

(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
2016年9月29日(29.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/152590 A1

- (51) 国際特許分類:
A23C 11/10 (2006.01) A23L 11/20 (2016.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057848
- (22) 国際出願日: 2016年3月11日(11.03.2016)
- (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 2015-062251 2015年3月25日(25.03.2015) JP
- (71) 出願人: フジッコ株式会社(FUJICCO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒6508558 兵庫県神戸市中央区港島中町
6丁目13番地4 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 内田 英伸(UCHIDA Hidenobu); 〒6508558
兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地4
フジッコ株式会社内 Hyogo (JP). 尾▲崎▼ 薫
(OZAKI Kaoru); 〒6508558 兵庫県神戸市中央区港
島中町6丁目13番地4 フジッコ株式会社内
Hyogo (JP). 戸田 登志也(TODA Toshiya); 〒
6508558 兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目1
3番地4 フジッコ株式会社内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 西藤 征彦, 外(SAITOH Yukihiko et al.);
〒5300054 大阪府大阪市北区南森町2丁目2番
7号 シティ・コーポ南森町802 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, 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:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FERMENTED SOY MILK PRODUCT AND FERMENTED SOY MILK PRODUCT OBTAINED THEREBY

(54) 発明の名称: 豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物

(57) Abstract: A fermented soy milk product having a high viscosity and stringiness is produced by enzymatically treating soy milk with a neutral protease and then fermenting the same with the use of a lactic acid bacterium that produces a stringy exopolysaccharide. Namely, provided are: a method for producing a fermented soy milk product wherein fermentation by a lactic acid bacterium that produces an exopolysaccharide is promoted so that a fermented soy milk product having a high viscosity and stringiness and exhibiting a characteristic texture can be well produced; and a fermented soy milk product produced by the aforesaid method.

(57) 要約: 豆乳に対し中性プロテアーゼによる酵素処理を行った後、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を用いて発酵させることにより、高粘度かつ曳糸性を有する豆乳発酵物を製造する。したがって、菌体外多糖を産生する乳酸菌による発酵を促し、粘性や曳糸性が高く独特の食感を示す豆乳発酵物を良好に製造することができる、豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物を提供することができる。



WO 2016/152590 A1

明 細 書

発明の名称：

豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物

技術分野

[0001] 本発明は、豆乳を発酵させてなる豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物に関するものであり、詳しくは、粘性や曳糸性が高く独特の食感を有する豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、消費者の健康志向の高まりから、植物性タンパク質が注目されている。とりわけ、大豆を原料とする豆乳は、良質のタンパク質に富み、ノンコレステロールで、ミネラルも豊富に含んでいる。また、豆乳は、乳アレルギーを有する人々でも安心して飲食できることから、通常の食材としてはもとより、健康食品としての用途も期待されている。

[0003] そのようななか、豆乳を乳酸菌により発酵させた豆乳発酵物も各種提案されており、その使用に適した乳酸菌の種類や製造条件においても様々な研究がなされている（例えば、特許文献 1～6 参照）。また、発酵豆乳において、乳酸菌と中性プロテアーゼや糖との併用、酢酸菌との併用に関しても過去に検討されている（例えば、特許文献 7，8 参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平 10－201416 号公報

特許文献2：特開 2000－217510 公報

特許文献3：特開平 10－229841 号公報

特許文献4：特開平 5－184320 号公報

特許文献5：特開平 10－201415 号公報

特許文献6：特開 2004－261174 号公報

特許文献7：特開平7－147898号公報

特許文献8：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] 本出願人は、上記特許文献6において、豆乳中に、クレモリス菌と酢酸菌とを共棲状態にし、これによって豆乳を発酵させて、呈味性に優れ、かつ特有の食感および優れた生理作用を有する豆乳発酵物を得る研究を既に行っている。しかしながら、曳糸性や粘性、さらには保存性（品質維持期間）の観点において、牛乳発酵物と比較して、未だ改善の余地がある。
- [0006] 一方、上記特許文献7においては、豆乳に乳酸菌および糖と、中性プロテアーゼなどを使用して作るカード状の発酵物に関する技術が開示されており、口当たりや苦味、飲料にした際の沈殿の出来難さを、その効果として謳っていることから、粘性や曳糸性等の向上効果を期待するものではない。また、上記特許文献8においては、豆乳を酵素処理する記載があり、乳酸菌の使用に関しても記載されているが、その乳酸菌はラクトバチルス・ブレビスに限定されており、粘性や曳糸性等の向上効果を期待するものではない。特許文献7および8には、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌の記載は見られないことから、曳糸性向上や、保存中の粘度維持に関する内容のものでなく、またそれらに関する検討も全くなされていないと考えられる。
- [0007] 本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、菌体外多糖を産生する乳酸菌による発酵を促し、粘性や曳糸性が高く独特の食感を示す豆乳発酵物を良好に製造することができる、豆乳発酵物の製法およびそれにより得られた豆乳発酵物の提供をその目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 上記目的を達成するため、本発明は、豆乳を乳酸菌により発酵させてなる豆乳発酵物の製法であって、豆乳に対し中性プロテアーゼによる酵素処理を行い、上記乳酸菌として、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を用いて発酵させる豆乳発酵物の製法を第1の要旨とする。

[0009] また、本発明は、上記第1の要旨の豆乳発酵物の製法により得られる豆乳発酵物であって、その10℃における粘度が4000～12000 mPa・sであり、Zahn Cup使用における液切れ時間が10秒以上である豆乳発酵物を第2の要旨とする。

[0010] すなわち、本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究を重ねた。その研究の過程において、豆乳に対し中性プロテアーゼによる酵素処理を行い、その処理された豆乳中に、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を加えて発酵させたところ、中性プロテアーゼにより豆乳の大豆タンパクが低分子化されることに起因し、牛乳を配合しなくても、また特許文献6等に見られる従来製法によって得られた豆乳発酵物に比べても、粘性や曳糸性において高い改善効果が認められ、さらになめらかさ等の食感に優れることを見出し、本発明に想到した。本発明において、上記「曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌」とは、牛乳発酵において曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌のことを言う。

発明の効果

[0011] このように、本発明の豆乳発酵物の製法は、豆乳中に、中性プロテアーゼを加え、さらに曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を用いて発酵させることにより行われる。これにより、従来製法に比べ、粘性や曳糸性において高い改善効果が認められる豆乳発酵物を良好に製造することができる。

[0012] 特に、上記乳酸菌として、曳糸性菌体外多糖産生能を有するラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスもしくはストレプトコッカス サーモフィラスを用いると、特定の粘度および曳糸性を示す本発明の豆乳発酵物を、効率的に製造することができる。

[0013] また、上記乳酸菌とともに酢酸菌を加えて発酵させると、より保存性に優れた豆乳発酵物を得ることができる。

[0014] また、上記豆乳中に糖類を加えた後、上記乳酸菌により発酵させると、カード形成をより良好に行うことができる。

[0015] 本発明の豆乳発酵物の製法により得られた豆乳発酵物は、その10℃にお

ける粘度が4000～12000 mPa・s、曳糸性の指標であるZahn Cup使用における液切れ時間が10秒以上といった、従来の豆乳発酵物では示さないような高い粘性および曳糸性を示し、さらになめらかさ等の食感に優れている。しかも、上記豆乳発酵物は、豆乳の青臭みや収斂味等の不快な味や臭いが著しく低減されていることから、呈味性にも優れている。また、上記豆乳発酵物は、菌体外多糖の含有量が多いことから、生理作用（整腸作用、免疫賦活作用等）にも優れている。さらに、上記豆乳発酵物は、長期保存による品質低下が少ないといった利点も有する。

[0016] また、上記豆乳発酵物は、その保存中の離水率が3%（総重量比）以下であると、品質維持特性に優れている。

発明を実施するための形態

[0017] つぎに、本発明を実施するための形態について説明する。

[0018] 本発明の豆乳発酵物の製法は、豆乳中に、中性プロテアーゼを加え、さらに曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を用いて発酵させることにより行われる。なお、上記乳酸菌の植菌は、豆乳中にプロテアーゼを加えると同時に行ってもよいが、先にプロテアーゼを加えて酵素処理を行い、その後酵素を失活させてから植菌して発酵させたほうが、発酵後のカード物性を制御する観点から好ましい。

[0019] 上記発酵条件は、20～35℃（好ましくは25℃）で、6～48時間（好ましくは7～10時間）で行われる。また、上記酵素反応の失活は、通常、加熱により行われる。

[0020] 本発明の豆乳発酵物の製法に使用される豆乳としては、例えば、油脂を含有した丸大豆、脱皮大豆、フレーク大豆、緑豆等を原料として用い、それを水に浸した後ひき碎き、水を加えて煮て濾すことにより得られた乳液状の液が用いられる。

[0021] また、本発明の豆乳発酵物の製法に使用されるプロテアーゼとしては、中性を示す豆乳に対してプロテアーゼ活性を良好に示す必要があることから、上記のように中性プロテアーゼ（プロテアーゼ活性の至適pH値が中性領域

(例えば、pH 5.0～8.0)にある酵素)が用いられる。上記中性プロテアーゼとしては、例えば、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、アスペルギス (*Aspergillus*) 属等の微生物由来のプロテアーゼがあげられる。なかでもアスペルギス (*Aspergillus*) 属由来のプロテアーゼが、大豆タンパクの分解を良好に行うことができるため好ましい。

[0022] なお、豆乳中への中性プロテアーゼの添加量は、発酵後のカード物性により判断すればよいが、通常、豆乳に対し1～100ppmの割合で含有するよう添加される。中性プロテアーゼの添加量が少なすぎると、曳糸性の改善効果が得られず、逆に、中性プロテアーゼの添加量が多すぎると、カードが形成されず好ましくない。

[0023] また、上記製法に用いられる「曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌」とは、先にも述べたように、本発明においては、牛乳発酵において曳糸性菌体外多糖 (Exopolysaccharide: EPS) を産生する乳酸菌のことを言う。曳糸性菌体外多糖を産生しているか否かは、上記乳酸菌により、それぞれの菌に適した温度と培養時間で牛乳を醗酵させたものについて、Zahn Cup (RIG0: 型式417 No. 7) を使用したときの10℃での液切れ時間を計測し、その時間が20秒以上かかるものが、曳糸性菌体外多糖を産生していると判断することができる。なお、上記液切れ時間は、液が流れ始めて、途切れるまでの時間のことを言い、Zahn Cupへのサンプル供給は、牛乳発酵物の入った容器をスプーンで底から上部に掬い上げるように混ぜてカードを崩し、一回混ぜるたびに容器を60度回し、別の角度からまた混ぜることを6回繰り返した後、Zahn Cupに摺り切り一杯流し込み、20cmの高さから滴下させることにより行われる。

[0024] 上記の、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌としては、曳糸性菌体外多糖産生能を有するラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスもしくはストレプトコッカス サーモフィラスが好ましく用いられる。なお、ラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスや、スト

レプトコッカス サーモフィラスであっても、曳糸性菌体外多糖を産生しないものは、本発明で使用することはできない。そして、上記のように曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌は、例えば、特定生息域での微生物の採取や、いわゆるスクリーニングによる選別作業等により得ることができる。

[0025] 特に、上記乳酸菌として、ラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリス FC (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC, FERM P-20185) を用いることが、曳糸性菌体外多糖の含有率をより増加させ、より生理作用（整腸作用、免疫賦活作用等）の高い豆乳発酵物を得る観点から好ましい。

[0026] なお、上記のラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリス FC (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC, FERM P-20185) は、本出願人が寄託し、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（現在の、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター）に受託された菌株であり、曳糸性菌体外多糖を産生する特徴がある（受託日：2004年8月24日）。またラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリス FCは、摂氏10℃以上で増殖する特性を有し、摂氏25～30℃を至適温度としており、さらに、培地上に、白～乳白状の粘稠性を有するコロニーを形成し、例えば、BCP培地上に、25℃×2日培養すると、直径0.5～1.0mmの円形（半球状）コロニーとなる。また、培養条件や生理的状态によるコロニー形態の変化はない。

[0027] また、上記豆乳への乳酸菌の添加は、例えば、その菌体が凍結乾燥され粉末状となったものである場合、活性化させたもの（スターター）とし、それを添加することが好ましい。上記スターターは、例えば、グルコースを1%加えた豆乳に乳酸菌粉末を添加し、20～30℃（好ましくは25℃）で6～48時間（好ましくは7～10時間）活性化させることにより得られる。そして、このようにして得られたスターターは、その生菌数が 10^8 c f u / g以上のものが好ましく用いられ、その添加量は、豆乳発酵物原料全体に対し、好ましくは0.01～10重量%の範囲であり、より好ましくは0.1

～4.0重量%の範囲である。

[0028] ところで、本発明の豆乳発酵物の発酵と保存を嫌気培養で行うことが、豆乳発酵物の保存性の観点から好ましい。なぜなら、好気条件にさらされると、上面よりタンパク質の凝集が進み、経時により豆乳発酵物の上層部が凝集・離水し、二層状を呈するといった問題が生じるからである。また、経時により豆乳発酵物の色がくすんで灰色になるといった症状もみられる。

[0029] 上記のような嫌気培養を実現する方法として、脱酸素剤の使用や、嫌気チャンバーでの培養なども考えられるが、好ましくは、上記乳酸菌とともに、酢酸菌を加えて発酵させる方法があげられる。すなわち、酢酸菌は酸素の消費量が高いことから、容易に嫌気培養を実現することができるからである。さらに、上記乳酸菌とともに、酢酸菌を加えて発酵させると、経時により豆乳発酵物の色がくすんで灰色になるといった症状も抑えられる効果が得られる。なお、豆乳への酢酸菌の添加は、例えば、その菌体が凍結乾燥され粉末状となったものである場合、活性化させたもの（スターター）とし、それを添加することが好ましい。上記スターターは、例えば、グルコースを1%加えた豆乳に酢酸菌粉末を添加し、25～35℃（好ましくは30℃）で8～48時間（好ましくは12～24時間）攪拌培養（100rpm）させることにより得られる。そして、このようにして得られたスターターは、その生菌数が 10^8 cfu/g以上のものが好ましく用いられ、その添加量は、豆乳発酵物原料全体に対し、好ましくは0.1重量%以上であり、より好ましくは0.1～4.0重量%の範囲である。

[0030] 上記酢酸菌としては、例えば、アセトバクター（*Acetobacter*）属、グルコノバクター（*Gluconobacter*）属、グルコンアセトバクター（*Gluconacetobacter*）属等に属する酢酸菌があげられ、これらは単独であるいは二種以上併せて用いられる。そして、上記アセトバクター属に属する酢酸菌としては、例えば、アセトバクター・オリエンタリス（*Acetobacter orientalis*）、アセトバクター・アセチ（*Acetobacter aceti*）、アセトバクター・オルレアネンシス（*Acetobacter orleanensis*）等があげられる。

- [0031] また、本発明の豆乳発酵物の製法では、カード形成の観点から、必要に応じ、その材料である豆乳中に糖類を加えた後、上記乳酸菌による発酵を行ってもよい。なお、糖類の添加は、豆乳の中性プロテアーゼ処理前であっても後であってもよい。
- [0032] 上記糖類としては、例えば、ラクトース、フルクトース、グルコース等があげられる。なかでも、ラクトースを使用することが、豆乳発酵物の経時による酸度上昇を抑え、さらに経時変化による上層部凝集およびそれに伴い発生する離水量を抑える効果が高いため、好ましく用いられる。なお、調味目的で、オリゴ糖などを使用しても、生成する酸度には大きく影響しない為、その使用に問題はない。
- [0033] 豆乳中へラクトースを加える場合、その添加量は、豆乳発酵物原料全体に対し、好ましくは0.3～1.0重量%の範囲であり、より好ましくは0.3～0.5重量%の範囲である。
- [0034] 以上のような本発明の製法により得られる豆乳発酵物は、従来の豆乳発酵物では示さないような高い粘性や曳糸性を示すものであり、独特の食感を有する。詳しくは、その10℃における粘度が4000～12000 mPa・s（好ましくは5000～9000 mPa・s）であり、Zahn Cup使用における液切れ時間が10秒以上を示す豆乳発酵物が得られるようになる。
- [0035] 本発明において、上記粘度は、品温10℃の豆乳発酵物に対し、B型粘度計で測定された粘度であり、BROOKFIELD社製のB型粘度計では、スピンドルLV-4により、回転速度50 rpmで測定することができる。また、上記「Zahn Cup使用における液切れ時間」とは、Zahn Cup（RIGO：型式417 No. 7）を使用したときの液切れ時間を計測して曳糸性の指標とするものである。なお、液切れ時間は、液が流れ始めて、途切れるまでの時間のことを言い、Zahn Cupへのサンプル供給は、豆乳発酵物の入った容器をスプーンで底から上部に掬い上げるように混ぜてカードを崩し、一回混ぜるたびに容器を60度回し、別の角度からま

た混ぜることを6回繰り返した後、Z a h n C u pに摺り切り一杯流し込み、20cmの高さから滴下させることにより行われる。

[0036] また、本発明の製法により得られる豆乳発酵物は、その発酵微生物由来の曳糸性菌体外多糖の含有割合が高く、曳糸性が高く、さらに、生理作用（整腸作用、免疫賦活作用、ストレス由来の皮膚血流低下改善作用や皮膚機能改善作用、血中HDLコレステロールの割合を増やす働き等）が高く、そのため、健康面においても、より優れた効果を発揮する。

[0037] また、上記豆乳発酵物は、品質維持の観点から、保存中の離水率が3%（総重量比）以下であることが好ましい。このような豆乳発酵物は、例えば、豆乳中へ添加するラクトースの濃度を制限することにより、容易に得ることができる。

[0038] なお、このようにして得られた本発明の豆乳発酵物には、必要に応じ、調味等のために、糖類、水、果肉、果汁、香料、酸味料等を加えても良い。

[0039] 本発明の豆乳発酵物は、豆乳ヨーグルト、豆乳ヨーグルト飲料、豆乳ヨーグルトペースト（料理素材）といったものとして適用することができる。

実施例

[0040] つぎに実施例について比較例と併せて説明する。ただし、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。また、以下の記述で「%」とあるのは、特に断りのない限り重量基準である。

[0041] まず実施例および比較例に先立ち、下記に示すスターター（1），（2）を調製した。

[0042] [スターター（1）]

ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス F C（FERM P-20185）を、グルコース1.0%加えた無調整豆乳100mlに添加し、摂氏25℃環境下で8時間発酵を行い、クレモリス菌を 10^8 cfu/g含有するスターター（スターターF C）を調製した。また、アセトバクター・オリエンタリス（NBRC 16606）を、グルコース1.0%を加えた無調整豆乳300mlに添加し、摂氏30℃環境下で24時間培養させて、 10^8 cfu/g

含有するスターター（スターターF A）を調製した。そして、植菌時はそれぞれ、スターターF C 4. 0 %、スターターF A 1. 0 %を添加し、これをスターター（1）とした。

[0043] [スターター（2）]

スターターF Aを添加せず、スターター（1）の調製方法に従って得られたスターターF Cのみを、スターター（2）として用いた。

[0044] [実施例1, 2、比較例1, 2]

＜曳糸性と粘度継時劣化について＞

豆乳（無調整豆乳）に、ラクトースの割合が0. 4 %となるよう調合液を調合した。そして、実施例では、上記調合液に、中性プロテアーゼ製剤（コクラゼP、三菱化学フーズ社製）を100ppm添加し、その後、50℃で30分間保持して酵素反応を行い、その後80℃で20分間加熱しプロテアーゼを失活させた。比較例では、上記酵素反応は行わなかった。そして、このようにして得た調合液に対し、後記の表1に示す組合せで、上記調製のいずれかのスターターを4重量%植菌し、よく振とうした後、摂氏25℃環境下で8時間発酵を行い目的とする豆乳発酵物を得た。

[0045] このようにして得られた豆乳発酵物を、下記の基準に従い、各特性の評価を行った。そして、これらの結果を後記の表1に併せて示した。

[0046] [粘度]

B型粘度計（BROOKFIELD社製、スピンドルLV-4使用、回転速度50rpm）を用い、これにガードを装着し、10℃の豆乳発酵物に対し粘度測定を行った。そして測定開始1分後の粘度（mPa・s）を、その測定値とした。

[0047] [曳糸性]

Zahn Cup（RIGO：型式417 No. 7）に擦切り一杯入れた豆乳発酵物を滴下させ、その際の『液切れ時間』を計測し、曳糸性の指標とした。なお、『液切れ時間』は、液が流れ始めて、途切れるまでの時間を測定し、初めの液切れ時間が1分以上の場合は、その測定時間を『液切れ

時間』とし、1分以内に複数回液切れした場合は、1回目に液切れしてから2回目に液切れするまでの時間を『液切れ時間』とした。また、Zahn Cupへのサンプル供給は、豆乳発酵物の入った容器をスプーンで底から上部に掬い上げるように混ぜてカードを崩し、一回混ぜるたびに容器を60度回し、別の角度からまた混ぜることを6回繰り返した後、Zahn Cupに摺り切り一杯流し込み、20cmの高さから滴下させることにより行った。

[0048] [表1]

	実施例		比較例	
	1	2	1	2
スターターの種類	(1)	(2)	(1)	(2)
スターターFA	有	無	有	無
酵素処理	有		無	
粘度(mPa・s)	9,766	10,378	9,838	9,526
曳糸性(液切れ時間(秒))	46	44	4	2

[0049] 上記表1の結果から、実施例の豆乳発酵物は、比較例の豆乳発酵物に比べ、粘度は大きく変わらないが、曳糸性に関しては、酵素処理を行うことにより、Zahn Cupによる液切れまでの時間が大幅に伸び、その向上も著しいことから、実施例では曳糸性菌体外多糖が産生されていることがわかる。

[0050] また、実施例1と比較例2の豆乳発酵物を、ともに10℃温度下で19日間保存した後、上記測定方法に従い、その粘度を測定した。そして、表1に示す実施例1の豆乳発酵物と比較例1の豆乳発酵物の粘度(初期粘度)と対比し、上記放置による粘度の減少割合(%)を計算したところ、実施例1の豆乳発酵物では8.6%減少したのに対し、比較例2の豆乳発酵物では30.6%も減少した。このことから、実施例1の豆乳発酵物は、比較例2の豆乳発酵物よりも粘度劣化が生じにくいことが分かる。

[0051] なお、実施例2の豆乳発酵物は、好気条件にさらされると、経時的変化に

より豆乳発酵物の上部が凝集し、結果、二層状になるといった問題が生じたが、実施例1の豆乳発酵物は、このような問題を生じず、保存性の観点で優れていた。このようになる理由は、実施例2で使用するスターター（2）にはアセトバクター・オリエンタリスが添加されておらず、アセトバクター・オリエンタリスによる嫌気条件が作られなかった（嫌気培養がなされなかった）ことに起因すると考えられる。

[0052] [実施例3～7]

＜酢酸菌添加による二層化、変色抑制効果＞

豆乳（無調整豆乳）に、ラクトースの割合が0.4%となるよう調合液を調合した。そして、上記調合液に、中性プロテアーゼ製剤（パンチダーゼN P-2、ヤクルト薬品工業社製）を100ppm添加し、その後、50℃で30分間保持して酵素反応を行い、その後80℃で20分間加熱しプロテアーゼを失活させた。このようにして得た調合液に対し、前記調製のスターター（1）、スターター（2）のいずれかのスターターを、後記の表2に示す組合せで、4.0重量%植菌し、よく振とうした後、摂氏25℃環境下で8時間発酵を行い目的とする豆乳発酵物を得た。なお、スターター（1）を用いたものにおいては、スターターFAの添加量を、後記の表2に示す割合にそれぞれ変更した。

[0053] [二層化の度合い]

継時的に凝集の進む上部の凝集層の厚みを、発酵翌日と22日経過後に測定し、さらに、二層化進行率（倍）を算出した。

[0054]

[表2]

		実 施 例				
		3	4	5	6	7
スターターの種類		(2)	(1)	(1)	(1)	(1)
スターターF A添加量(重量%)		—	0.01	0.10	1.00	4.00
二層化(cm)	発酵翌日	1.2	1.2	0.6	0.0	0.0
	22日経過後	3.0	2.5	1.0	0.5	0.0
二層化進行率(倍)		2.5	2.1	1.7	—	—

[0055] 上記表2の結果から、実施例3、4では発酵翌日から上部凝集層が1cmを超えているのに対して、実施例5～7では、酢酸菌の添加量が増えるに従い薄くなり、22日後でも1cmを超えなかった。このことから酢酸菌の添加により上部凝集層の生成を抑制することが出来ると言える。また、その添加濃度は、0.1重量%以上で二層化の抑制に有効であり、4重量%で完全に二層化を抑制することができた。さらに、実施例5～7では、実施例3、4に比べ、経時により豆乳発酵物の色がくすんで灰色になるといった症状も抑えられる効果が得られた。

[0056] [実施例8～11]

＜ラクトース添加量による酸度と離水量＞

豆乳（無調整豆乳）に、ラクトースを後記の表3に記入した濃度で添加し、中性プロテアーゼ製剤（コクラーゼP、三菱化学フーズ社製）を10ppm添加した後、50℃で30分間保持して酵素反応を行い、80℃で20分間加熱しプロテアーゼを失活させた。このようにして得られた調合液900mlに対し、前記調製のスターター（1）を100ml加えて植菌し、上記調合液をよく振とうした後、摂氏25℃環境下で8時間培養して発酵を促し、目的とする豆乳発酵物を得た。

[0057] このようにして得られた豆乳発酵物に関し下記の基準に従い、各特性の評価を行った。そして、これらの結果を後記の表3に併せて示した。

[0058] [酸度]

「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」の「乳等の成分規格の試験法」に書かれている酸度の測定方法に従い、豆乳発酵物の乳酸酸度（％）を測定した。なお、上記測定は、製造直後の豆乳発酵物（初期）と、それを１０℃温度下で２９日間保存した後のもの（放置後）に対して行った。

[0059] 〔離水量〕

１０℃温度下で２９日間保存した豆乳発酵物の離水量（％）を、総重量に占める割合として測定した。

[0060] 〔表3〕

		実 施 例			
		8	9	10	11
ラクトース濃度		1.0%	0.5%	0.4%	0.3%
酸度 (%)	初期	0.73	0.71	0.66	0.52
	29日後	0.75	0.79	0.62	0.49
離水量(%)		2.8	2.8	1.4	0.1

[0061] 上記表3の結果から、ラクトースの濃度を制限することにより、経時による酸度や離水量の上昇を抑える効果が高いことがわかる。因みに、ラクトース濃度0.3%未満であるとカードを形成せず、また、ラクトース濃度が1.0%を上回ると甘味と酸味が強くなり好ましくない品質となった。

[0062] 〔実施例12～14、比較例3～5、参考例1～12〕

＜菌体外多糖類産生・非産生の乳酸菌での曳糸性比較＞

下記の表4および表5に示すように、豆乳培地、牛乳培地のいずれかを用いた。なお、豆乳を培地とするものは、無調整豆乳に、ラクトース0.4%、グラニュー糖6.0%、粉末水飴1.0%を添加したものを、その培地とした。また、牛乳を培地とするものは、上記のような糖類を添加せず、その培地とした。そして、実施例および比較例では、下記の表4および表5に示すように、上記培地に、酵素処理を行った。上記酵素処理は、培地に、中性プロテアーゼ製剤（パンチダーゼNP-2、ヤクルト薬品工業社製）を100ppmになるように添加し、50℃で30分間反応させ、その後、80℃

で20分加熱し、酵素失活と殺菌を行い、30℃まで冷却することにより、行った。このようにして得られた調合液900mlに対し、下記の表4および表5に示す乳酸菌を用いた各スターターを100ml加えて植菌し、上記調合液をよく振とうした後、クレモリス菌は摂氏25℃環境下で、サーモフィラス菌は摂氏35℃環境下でそれぞれ8時間培養して発酵を促し、目的とする発酵物を得、その発酵物の「曳糸性」を、前記曳糸性評価試験で行った液切れ時間（秒）と同様にして測定した。

[0063] なお、上記各スターターは、前記調製のスターター（1）に準じ、その乳酸菌として、下記の表4および表5に示す乳酸菌を用いて調製したものである。そして、下記の表4および表5に示す乳酸菌に関し、「クレモリスFC」は、前記調製のスターター（1）に使用の乳酸菌と同じものであり、「サーモフィラスFJST001」は、ストレプトコッカス サーモフィラスFJST001であり、「クレモリスFJCL001」は、ラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスFJCL001である。これら三種の乳酸菌は、曳糸性菌体外多糖類を産生する乳酸菌である。また、下記の表に示す「クレモリスC4」は、ラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスC4であり、「クレモリス基準株」は、ラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスATCC19257（基準株）であり、これら二種の乳酸菌は、菌体外多糖類を産生しない乳酸菌である。また、下記の表に示す「サーモフィラスFJST002」は、ストレプトコッカス サーモフィラスFJST002であり、この乳酸菌は、曳糸性のない菌体外多糖類を産生する乳酸菌である。これらの菌株は、出願人により管理している菌株である。

[0064]

[表4]

	参考 例 1	参考 例 2	実施 例 12	参考 例 3	参考 例 4	実施 例 13	参考 例 5	参考 例 6	実施 例 14
乳酸菌	クレモリス F C			サーモフィラス FJST001			クレモリス FJCL001		
培地	牛乳	豆乳	豆乳	牛乳	豆乳	豆乳	牛乳	豆乳	豆乳
酵素処理	無し	無し	有り	無し	無し	有り	無し	無し	有り
曳糸性(液切れ時間(秒))	100	2	65	21	3	27	90	4	64

[0065] [表5]

	参考例 7	参考例 8	比較例 3	参考例 9	参考例 10	比較例 4	参考例 11	参考例 12	比較例 5
乳酸菌	クレモリス C 4			クレモリス基準株			サーモフィラス FJST002		
培地	牛乳	豆乳	豆乳	牛乳	豆乳	豆乳	牛乳	豆乳	豆乳
酵素処理	無し	無し	有り	無し	無し	有り	無し	無し	有り
曳糸性(液切れ時間(秒))	4	3	2	2	2	4	2	2	3

[0066] 上記表 4 および表 5 の結果より、牛乳発酵において曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を使用した実施例 12～14 では、豆乳のプロテアーゼ処理により、高い曳糸性を示す豆乳発酵物が得られていることが、その参考例との液切れ時間の対比からわかる。これに対し、比較例 3, 4 で使用の乳酸菌は、牛乳発酵において菌体外多糖の産生能を有しておらず、豆乳のプロテアーゼ処理を行っても、曳糸性を示す豆乳発酵物が得られないことが、その参考例との液切れ時間の対比からわかる。因みに、比較例 5 で使用の乳酸菌は、牛乳発酵において菌体外多糖を産生するが、その菌体外多糖は曳糸性を有するものではなく、豆乳のプロテアーゼ処理を行っても、その乳酸発酵により曳糸性を示す豆乳発酵物が得られないことがわかる。

[0067] なお、上記実施例においては、本発明における具体的な形態について示し

たが、上記実施例は単なる例示にすぎず、限定的に解釈されるものではない。当業者に明らかな様々な変形は、本発明の範囲内であることが企図されている。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明の豆乳発酵物の製法は、従来製法に比べ、粘性や曳糸性において高い改善効果が認められる豆乳発酵物を効果的に製造することができる。また、その製法により得られた豆乳発酵物は、粘度や曳糸性が高く、しかも、豆乳の青臭みや収斂味等の不快な味や臭いが著しく低減されていることから、呈味性にも優れている。また、上記豆乳発酵物は、菌体外多糖の含有量も多く、生理作用（整腸作用、免疫賦活作用等）にも優れている。さらに、上記豆乳発酵物は、長期保存による品質低下が少ないといった利点も有する。これらの特性を利用し、従来になかった食品や食材としての利用可能性を有している。

[0069]

0-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	JPO-PAS i250
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1560-PCT

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0026
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
1-3-3	寄託の日付	2004年 08月 24日 (24.08.2004)
1-3-4	受託番号	NPMD FERM P-20185
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

- [請求項1] 豆乳を乳酸菌により発酵させてなる豆乳発酵物の製法であって、豆乳に対し中性プロテアーゼによる酵素処理を行い、上記乳酸菌として、曳糸性菌体外多糖を産生する乳酸菌を用いて発酵させることを特徴とする豆乳発酵物の製法。
- [請求項2] 上記乳酸菌として、曳糸性菌体外多糖産生能を有するラクトコッカス ラクティス サブスピーシーズ クレモリスもしくはストレプトコッカス サーモフィラスを用いる、請求項1記載の豆乳発酵物の製法。
- [請求項3] 上記乳酸菌とともに酢酸菌を加えて発酵させる、請求項1または2記載の豆乳発酵物の製法。
- [請求項4] 上記豆乳中に糖類を加えた後、上記乳酸菌により発酵させる、請求項1～3のいずれか一項に記載の豆乳発酵物の製法。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項に記載の豆乳発酵物の製法により得られる豆乳発酵物であって、その10℃における粘度が4000～12000mPa・sであり、Zahn Cup使用における液切れ時間が10秒以上であることを特徴とする豆乳発酵物。
- [請求項6] 保存中の離水率が3%（総重量比）以下である、請求項5記載の豆乳発酵物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23C11/10(2006.01)i, A23L11/20(2016.01)i

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)

A23C11/10, A23L11/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPIDS/WPIX/FROSTI/FSTA(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	CN 101283772 B (Tianjin University of Science & Technology), 11 April 2012 (11.04.2012), claims 1 to 4; paragraphs [0009] to [0018] (Family: none)	1, 2, 5, 6/1-6
Y	JP 2004-261174 A (Fujicco Co., Ltd.), 24 September 2004 (24.09.2004), claims 1 to 7; paragraphs [0018] to [0023]; tables 1 to 2 (Family: none)	1-6
Y	JP 7-147898 A (Ogawa & Co., Ltd.), 13 June 1995 (13.06.1995), claims 1 to 4; paragraphs [0005] to [0012]; tables 1 to 2 (Family: none)	1-6

☒ 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
25 May 2016 (25.05.16)

Date of mailing of the international search report
07 June 2016 (07.06.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057848

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/150887 A1 (Sapporo Holdings Ltd.), 10 October 2013 (10.10.2013), paragraphs [0012], [0040] to [0050] & JP 2013-215107 A & US 2015/0164098 A paragraphs [0014], [0044] to [0054]	1-6
Y	JP 50-035364 A (Kikkoman Shoyu Kabushiki Kaisha), 04 April 1975 (04.04.1975), pages 1 to 2 (Family: none)	1-6
A	KANEKO Daisuke, et al., "Reduction of the Off- Flavor Volatile Generated by the Yogurt Starter Culture Including Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in Soymilk", J. Agric. Food Chem., 2014, Vol.62, pp.1628-1663	1-6
A	CHIEN Hsiang-Lin, et al., "Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria", Food Microbiology, 2006, Vol.23, pp.772-778	1-6
A	WAGAR, L.E., et al., "Immunomodulatory Properties of Fermented Soy and Dairy Milks Prepared with Lactic Acid Bacteria", Journal of Food Science, 2009, Vol.74, No.8, pp.M423-M430	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A23C11/10(2006.01)i, A23L11/20(2016.01)i

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))

Int.Cl. A23C11/10, A23L11/20

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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), WPIDS/WPIX/FROSTI/FSTA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	CN 101283772 B (天津科技大学) 2012.04.11, 請求項1~4、[0009]~ [0018] (ファミリーなし)	1, 2, 5, 6/1-6
Y	JP 2004-261174 A (フジッコ株式会社) 2004.09.24, 請求項1~7、[0018]~ [0023]、表1~2 (ファミリーなし)	1-6

☒ 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矛盾するものではなく、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

25.05.2016

国際調査報告の発送日

07.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鳥居 敬司

4 B

4045

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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 7-147898 A (小川香料株式会社) 1995. 06. 13, 請求項 1～4、[0005]～[0012]、表 1～2 (ファミリーなし)	1-6
Y	WO 2013/150887 A1 (サッポロホールディングス株式会社) 2013. 10. 10, [0012]、[0040]～[0050] & JP 2013-215107 A & US 2015/0164098 A1, [0014], [0044]-[0054]	1-6
Y	JP 50-035364 A (キッコーマン醤油株式会社) 1975. 04. 04, 第 1～2 頁 (ファミリーなし)	1-6
A	KANEKO Daisuke, et al., "Reduction of the Off-Flavor Volatile Generated by the Yogurt Starter Culture Including Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in Soymilk", J. Agric. Food Chem., 2014, Vol.62, pp.1628-1663	1-6
A	CHIEN Hsiang-Lin, et al., "Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria", Food Microbiology, 2006, Vol.23, pp.772-778	1-6
A	WAGAR, L.E., et al., "Immunomodulatory Properties of Fermented Soy and Dairy Milks Prepared with Lactic Acid Bacteria", Journal of Food Science, 2009, Vol.74, No.8, pp.M423-M430	1-6