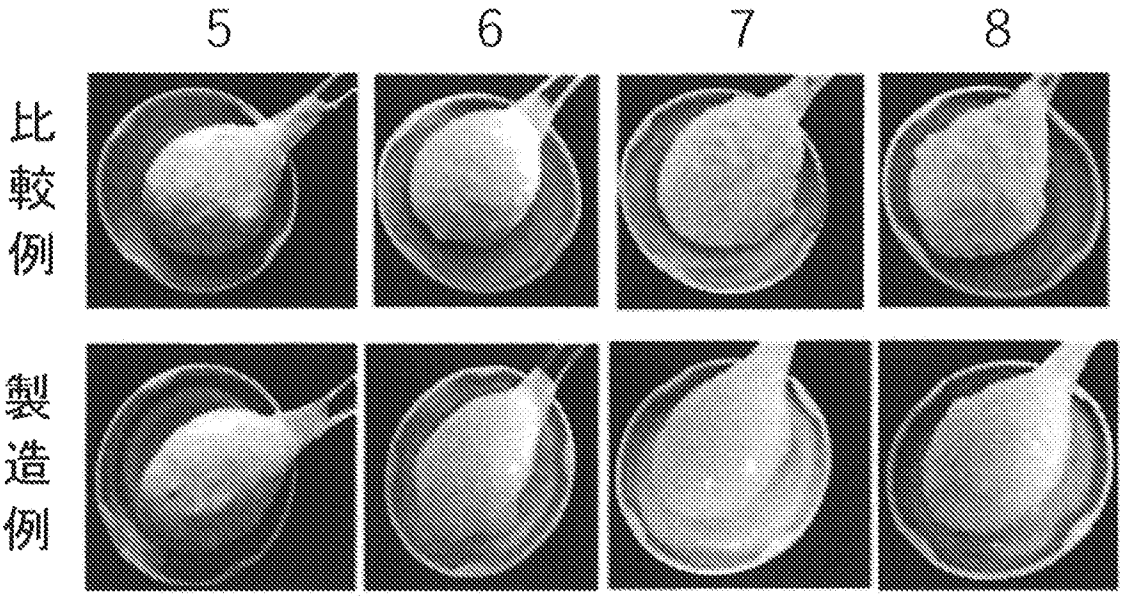
（４）ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量が３２，０００～３４，０００Ｄａと推定されるプロテアーゼ

[請求項8] 前記植物性ミルクが、豆乳、アーモンドミルク、オーツミルクおよびマカダミアナッツミルクから選択される少なくとも一種またはこれらの抽出物または濃縮物を含む請求項１～７のいずれか１項に記載の植物性ミルク発酵物の製造方法。

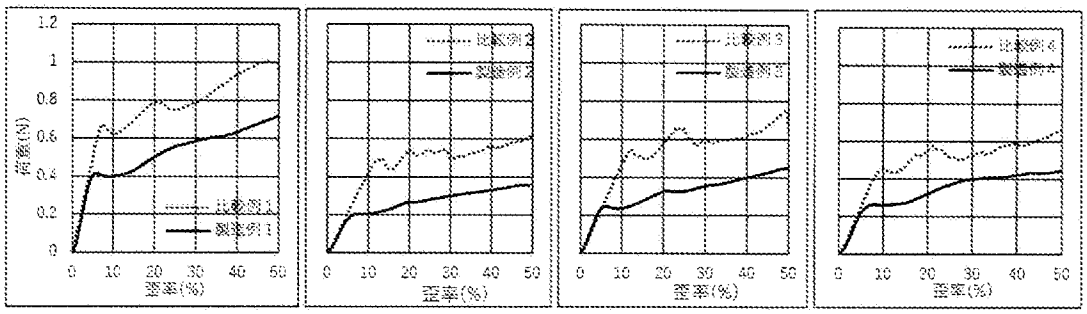
[図1]


1
2
3
4
比較例
製造例

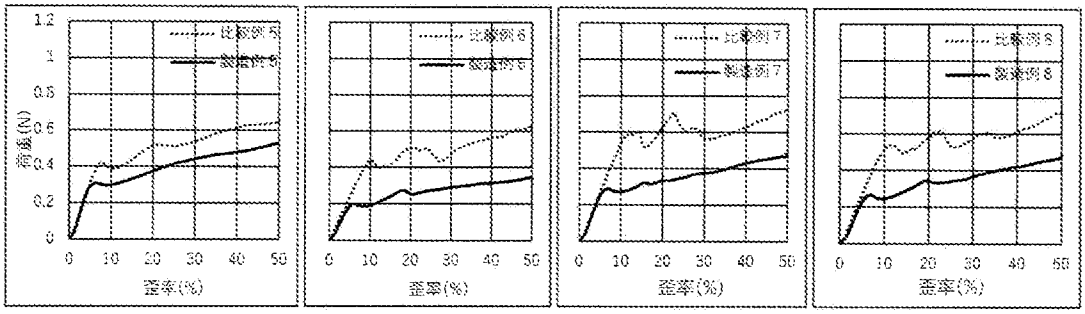
[図2]


5
6
7
8
比較例
製造例

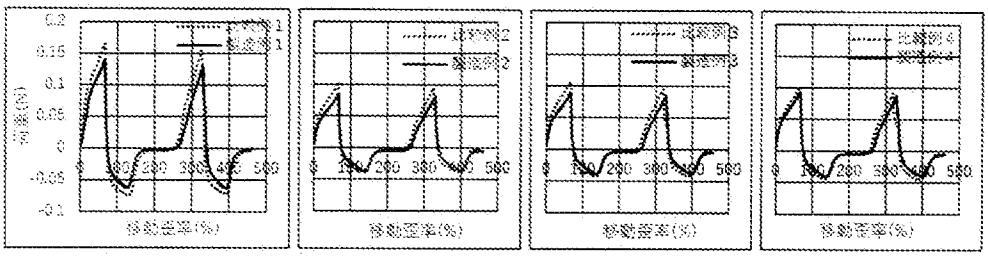
[図3]


荷重(N)
歪率(%)
比較例1
製造例1
比較例2
製造例2
比較例3
製造例3
比較例4
製造例4

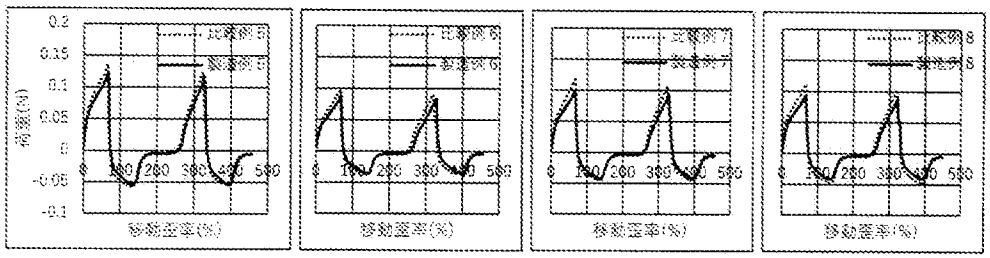
[図4]


荷重(N)
歪率(%)
比較例5
製造例5
比較例6
製造例6
比較例7
製造例7
比較例8
製造例8

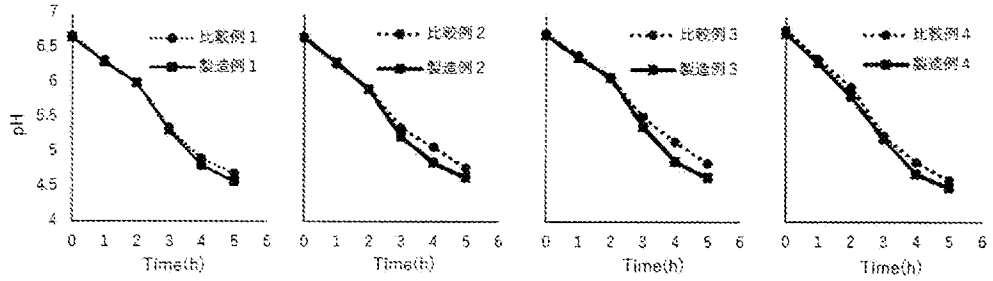
[図5]


荷重(N)
移動歪率(%)

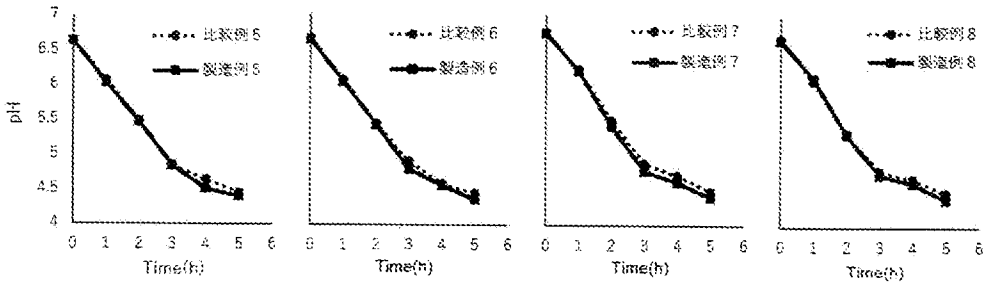
[図6]


荷重(N)
移動歪率(%)

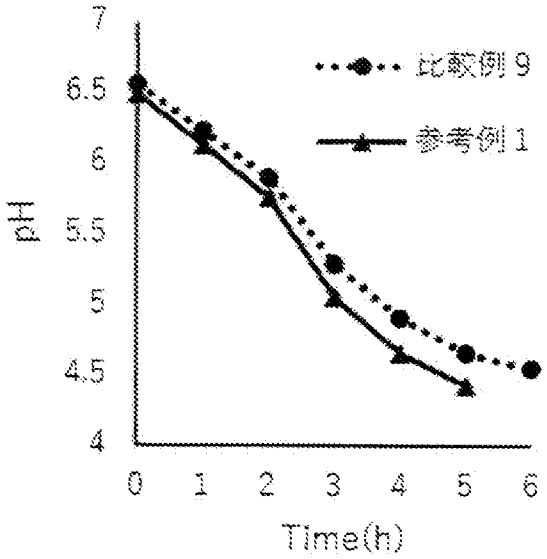
[図7]


pH
Time(h)
比較例1
製造例1
比較例2
製造例2
比較例3
製造例3
比較例4
製造例4

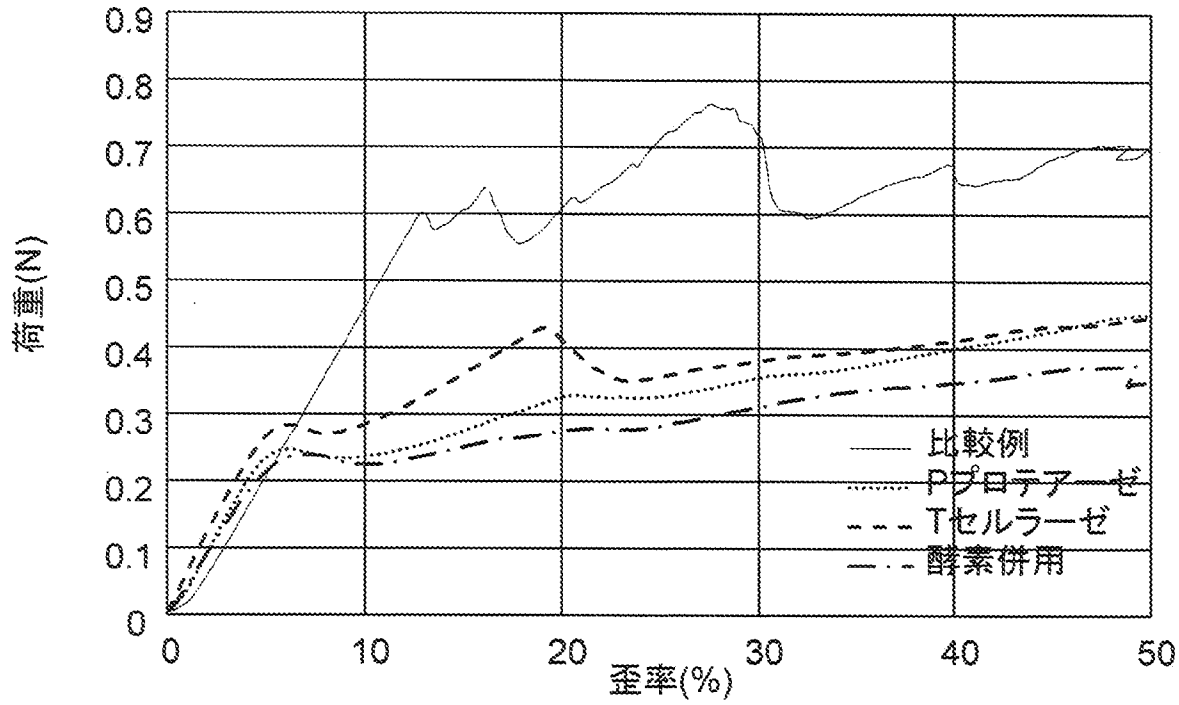
[図8]


pH
Time(h)
比較例5
製造例5
比較例6
製造例6
比較例7
製造例7
比較例8
製造例8

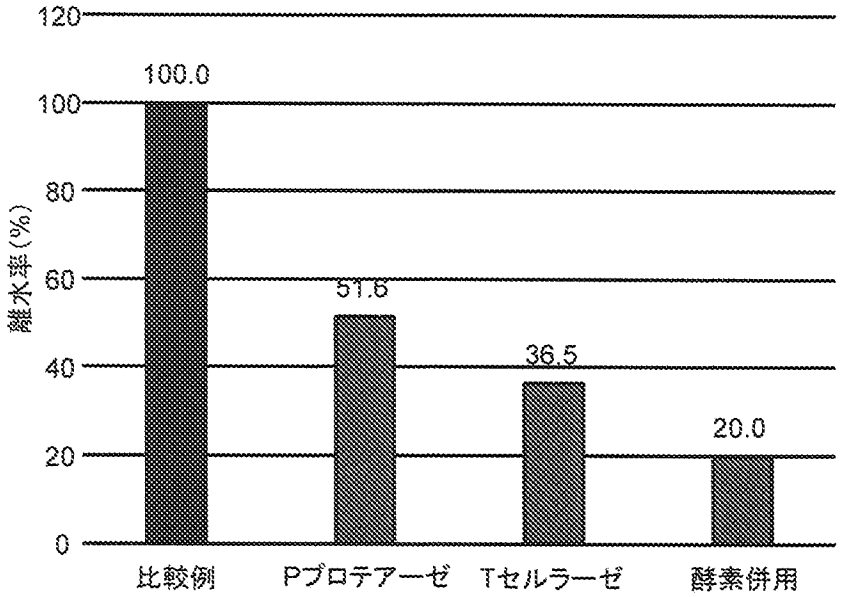
[図9]


7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
pH
0
1
2
3
4
5
6
Time(h)
比較例９
参考例１

[図10]

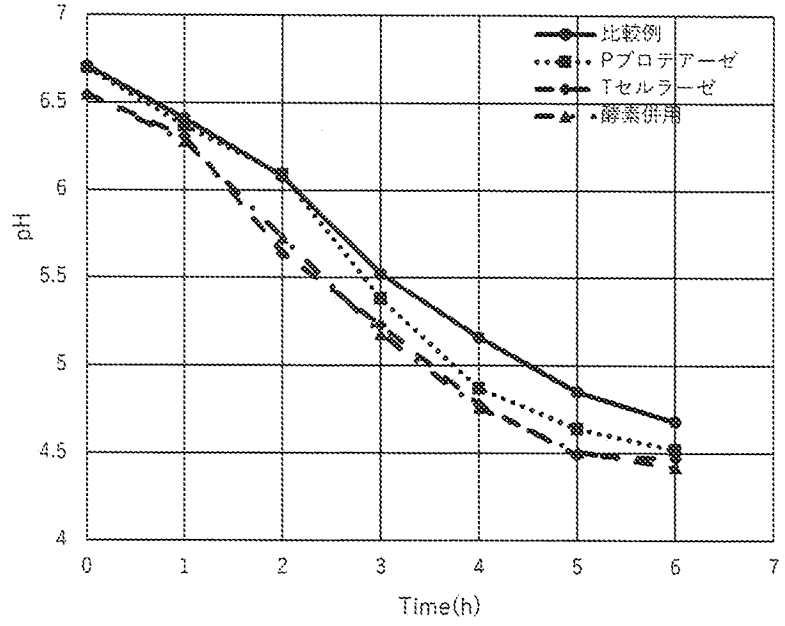

0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
荷重(N)
0
10
20
30
40
50
歪率(%)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用

[図11]

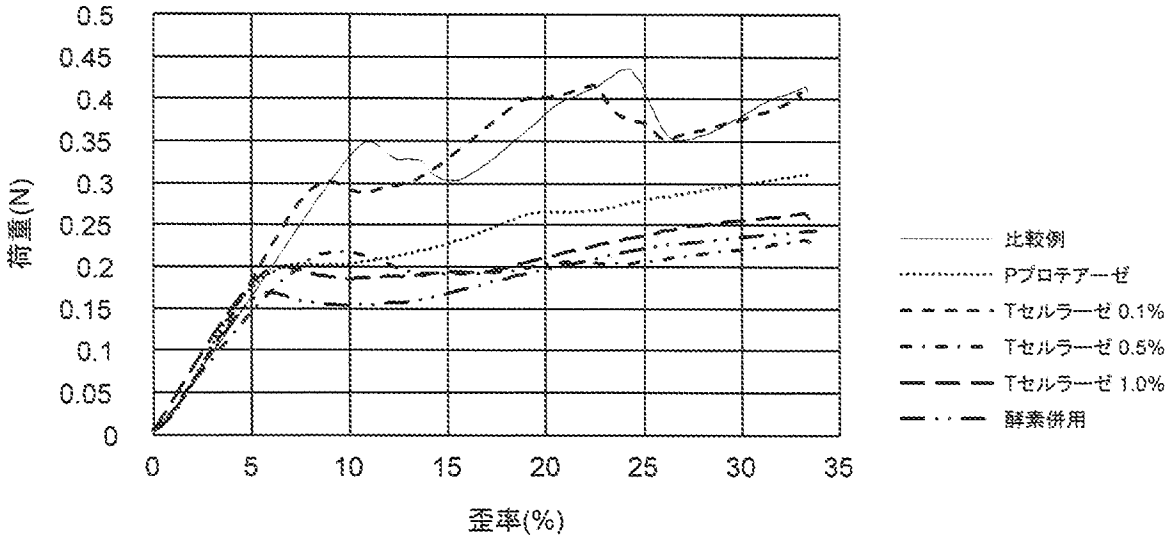


＊比較例の離水量を100%とした場合の割合を示した

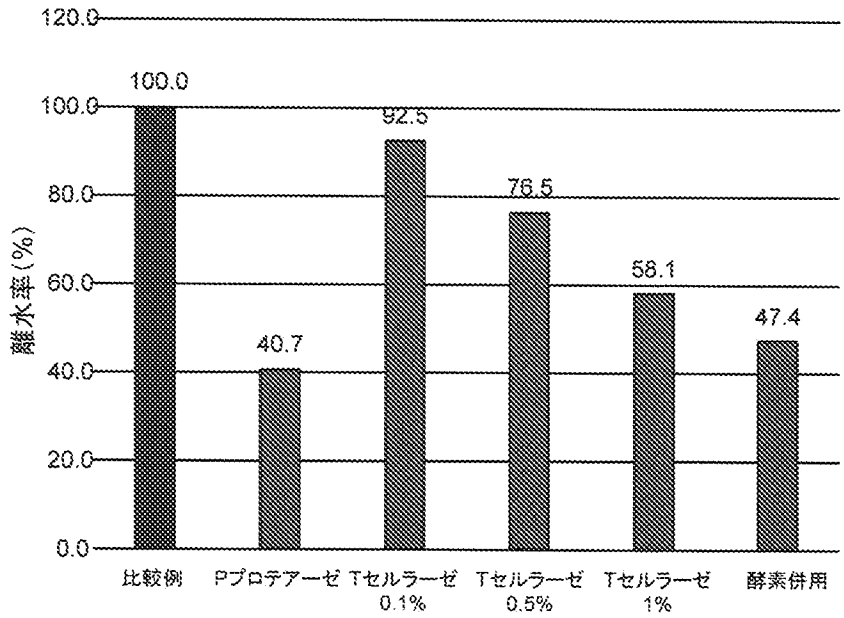
[図12]



[図13]

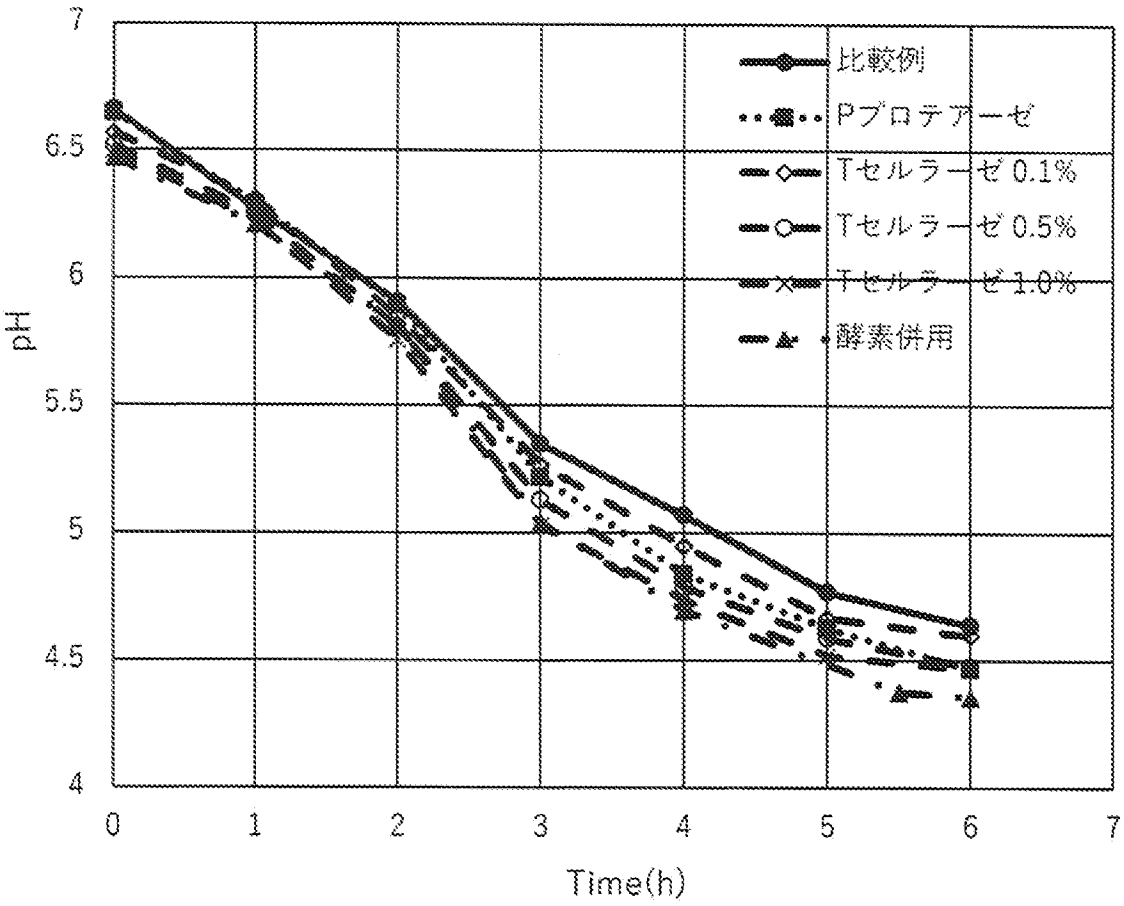


[図14]

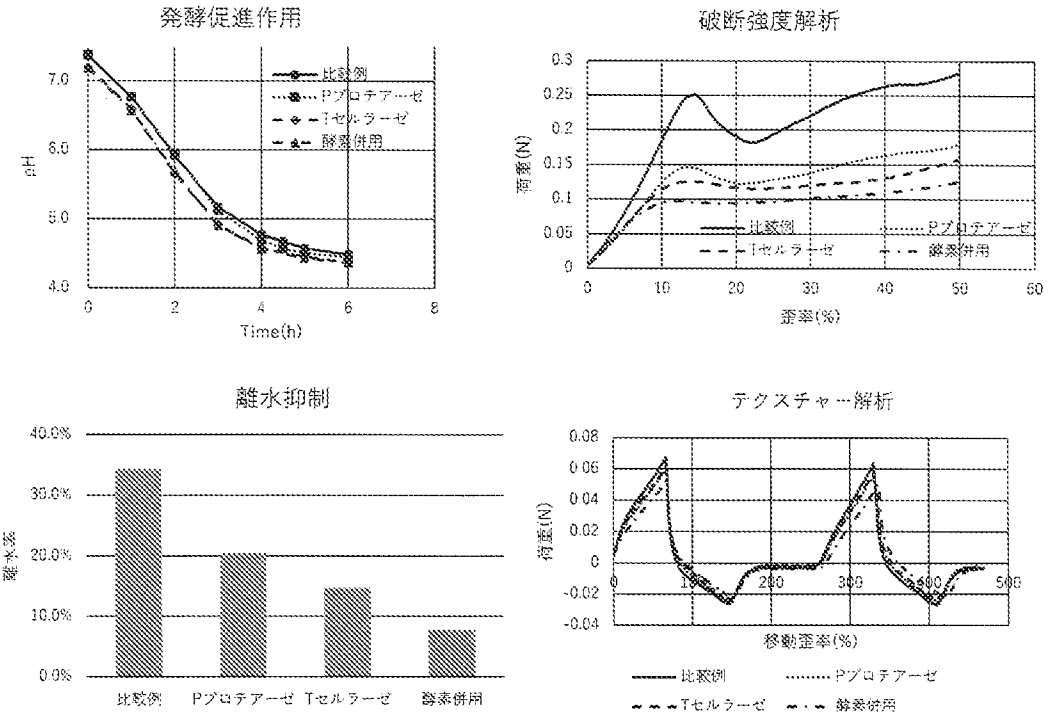


＊比較例11の離水量を100%とした場合の割合を示した

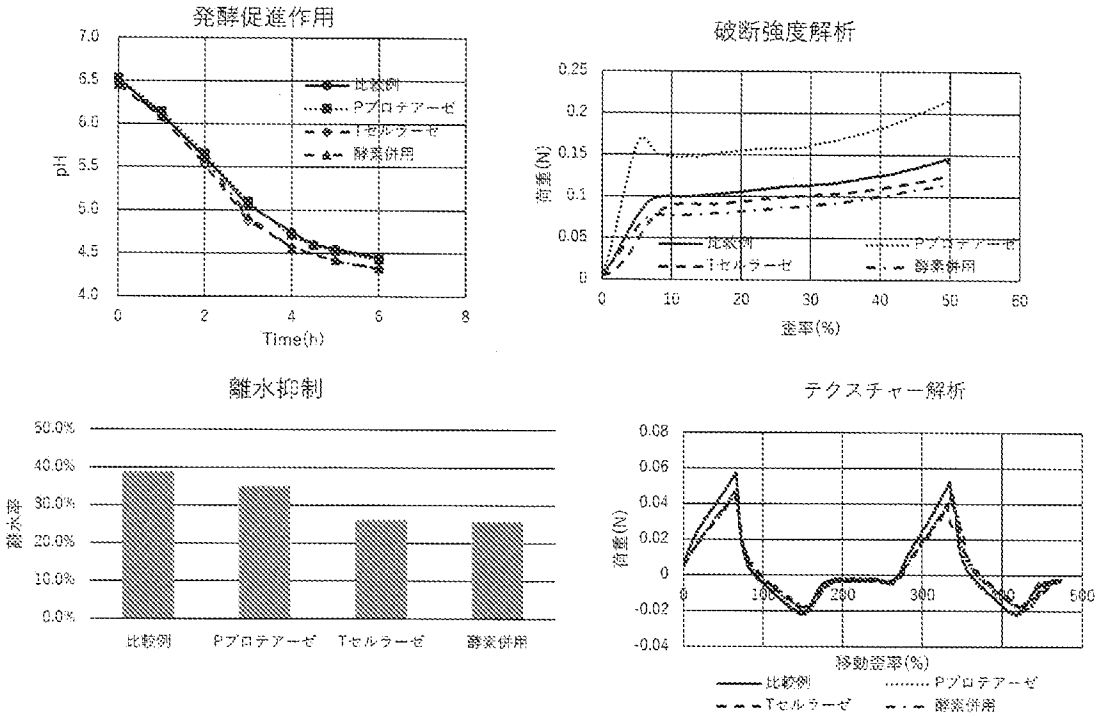
[図15]


pH
Time(h)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ 0.1%
Tセルラーゼ 0.5%
Tセルラーゼ 1.0%
酵素併用

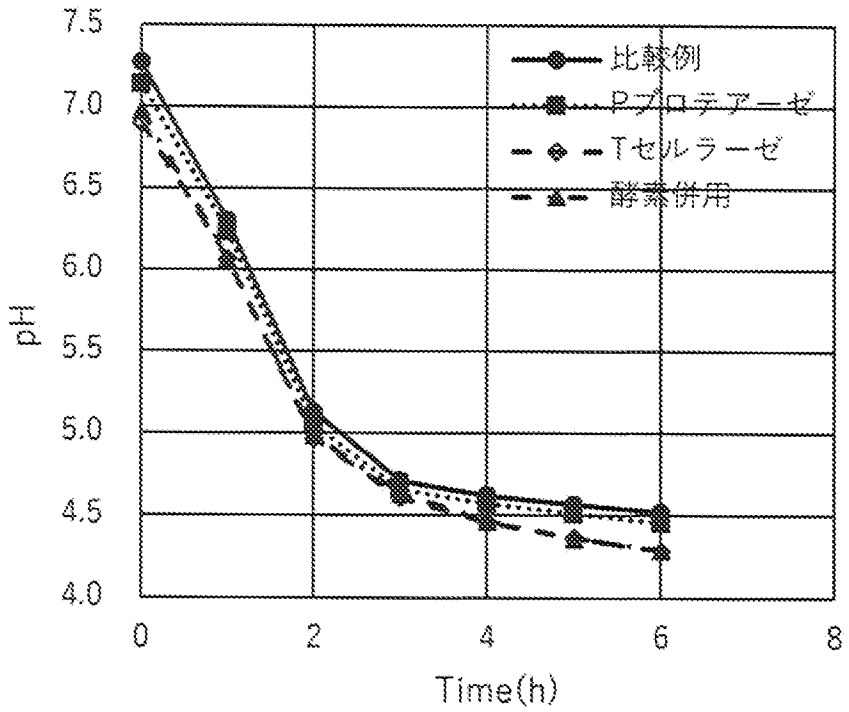
[図16]


発酵促進作用
pH
Time(h)
破断強度解析
荷重(N)
歪率(%)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用
離水抑制
離水率
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用
テクスチャー解析
荷重(N)
移動歪率(%)

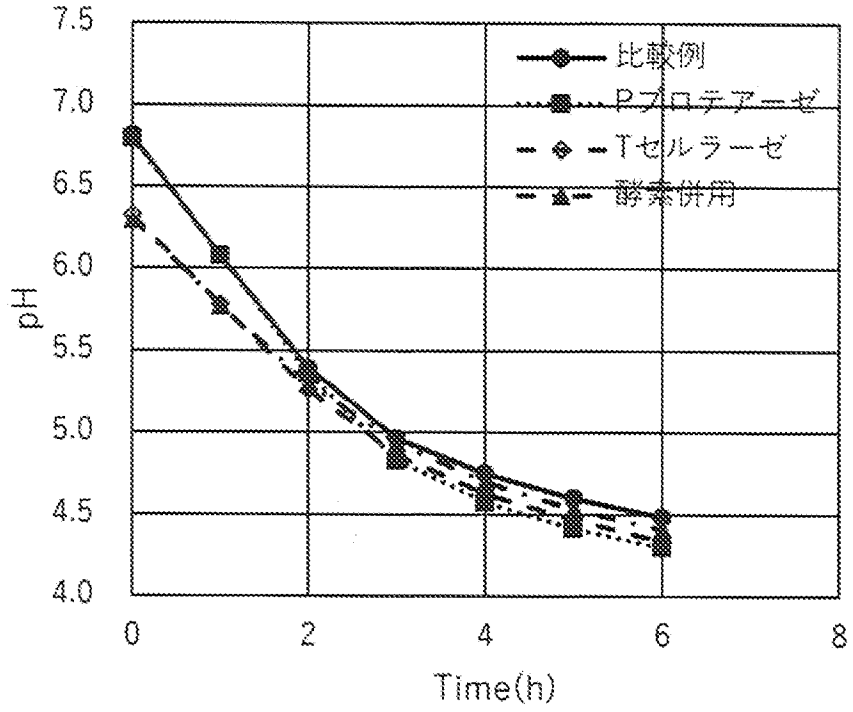
[図17]


発酵促進作用
pH
Time(h)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用
破断強度解析
荷重(N)
歪率(%)
離水抑制
離水率
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用
テクスチャー解析
荷重(N)
移動歪率(%)

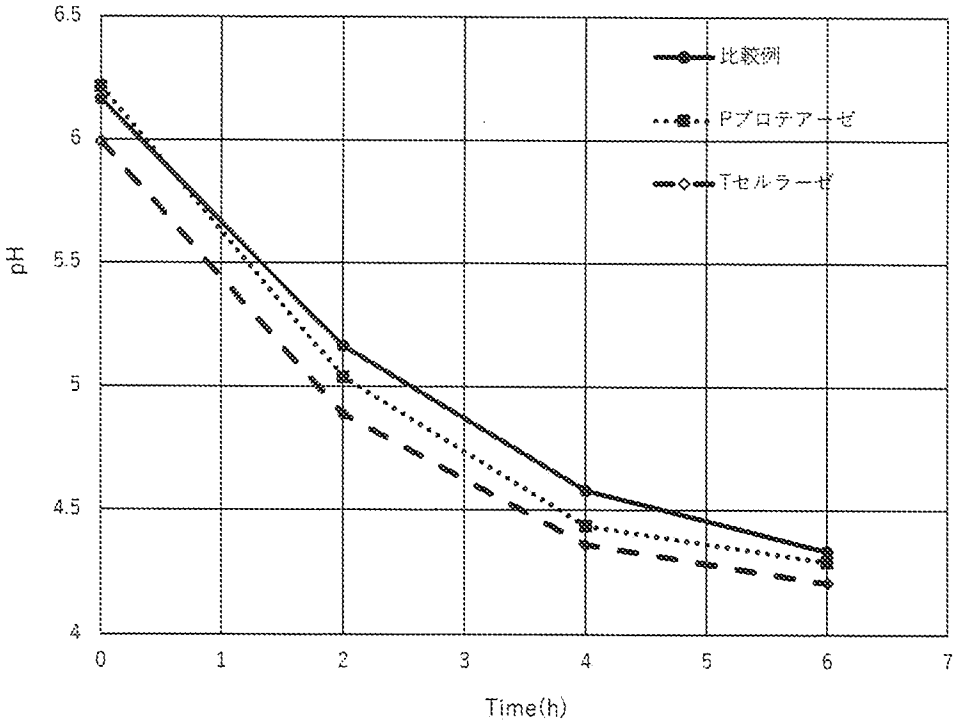
[図18]


pH
Time(h)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用

[図19]


7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
pH
0
2
4
6
8
Time(h)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ
酵素併用

[図20]


6.5
6
5.5
5
4.5
4
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
Time(h)
比較例
Pプロテアーゼ
Tセルラーゼ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/022866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A23C11/10(2021.01)i, A23L5/00(2016.01)i, A23L11/60(2021.01)i, A23L11/65(2021.01)i
FI: A23C11/10, A23L11/60, A23L11/65, A23L5/00J
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)
Int.Cl. A23C1/00-23/00, A23L2/00-2/84, 5/00-5/49, 11/00-11/70

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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 Y	JP 2003-335695 A (NIHON BAIO KABUSHIKI KAISHA) 25 November 2003 (2003-11-25), claims 1-9, paragraphs [0033], [0034], [0039], example 1	1-5, 7-8 6
X Y	WO 2005/032568 A1 (NIHON BAIO KABUSHIKI KAISHA) 14 April 2005 (2005-04-14), claims 1-9, page 8, line 16 to page 9, line 4, page 10, lines 3-11, example 1	1-5, 7-8 6
X Y	JP 2011-135832 A (SHOWA SANGYO CO., LTD.) 14 July 2011 (2011-07-14), claims 1-7, paragraphs [0002], [0014], [0028], [0029], [0042], examples 1-4	1-5, 7-8 6
Y	JP 7-147898 A (OGAWA & CO., LTD.) 13 June 1995 (1995-06-13), claims 1-3, paragraph [0005], examples 1-5	1-8

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 August 2021	17 August 2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/022866

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-67240 A (AKITA PREFECTURE et al.) 09 May 2016 (2016-05-09), paragraph [0006]	1-8
Y	JP 5-268907 A (OGAWA & CO., LTD.) 19 October 1993 (1993-10-19), claims 1-4, paragraphs [0008], [0012]	1-8
Y	JP 2002-320473 A (TEI, Meishun) 05 November 2002 (2002-11-05), claim 1, paragraphs [0009], [0017]	1-8
Y	JP 2008-283948 A (BHN KK) 27 November 2008 (2008-11-27), claims 1-4, paragraphs [0015], [0023]-[0025]	1-8
Y	WO 2018/079758 A1 (GODO SHUSEI KK) 03 May 2018 (2018-05-03), claims 1-9, paragraphs [0023], [0053], [0061]	1-8
Y	WO 2017/104729 A1 (GODO SHUSEI KK) 22 June 2017 (2017-06-22), claims 1-9, paragraphs [0015], [0033], [0045]	1-8
A	糖質に関する酵素, [online], 7 June 2020, 日本酵素協会, [retrieved on 29 July 2021], Internet <URL:https://web.archive.org/web/20200607120848/http://www.j-enzyme.com/enzymelist/enzyme_1.html>, 1.3 β グルカンに関連する酵素(セルラーゼなど), (Japan Enzyme Association), non-official translation (Enzymes related to sugar, 1.3 Enzymes related to β-glucan (cellulase, etc.))	1-8
A	蛋白質・アミノ酸関連, [online], 7 September 2019, 日本酵素協会, [retrieved on 29 July 2021], Internet <URL:https://web.archive.org/web/20190907081337/http://www.j-enzyme.com/enzymelist/enzyme_2.html>, paragraph [0005], (Japan Enzyme Association), non-official translation (Protein / amino acid related)	1-8
A	JP 2019-176780 A (MEIJI CO., LTD.) 17 October 2019 (2019-10-17), claims 1-7, paragraph [0020]	1-8
	JP 2009-82010 A (FUJI OIL CO., LTD.) 23 April 2009 (2009-04-23), paragraph [0005]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/022866

JP 2003-335695 A	25 November 2003	(Family: none)
WO 2005/032568 A1	14 April 2005	(Family: none)
JP 2011-135832 A	14 July 2011	(Family: none)
JP 7-147898 A	13 June 1995	(Family: none)
JP 2016-67240 A	09 May 2016	(Family: none)
JP 5-268907 A	19 October 1993	(Family: none)
JP 2002-320473 A	05 November 2002	KR 10-2002-0069863 A
JP 2008-283948 A	27 November 2008	(Family: none)
WO 2018/079758 A1	03 May 2018	(Family: none)
WO 2017/104729 A1	22 June 2017	US 2018/0368429 A1 claims 1-15, paragraphs [0052]-[0069], [0096], [0097], [0119] EP 3391750 A1 CN 108366571 A
JP 2019-176780 A	17 October 2019	(Family: none)
JP 2009-82010 A	23 April 2009	(Family: none)

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/022866

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A23C 11/10(2021.01)i; A23L 5/00(2016.01)i; A23L 11/60(2021.01)i; A23L 11/65(2021.01)i
FI: A23C11/10; A23L11/60; A23L11/65; A23L5/00 J

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））

A23C1/00-23/00; A23L2/00-2/84,5/00-5/49,11/00-11/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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	JP 2003-335695 A (日本バイオ株式会社) 25.11.2003 (2003-11-25) 請求項1-9, [0033]-[0034], [0039], 実施例1	1-5,7-8
Y	請求項1-9, [0033]-[0034], [0039], 実施例1	6
X	WO 2005/032568 A1 (日本バイオ株式会社) 14.04.2005 (2005-04-14) 請求項1-9, 第8頁第16行-第9頁第4行, 第10頁第3-11行, 実施例1	1-5,7-8
Y	請求項1-9, 第8頁第16行-第9頁第4行, 第10頁第3-11行, 実施例1	6
X	JP 2011-135832 A (昭和産業株式会社) 14.07.2011 (2011-07-14) 請求項1-7, [0002], [0014], [0028]-[0029], [0042], 実施例1-4	1-5,7-8
Y	請求項1-7, [0002], [0014], [0028]-[0029], [0042], 実施例1-4	6
Y	JP 7-147898 A (小川香料株式会社) 13.06.1995 (1995-06-13) 請求項1-3, [0005], 実施例1-5	1-8
Y	JP 2016-67240 A (秋田県 外) 09.05.2016 (2016-05-09) [0006]	1-8
Y	JP 5-268907 A (小川香料株式会社) 19.10.1993 (1993-10-19) 請求項1-4, [0008], [0012]	1-8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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	国際調査報告の発送日
04.08.2021	17.08.2021

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）
中西　聡 40 3638

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

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
Y	JP 2002-320473 A (鄭明俊) 05.11.2002 (2002-11-05) 請求項1, [0009], [0017]	1-8
Y	JP 2008-283948 A (ビーエイチエヌ株式会社) 27.11.2008 (2008-11-27) 請求項1-4, [0015], [0023]-[0025]	1-8
Y	WO 2018/079758 A1 (合同酒精株式会社) 03.05.2018 (2018-05-03) 請求項1-9, [0023], [0053], [0061]	1-8
Y	WO 2017/104729 A1 (合同酒精株式会社) 22.06.2017 (2017-06-22) 請求項1-9, [0015], [0033], [0045]	1-8
A	糖質に関する酵素, [online], 2020.6.7, 日本酵素協会, [2021年7月29日検索], インターネット <URL:https://web.archive.org/web/20200607120848/http://www.j-enzyme.com/enzymelist/enzyme_1.html> 1.3 βグルカンに関連する酵素（セルラーゼなど）	1-8
A	蛋白質・アミノ酸関連, [online], 2019.9.7, 日本酵素協会, [2021年7月29日検索], インターネット <URL:https://web.archive.org/web/20190907081337/http://www.j-enzyme.com/enzymelist/enzyme_2.html> [0005]	1-8
A	JP 2019-176780 A (株式会社明治) 17.10.2019 (2019-10-17) 請求項1-7, [0020]	1-8
A	JP 2009-82010 A (不二製油株式会社) 23.04.2009 (2009-04-23) [0005]	1-8

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/JP2021/022866

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2003-335695 A	25.11.2003	（ファミリーなし）	
WO 2005/032568 A1	14.04.2005	（ファミリーなし）	
JP 2011-135832 A	14.07.2011	（ファミリーなし）	
JP 7-147898 A	13.06.1995	（ファミリーなし）	
JP 2016-67240 A	09.05.2016	（ファミリーなし）	
JP 5-268907 A	19.10.1993	（ファミリーなし）	
JP 2002-320473 A	05.11.2002	KR 10-2002-0069863 A	
JP 2008-283948 A	27.11.2008	（ファミリーなし）	
WO 2018/079758 A1	03.05.2018	（ファミリーなし）	
WO 2017/104729 A1	22.06.2017	US 2018/0368429 A1 Claims 1-15, [0052]-[0069], [0096]-[0097], [0119] EP 3391750 A1 CN 108366571 A	
JP 2019-176780 A	17.10.2019	（ファミリーなし）	
JP 2009-82010 A	23.04.2009	（ファミリーなし）	