



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월13일
 (11) 등록번호 10-1917788
 (24) 등록일자 2018년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23C 11/10 (2006.01) *A23C 19/032* (2017.01)
A23C 9/12 (2017.01) *A23C 9/127* (2017.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7016433
 (22) 출원일자(국제) 2011년11월23일
 심사청구일자 2016년11월22일
 (85) 번역문제출일자 2013년06월24일
 (65) 공개번호 10-2013-0121889
 (43) 공개일자 2013년11월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/070835
 (87) 국제공개번호 WO 2012/069546
 국제공개일자 2012년05월31일
 (30) 우선권주장
 10192207.8 2010년11월23일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2004113431 A1
 US20040146603 A1
 EP01489135 A1
 E.Cases 외 2명, 'Effect of κ -Casein
 Deglycosylation on the acid coagulability of
 Milk', Journal of food science, vol.68,
 2406-2410, 2003년.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 시에이치알. 한센 에이/에스
 덴마크 디케이-2970 호르솔름 보게 알레 10-12
 (72) 발명자
 야콥센 요나스
 덴마크 디케이-2100 코펜하겐 외 에이치.피. 외롭
 스 가데 36 스트라제
 윈드 산드라 리케
 덴마크 디케이-2400 코펜하겐 엔브이 레즐. 1 6.
 살 그라스푸르베베즈 25
 크비스트 카르스텐 브룬
 덴마크 디케이-1814 프레데릭스베르그 씨 1. 티브
 이 카리트 예틀라르스 베즈 22
 (74) 대리인
 박장원

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **유제품 제조시 글리코시다제의 용도**

(57) 요약

우유에 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제의 유효량을 첨가하는 것을 포함하는 유제품(예컨대, 요거트)의 제조 방법.

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 우유 기질을 제공하는 단계;
 b) 상기 우유 기질을 N-결합 글리코시다제 활성을 갖는 효소로 처리하는 단계; 및
 c) 상기 우유 기질을 젖산 박테리아를 포함하는 미생물로 발효시키는 단계를 포함하고,

상기 N-결합 글리코시다제는 펩타이드-N(4)-(N-아세틸-베타-글루코사미닐)아스파라긴 아미다제(EC 번호: 3.5.1.52; 다른 이름: N-글리코시다제-F 또는 PNGase-F) 및 엔도-β-N-아세틸글루코사미니다제 H(EC 번호: 3.2.1.96; 다른 이름 ENDO-H)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 글리코시다제인 것인 유제품의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 b)는 단계 c) 이전 또는 단계 c) 도중에 수행되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미생물은 스트렙토코쿠스 써모필러스, 락토바실러스 델브루에키이 아종 불가리쿠스, 락토코쿠스 락티스, 락토코쿠스 락티스 아종 크레모리스, 류코노스톡 메센테로이즈 아종 크레모리스, 수도류코노스톡 메센테로이즈 아종 크레모리스, 페디오코쿠스 펜토사케우스, 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 생태형 디아세틸락티스, 락토바실러스 카세이 아종 카세이, 락토바실러스 파라카세이 아종 파라카세이, 비피도박테리움 비피둠, 및 비피도박테리움 롱검으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 중에 속하는 것인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 우유 기질은 동물유 및 식물 유래 식물유로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 동물유는 소, 양, 암양, 염소, 버팔로 또는 낙타로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 식물 유래 식물유는 두유, 오크 밀크, 라이스 밀크 또는 아몬드 밀크인 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 유제품은 발효유 제품인 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 발효유 제품은 요거트, 대체 배양 요거트, 케피어, 쿠미스 및 퀴크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 제품인 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항, 제5항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 방법에 의하여 얻을 수 있는 유제품.

청구항 11

(i) 동물유 기질에 유효량의 0-결합 글리코시다제를 첨가하는 단계; 및

(ii) 적절한 단계를 수행하여 낙농 동물유 제품을 얻는 단계로, 상기 적절한 단계는 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 증가시키는 조건에서 수행되는 것인 단계를 포함하는 낙농 동물유 제품의 제조 방법으로서,

상기 0-결합 글리코시다제는 α -N-아세틸-갈락토사미니다제(EC 번호: 3.2.1.49; 다른 이름: GalNAC); 및 α -갈락토시다제(EC 번호: 3.2.1.22))로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 글리코시다제이고,

상기 유제품은 요거트인 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제11항에 기재된 방법에 의하여 얻을 수 있는 유제품.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 우유에 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제의 유효량을 첨가하는 것을 포함하는 유제품(예컨대, 요거트)의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 예컨대, 발효유 제품(예컨대, 요거트)과 같은 유제품은 이 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0003] 이 기술 분야에 알려진 바와 같이 - 점도 및 겔 견고성(gel firmness) 등의 성질은 관련된 유제품에서 매우 중요한 성질이다.

[0004] 일반적으로 말하면 - 동일한 우유 조성물을 이용하여 점도 및/또는 겔 견고성을 더 높게 만들 수 있다면, 우유(또는 기타의 것) 고형분을 덜 사용하여 동일한 점도/겔 견고성을 달성하게 되므로 원료를 절약하게 된다(또는 수율을 더 높게 된다).

- [0005] 예컨대, 저지방 요거트와 같은 저지방 발효유 제품에 있어서, 최적의 양호한 제품의 텍스처를 얻는 것은 어려울 수 있다 - 보다 정확히는 이러한 저지방 제품에서 충분히 고점도의 텍스처를 얻는 것이 문제일 수 있다.
- [0006] 단백질의 첨가, 통상적으로는 무지방 분유 또는 유청계 단백질의 첨가가 저지방 요거트의 텍스처를 향상시키는 표준 방법일 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 비용이 들고, 저지방/저칼로리 제품의 컨셉에 온전히 부합하지 않는데, 첨가되는 단백질 역시 에너지 총량에 기여하기 때문이다.
- [0007] 텍스처의 개선과 관련하여 - US2005/0095316A1의 단락[0005]는 소위 텍스처화제(증점제, 겔화제), 예컨대 전분, 펙틴 또는 젤라틴을 첨가하는 것을 개시하고 있다. 그러나, 알려진 대로 - 예컨대, 요거트 제품에 추가로 펙틴 또는 젤라틴을 포함시키는 것은 바람직하지 않을 수 있다.
- [0008] 지난 수년간, 세포의 폴리설페라이드(EPS)에 기초한 소위 텍스처화 배양체는 이러한 저지방 유제품의 점도를 눈에 띄게 향상시켜 왔다 - 예컨대, WO2007/095958A1(Chr. Hansen A/S)은 스트렙토코쿠스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) 균주가 발효유 제품에 원하는 "점착성(ropy)" 또는 점성의 텍스처를 부여할 수 있는 EPS를 합성한다고 개시하고 있다.
- [0009] 따라서, 예컨대, 저지방 요거트에 대한 이러한 작금의 텍스처 점도 문제가, 예컨대 이들 EPS 생성 배양체를 이용함으로써 훌륭히 해결되었다고 혹자는 말할 수도 있다.
- [0010] 그러나, 문헌[A.N. Hassan et al(J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003)]에 개시된 바와 같이, 비(非) EPS 생성 배양체에 비하여 EPS 생성 배양체를 사용하는 경우 소위 겔 견고성은 현저히 감소할 수 있다.
- [0011] 따라서 - 혹자는, 예컨대 저지방 요거트 제품에 대하여 종래의 점도 문제는 EPS 생성 배양체를 이용함으로써 기본적으로 해결되었음이 현재의 상황이라고 말할 수 있겠지만 - EPS 배양체의 사용은 겔 견고성 감소와 관련한 새로운 문제를 "발생"시켰을 수 있다.
- [0012] A.N. Hassan et al.의 문헌에서는 요약부에서 낮은 점탄성계수(viscoelastic moduli)를 언급하고 있는데 - 당업자에게 알려진 바와 같이, 이 점탄성계수 특성은 제품이 낮은 점탄성계수를 갖는다면 겔 견고성도 낮다는 점에서 겔 견고성과 관련이 있다. 상기 문헌의 도 1은 EPS 요거트의 전단응력이 훨씬 높다는 것을 보여주는데, 이것은 이 기술 분야의 숙련자에게는 직접적으로 점도가 높다는 것으로 해석된다.
- [0013] 전술한 바와 같이 - 일반적으로, 예컨대 발효유 제품(예컨대, 요거트)과 같은 유제품에 있어서 - 소위 겔 견고성은 매우 유의미한 특성이다.
- [0014] 예컨대, 낮은 겔 견고성은 유제품에 원치않는 구강감을 줄 수 있다. 또한, 예컨대 요거트의 겔 견고성이 낮다면, 물고 예컨대, 숟가락이나 그릇에서 매우 쉽게 흐르는 것처럼 보일 것이다. 또한, 예컨대 요거트의 겔 견고성이 낮다면 유청 분리로 인하여 쉽게 이수(하기 참조)될 수도 있다.
- [0015] 이 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 우유 응고 효소, 예컨대 단백질분해효소 키모신(달리는, 레닌이라고 불림)은 치즈를 만드는 데 사용되고, 키모신은 응고 및 커드(curd) 형성을 일으킨다. 잘 알려진 바와 같이, 치즈 제조는 모든 단계가 우유 응고 효소의 첨가의 결과인 3 단계, 또는 과정을 포함한다: 1) 덩어리(또는 소프트 겔)의 형성, 고형화, 또는 이 덩어리를 단단하게 하는 것, 및 궁극적으로는 유청의 방출, 후자의 공정은 이수라고도 불린다. 명백히 - 예컨대, 요거트의 제조시 대개는 이러한 이수 효과를 얻는 것, 즉 우유를 고형 커드와 액상 유청으로 분리하는 것에 일반적으로 관심이 없다. 따라서, 예컨대 요거트를 제조하고자 할 때, 키모신과 같은 우유 응고 효소의 사용은 일반적으로 선호되지 않는다.
- [0016] 요거트와 같은 발효유 제품 제조에 있어서 US2005/0095317A1(Danone)은 카파-카세인분해 활성을 갖는 단백질분해효소의 사용을 개시하고 있다. 이 단백질분해효소는, 예컨대 키모신일 수 있다 - 예컨대, 상기 미국 특허출원의 단락[0028] 참조. 상기 단백질분해효소(예컨대, 키모신)는 우유의 카세인을 가수분해한다 - 따라서, 혹자는 일용 상기 단백질분해효소(예컨대, 키모신)가 요거트 제조에 원치않는 이수 효과를 일으킬 수 있다고 믿어왔다. 그러나, 섹션[0008]은, 놀랍고도 예기치 않게도, 예컨대 키모신과 같은 단백질분해효소를 사용하자 "그 결과로서 이러한 발효 낙농 제품에 용인되지 않는 이수를 유발하지 않고도 텍스처가 개선되어, 특히 요거트 및 발효유의 점도가 증가한다"는 것을 보여주었다고 설명하고 있다.
- [0017] US2005/0095316A1(Danone)은 근본적으로 전술한 US2005/0095317A1(Danone)과 동일한 기술적 교시에 관한 것이지만 - 이 미국 출원에서는 관련 단백질분해효소가 박테리아의 단백질분해효소인 것으로 기재되고 있다(키모신은 소로부터 유래한다 - 즉, 이것은 박테리아의 단백질분해효소가 아니다).

- [0018] US7560127B2(DSM)는 치즈 제조에 특별한 탈당화 효소를 사용하는 것을 개시하고 있다. 탈당화 효소는 우유에 존재하는 카파 카세인(κ -카세인)을 탈당화시킬 수 있는 효소로 정의된다. 하기 기술하는 바 - 카세인은 소위 0-결합 당화된 단백질이다. 따라서, 상기 미국 특허에서 언급된 탈당화 효소들은 카파-카세인과 같은 0-결합 당화된 단백질(카파-카세인은 소위 0-결합 당단백질이다)을 탈당화시킬 수 있는 효소들이다. 상기 미국 특허는 컬럼 1, 51~58열에서 "놀랍게도, 카세인 미셀을 안정화시키는 음전하를 지닌 것은 κ -카세인과 연결된 당이기 때문에 κ -카세인의 탈당화는 응집을 일으킴이 밝혀졌다. 이 방법에 의한 우유의 응고는 κ -카세인의 대부분이 치즈에 계속 유지되는 프로세스가 되어, 키모신의 단백질 분해 활성을 사용하는 것보다 높은 수율을 얻을 수 있다"고 기재하고 있다.
- [0019] 간단히, 혹자는 상기 US7560127B2가 기본적으로 우리가 치즈를 제조할 때 키모신 대신 상기 언급된 0-결합 관련 탈당화 효소를 사용하여 필요한 응고를 얻을 수 있다는 것을 설명하고 있다고 말할 수 있다. US7560127B2 특허는 치즈의 제조에 관한 것이고, 청구항 제1항에서 단백질분해효소(키모신 등)를 사용하지 않고 치즈를 얻을 수 있다고 말하고 있으므로, 당업자는 상기 0-결합 관련 탈당화 효소의 사용이 실질적인 양의 이수를 유발할 것이라고 암시적으로 이해할 것이다.
- [0020] 여기서, US7560127B2는 실질적인 양으로 이수를 필요로 하는 치즈의 제조에 관한 것이라는 것을 이해하는 것이 중요하다. 결과적으로, 당업자는 이를 요거트와 같은, 일반적으로 이수가 전혀 필요치 않은 발효유 제품에 적용하리라 기대하지 않을 것이다.
- [0021] 또한, US7560127B2는 본 명세서에서 유의미하게 다루는 겔 견고성 성질과 관련한 어떠한 것도 명시적으로 언급하지 않는다 - 즉, 그것은 명시적으로, 응고/이수 효과가 키모신 대신 상기 특허에서 설명하고 있는 0-결합 탈당화 효소를 사용한 것에서 기인한다는 사실에 관한 것일 뿐이다.
- [0022] 문헌[E. Cases et al(Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410)]은 0-결합 탈당화 효소(뉴라미니다제; EC 3.2.1.18)로 화학적 산성화율을 탈당화시키는 것을 개시하고 있다. 우유는 화학물질 GDL로 화학적 산성화된다(p. 2407, 섹션 "Acid milk coagulation" 참조) - 따라서, E. Cases et al. 문헌에는 미생물로 집중되는 "발효유" 제품(예컨대, 요거트)이 기재되어 있지 않다.
- [0023] E. Cases et al. 문헌은 0-결합 탈당화 효소 뉴라미니다제(EC 3.2.1.18)를 사용하는 것이 효소적으로 처리되고 화학적으로 산성화된 우유의 최종 겔 견고성을 높인다고 기술하고 있다.
- [0024] 여기서, E. Cases et al. 문헌은 0-결합 탈당화 효소 뉴라미니다제(EC 3.2.1.18)의 사용한 결과로 가능한 본 명세서에서 중요하게 다루는 이수 효과에 관하여 아무런 언급도 하고 있지 않음을 이해하는 것이 중요하다.
- [0025] E. Cases et al. 문헌에는 사용된 뉴라미니다제(EC 3.2.1.18) 0-결합 탈당화 효소 제제의 순도에 관한 의미있는 입증이 제공되지 않고 있다. 이런 관점에서 - 사용된 효소 제제가 일부 의미있는 단백질분해효소 활성을 가졌고, 이 단백질분해효소가 상기 설명된 겔 견고성 효과 - 전술한 바와 같이 US2005/0095317A1(Danone)는 단백질분해효소를 사용하면 겔 견고성을 향상시킬 수 있다고 설명한다 - 를 나타낼 수 있다고 의문을 제기할 수 있다. 이 의심이 유의미한 것은 E. Cases et al. 문헌의 뉴라미니다제가 유래한 클로스트리듐 페르프린젠스 (*Clostridium perfringens*) 미생물이 140종 이상의 단백질분해효소를 함유하는 것으로 알려진 사실에 의하여도 강조된다 - 예컨대, 권위있는 Merops 펩타이드분해효소 데이터베이스(<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000283; type=peptidase>) 참조.
- [0026] 효소 제제의 순도에 대한 어떠한 정보도 제공되지 않았으므로, 문헌 E. Cases et al.에서 설명하고 있는 겔 견고성에 영향을 미칠 수 있는 모든 유의미한 단백질분해효소가 제외될 정도로 정제되지 않는다고 보는 것이 타당한 것 같다.
- [0027] 이 기술 분야에 알려진 바와 같이 - 0-결합 탈당화 효소 뉴라미니다제(EC 3.2.1.18)는 일부 N-결합 글리코시다제 활성 역시 갖는다. 그러나, 전술한 문헌 E. Cases et al.은 그 문헌에서 본 명세서와 관련된 뉴라미니다제의 효소 활성을 언급할 때 오로지 뉴라미니다제(EC 3.2.1.18)의 0-결합 글리코시다제 활성만을 언급하고 있다.
- [0028] EP1489135A1는 산성화 유청 우유 및 요거트의 겔 견고성을 증가시키기 위하여 탈당화 올류로페인(올리브잎 추출물)을 사용하는 것에 관한 것이다. 이 문헌에서 베타-글리코시다제(베타-1,6-글루코시다제) 및 락타제는 "단순히" 올류로페인을 탈당화하기 위하여 사용된다 - 즉, 여기서 이들 효소는 우유/요거트의 겔 견고성을 증가시키기 위한 활성 성분이 아니다. 올류로페인은 효소 활성을 가지는 단백질/펩타이드가 아니다. 베타-글리코시다제는 N-결합 글리코시다제도 0-결합 글리코시다제도 아니다. 본 발명의 방법은 종기로는 동물유 기질에

EP1489135A1에 기재된 활성화된 올리브잎 추출물(또는 기타 추출물)을 첨가하는 것을 포함하지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0029]

발명의 요약

[0030]

본 발명에 의하여 해결하여야 할 과제는 유제품 - 예컨대, 요거트와 같은 발효유 제품 - 특히 저지방 요거트 등의 저지방 발효유 제품의 겔 견고성을 향상/증가시키는 신규한 방법을 제공하는 것에서 찾을 수 있다. 또한 - 상기 신규한 방법은 종기로는 제품의 점도에 부정적인 영향을 미쳐서는 아니된다.

[0031]

해법은 본 발명의 발명자들이 탈당화 효소(즉, 글리코시다제)를 사용함으로써 겔 견고성이 현저히 증가/향상된 유제품(예컨대, 요거트)를 얻을 수 있는 것을 확인한 것에 기초하고 있다. 또한, 본 발명의 발명자들은 본 발명에서 글리코시다제들이 어떠한 의미있는 이수 효과도 발생시키지 않는 방식으로 사용된다는 것을 밝혔다 - 전술한 대로, 유의미한 이수 효과가 없다는 것은, 예컨대 요거트와 같은 발효유 제품을 제조하는 것과 관련하여 크게 유리한 것이다. 특히, O-결합 글리코시다제의 사용과 관련하여, 상당한 이수 효과 없이 그 효소가 사용된다는 것은 본 발명의 발명자들에게는 놀라운 것이었다. 또한, 본 발명의 발명자들은 탈당화 효소의 사용이 제품의 점도에 부정적으로 영향을 미치지 않는다는 것 역시 밝혔다.

[0032]

본 명세서의 실시예 4에서는, 글리코시다제 PNGase-F의 사용이 저지방 요거트의 점도에 어떠한 부정적인 효과를 미치지 않고 겔 견고성을 현저히 증가/향상시킨다는 것을 보여준다.

[0033]

본 명세서 실시예 1에 기술된 대로 - 본 명세서의 실시예에서 사용된 글리코시다제 효소 제제는 분석되어 오염 물질을 포함하지 않는 것으로 밝혀졌다 - 즉, 이들은 단백질분해 활성의 효소 등의 오염 물질을 포함하지 않는다.

[0034]

여기서, PNGase-F는 "N-결합 글리칸"에 작용하는 글리코시다제 - 즉, N-결합 당단백질을 탈당시킨다 - 라는 것이 흥미로운 것이다.

[0035]

전술한 대로 - 카세인은 O-결합 글리칸이고, 따라서 PNGase-F는 이러한 카세인을 탈당화할 수 없으므로 - 그 결과, PNGase-F가 본 명세서에서 이렇게 겔 견고성에 대하여 양성의 결과를 나타내는 것은, 예컨대 US7560127B2 (상기 참조)에 설명된 카세인의 탈당화와 관련된 메커니즘에서 비롯되는 것일 수 없다.

[0036]

이론에 얽매일 것 없이 요약하면 - 본 발명의 발명자들이 PNGase-F와 같은 N-결합 글리코시다제가 본 발명에서 작용한다는 것(즉, 겔 견고성의 향상)을 입증했다는 사실은 본 발명의 겔 견고성 향상이라는 결과를 뒷받침하는 기본 메커니즘이 치즈 제조에 키모신의 대체로서 O-결합 글리코시다제를 사용한 것과 관련하여 US7560127B2에 제시된 "카세인의 탈당화"에 기초한 메커니즘과 완전히 다른 것임을 설명하여 준다(상기 참조).

[0037]

달리 말하면, PNGase-F와 같은 N-결합 글리코시다제가 본 발명에서 작용한다는 사실(즉, 겔 견고성의 향상)은, 예컨대 US7560127B2와 같은 선행 기술의 관점에서 당업자에게 매우 놀라운 것으로 보일 수 있다.

[0038]

이론에 얽매일 것 없이 - 이렇게 글리코시다제를 사용하는 것이 본 명세서에서 유의한 겔 견고성 향상을 가져온다는 것에 대한 가능한 설명은 상기 글리코시다제가 카세인 유청 단백질로부터 글리칸을 제거한다는 것이다.

[0039]

예컨대, PNGase-F와 같은 N-결합 글리코시다제는 N-당화되는 것으로 알려진 α -락트알부민 등의 일부 당단백질들로부터 N-글리칸을 제거할 수 있다. 또한, 유청 단백질은 얼마간 단백질-네트워크와 얽여져, 겔 견고성의 성질을 나타내는 것이다. 친수성 글리칸의 제거와 탈아민 반응에 의하여 생긴 전하의 변화는 더욱 단단한 단백질 네트워크의 형성을 돕고 그로 인하여 겔 견고성이 향상되는 것이다.

[0040]

이론에 얽매일 것 없이 - 일부 유청 당단백질들 역시 O-결합 글리칸을 포함하는 것으로 여겨진다.

[0041]

따라서, 본 발명의 발명자들은 O-결합 글리코시다제가 본 발명에서 유의한 겔 견고성의 향상을 나타낼 수 있는지 시험하였다. 본 명세서의 실시예 5에서, Ga1NAC과 같은 O-결합 글리코시다제의 사용 역시 본 발명에서 유의한 겔 견고성 향상의 결과를 일으킬 수 있음이 입증되었다.

- [0042] 이론적 관점에서 - 본 발명에서 PNGase-F와 같은 N-결합 글리코시다제를 사용하는 유의미한 이점은, 예컨대 요거트 제품 제조와 관련하여 원치않는 이수 효과의 제한(또는 제거)일 것이다. 이러한 이론적 관점의 한 가지 이유는 PNGase-F와 같은 N-결합 글리코시다제가 카세인에 작용하지 않고, 예컨대 US7560127B2에서 설명된 대로 치즈 제조시 키모신을 대신하여 상기 언급된 O-결합 관련 탈당화 효소(카세인을 탈당화하는)를 이용하여 원하는 응고(이수)를 얻을 수 있다는 것이다. 본 명세서의 실시예 4에는, 요거트 제조와 관련하여 N-결합 글리코시다제 PNGase-F가 본 발명에서 원치않는 이수 효과를 일으키지 않는다는 것이 입증되어 있다.
- [0043] 본 발명의 발명자들은, 예컨대 요거트 제조시 GalNAC과 같은 O-결합 글리코시다제의 원치 않은 이수 효과를 시험하였다. 본 명세서 실시예 6에서 보여지는 바와 같이 - O-결합 글리코시다제 GalNAC을 요거트 제조용으로 사용하였을 때 요거트 제조와 관련한 원치않는 이수 효과가 본 발명에서는 없었다는 것은 놀라운 것이다.
- [0044] 본 명세서 실시예 7에서는 - 젖산 박테리아(LAB) 산성화 우유 및 화학적 산성화 우유 양자 모두에서, 글리코시다제(여기서는 PNGase-F)의 사용이 겔 견고성을 향상시켰다는 것이 입증되었다. 이론에 얽매이지 않고, 이것은 겔 견고성에 대한 글리코시다제의 효과가 생물학적 효과(즉, 글리코시다제가 기본적으로 LAB의 기능과 관련한 어떤 것에만 영향을 미친다라는 효과)라기 보다는 물리적 효과(즉, 전술한 바와 같은 유청 단백질의 탈당화)라는 것을 시사한다.
- [0045] 전술한 실시예에서는 이미 열처리된 우유가 사용되었다 - 즉, 글리코시다제 효소는 열 처리후 우유에 첨가되었다. 이론에 얽매이지 않고 - 예컨대, PNGase-F와 같은 글리코시다제는 원유(즉, 열 처리되지 않은 우유)에 첨가되고 그 후 열 처리되는 경우에도 작용해야 한다(즉, 본 발명에 유의미한 겔 견고성 향상을 나타내야 한다).
- [0046] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 하기의 단계를 포함하는 유제품의 제조 방법에 관한 것이다:
- [0047] (i) 우유 기질에 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제를 첨가하는 단계; 및
- [0048] (ii) 필요에 따라 상기 우유 기질을 산성화(예컨대, 발효), 및/또는 필요에 따라 적절한 단계를 수행하여 유제품을 얻는 단계로, 상기 적절한 단계는 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 증가시키는 조건에서 수행되는 것인 단계.
- [0049] 상기 우유 기질은 동물유(예컨대, 소, 양, 암양, 염소, 버팔로 또는 낙타) 및 식물 유래 식물유(예컨대, 두유, 오크 밀크, 라이스 밀크, 아몬드 밀크)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0050] 제1 측면의 한 가지 실시 상태는 하기의 단계를 포함하는 낙농 동물유 제품의 제조 방법에 관한 것으로, 단, 상기 글리코시다제가 상기 우유에 존재하는 κ -카세인을 탈당화시킬 수 있는 O-결합 글리코시다제(예컨대, α -갈락토시다제, N-아세틸-갈락토사미니다제[GalNAC] 및 뉴라미니다제) 뿐이라면 상기 낙농 동물유 제품은 미생물로 접종된 발효유 제품(발효유 제품은 밀크 세럼을 크게 제거한 치즈 제품이 아니다)이다:
- [0051] (i) 동물유 기질에 유효량의 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제를 첨가하는 단계; 및
- [0052] (ii) 적절한 단계를 수행하여 낙농 동물유 제품을 얻는 단계로, 상기 적절한 단계는 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 증가시키는 조건에서 수행되는 것인 단계.
- [0053] 제1 측면 단계 (ii)의 "유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 증가시키는"이라는 용어는 다르게는 "유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 향상시키는"으로 표현될 수 있다.
- [0054] 단계 (ii)의 "적절한 단계를 수행하여 유제품을 얻는"이라는 용어는 목적 유제품(예컨대, 요거트)을 제조하기 위하여 적절한 단계로서 이해되어야 한다. 당업자라면 이러한 적절한 단계 - 예컨대, 적절한 젖산 박테리아(LAB) 배양체를 이용한 접종을 포함하는 요거트 제조와 같은 단계를 완전히 인식하고 있을 것이 명백하다.
- [0055] 목적하는 유제품(예컨대, 요거트)의 겔 견고성을 측정하는 것은 당업자에게는 일상적인 일이다. 본 명세서 실시예 2에는, 목적 유제품의 겔 견고성을 측정하는 적절한 표준 방법에 제공되어 있다 - 좋기로는 본 발명의 겔 견고성은 실시예 2의 이 방법에 따라 측정된다. 전술한 문헌[A.N. Hassan et al(J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003)] 역시 겔 견고성을 측정하는 적절한 표준 방법을 개시하고 있다. 상기 문헌의, 예컨대 재료 및 방법 섹션을 보면 탄성 계수 및 점탄성 계수를 측정하고 있는데 본 명세서 실시예 2에서 볼 수 있는 바와 같이 탄성 계수 및 점탄성 계수가 겔 견고성을 결정하는 데 사용되고 있고, 우리는 본 명세서 실시예 2에서와 같이 그로부터 필요에 따라 소위 복소 탄성 계수(complex modulus)를 얻을 수 있다.
- [0056] 당업자에게 목적 유제품의 겔 견고성 측정은 쉬운 것이기 때문에 - 제1 측면의 방법 중 단계 (ii)의 "유효량의

상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성이 증가"되는지에 관한 요건을 결정하는 것 역시 당업자에게는 물론 용이하다.

- [0057] 이 요건을 결정하기 위하여 - 당업자는 간단히 유효량의 글리코시다제가 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 " 유제품을 얻기 위한 적절한 단계"를 수행할 것이며, 그 후 첨가한 글리코시다제량의 효과로 겔 견고성을 측정할 것이다. 겔 견고성이 향상/증가된다면, 제1 측면 단계 (i)에 따라 우유 기질에 유효량의 글리코시다제를 첨가하고, 단계 (ii)의 적절한 단계 역시 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성이 증가하는 조건 하에서 수행된다.
- [0058] 당업자에게 잘 알려진 바 - 겔 견고성을 측정하는 방법이 상이하면 측정 결과의 절대값이 상이할 수 있다. 그러나, 본 발명에서 기술되는 바 겔 견고성 향상의 측정에 관하여 우리는 기본적으로 겔 견고성의 상대적 향상을 측정하는 것, 즉 유효량의 글리코시다제가 존재하거나 존재하지 않는 경우의 향상을 측정하는 것이다.
- [0059] 당업자라면 이해하겠지만 - 예컨대, 본 명세서 실시예 2 및 A.N. Hassan et al. 문헌에 기재된 것과 같은 겔 견고성 측정 방법은 동일한 상대적 결과를 나타낼 것이다(비교적 근소한 측정 오차 내로) - 즉, 사용된 구체적인 측정 방법과는 무관하게 겔 견고성의 상대적 향상에 관한 동일한 결과를 얻을 수 있다.
- [0060] 제1 측면의 방법에 관한 단서는 전술한 US7560127B2의 포기서(disclaimer)와 문헌[E. Cases et al(Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410)]로서 찾아볼 수 있다.
- [0061] 전술한 바 E. Cases et al. 문헌에는 미생물로 접종한 "발효유" 제품(예컨대, 요거트)에 관한 기재가 없다.
- [0062] 전술한 바 - US7560127B2는 본 발명에서 중요하게 다루는 겔 견고성 성질에 관하여 명시적으로 어떠한 언급도 하지 않고 있다 - 즉, 그것은 오로지 키모신 대신 O-결합 탈당화 효소를 사용한 결과 응고/이수 효과에 관한 것이라고 말할 수 있다. 그러나, US7560127B2에서 치즈 유제품 제조 공정 중 상기 O-결합 탈당화 효소를 우유 기질에 첨가함으로써 이론적으로, 내재적으로 유효량의 글리코시다제를 첨가한 것이고 본 발명과 관련된 겔 견고성을 부여했을 것이라고 혹자는 말할 수 있다.
- [0063] 단서는 상기 글리코시다제가 O-결합 글리코시다제 뿐이라는 상황에 있다 - US7560127B2는 본 발명에서 유의한 것인 N-결합 글리코시다제와 관련하여 어떠한 개시도 하지 않고, 따라서 제1 측면의 단계 (i)에 첨가되는 유효량의 글리코시다제(즉, 하나 이상의 글리코시다제를 포괄)가 예컨대 N-결합 글리코시다제 및 O-결합 글리코시다제라면, 글리코시다제가 O-결합 글리코시다제 뿐인 상황은 아닐 것이다.
- [0064] 본 발명의 문맥상 - 당업자는 유제품이 US7560127B2에 기재된 것과 같은 치즈 제품인지 아니면 다른 유제품, 예컨대 요거트와 같은 발효유 제품인지 손쉽게 분간할 수 있다.
- [0065] **정의**
- [0066] "글리칸"이라는 용어는 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 말한다. 글리칸은 모노사카라이드 잔기로 이루어지는 동중고분자 또는 이중고분자일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. 글리칸은 또한, 예컨대 당단백질, 당지질 또는 프로테오글리칸과 같은 글리코컨쥬게이트의 탄수화물 부분을 일컫는 데 사용될 수도 있다.
- [0067] "당단백질"이라는 용어는 폴리펩타이드 측쇄에 공유적으로 부착된 올리고사카라이드쇄(글리칸)을 함유하는 단백질이다. 탄수화물은 번역과 동시에 또는 번역 후 이루어지는 변형시에 단백질에 부착된다.
- [0068] "글리코시다제"(글리코시드 가수분해효소라고도 불림)라는 용어는 글리코시드 연결/결합의 가수분해를 촉매하는 효소를 말한다 - 글리코시드 결합은 탄수화물(당) 분자를 다른 기능기에 결합시키는 일종의 공유결합으로, 다른 기능기는 다른 탄수화물일 수 있고 아닐 수도 있다. N-결합 글리칸을 부분적으로 또는 완전히 탈당화시키는 글리코시다제를 본 명세서에서는 N-결합 글리코시다제라고 명명할 수 있다. 유사하게, O-결합 글리칸을 부분적으로 또는 완전히 탈당화시키는 글리코시다제를 본 명세서에서는 O-결합 글리코시다제라고 명명할 수 있다. N-결합 글리코시다제라는 용어는 이 기술 분야에서 잘 정의되어 있고 당업자라면 대상이 되는 구체적인 글리코시다제가 N-결합 글리코시다제인지 아닌지 알고 있다. 유사하게, O-결합 글리코시다제라는 용어는 이 기술 분야에서 잘 정의되어 있고 당업자라면 대상이 되는 구체적인 글리코시다제가 O-결합 글리코시다제인지 아닌지 알고 있다. 또한, 본 명세서에서 글리코시다제는 탈당화 효소라고도 칭해진다.
- [0069] "당화"라는 용어는 단백질, 지질 또는 기타 유기 분자에 글리칸을 붙이는 효소 공정이다.
- [0070] "N-결합 글리칸"이라는 용어는 보통 아스파라긴 또는 아르기닌 측쇄의 질소에 부착된 글리칸을 말한다.

- [0071] "0-결합 글리칸"이라는 용어는 보통 세린, 트레오닌, 티로신, 히드록시리신 또는 히드록시프롤린 측쇄의 히드록시 산소에 부착된 글리칸, 또는 세라마이드와 같은 지질의 산소에 부착된 글리칸을 말한다.
- [0072] "젖산 박테리아"이라는 용어는 그람-양성의, 미호기성 또는 혐기성 박테리아로서 우세하게 생성되는 산으로서 젖산과 아세트산 및 프로피온산을 포함하는 산을 생성하며 당을 발효시킨다. 공업적으로 가장 유용한 젖산 박테리아는 락토코쿠스 종(*Lactococcus* spp.), 스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus* spp.), 락토바실러스 종(*Lactobacillus* spp.), 류코노스톡 종(*Leuconostoc* spp.), 수도류코노스톡 종(*Pseudoleuconostoc* spp.), 페디오코쿠스 종(*Pediococcus* spp.), 브레비박테리움 종(*Brevibacterium* spp.), 엔테로코쿠스 종(*Enterococcus* spp.) 및 프로피오니박테리움 종(*Propionibacterium* spp.)을 포함하는 "락토바실라레스" 목에서 발견된다. 또한, 엄격한 혐기성 박테리아의 군에 속하는 젖산 생성 박테리아인 비피도 박테리아, 즉 비피도박테리움 종(*Bifidobacterium* spp.)은 일반적으로 젖산 박테리아의 군(群)에 포함된다. 이들은 단독으로 또는 다른 젖산 박테리아와 함께 조합하여 식품 배지로서 자주 사용된다.
- [0073] "우유 기질"이라는 용어는 본 발명의 방법에 따른 효소 처리(및 가능하기로는 발효)를 거칠 수 있는 임의의 원유 및/또는 가공유일 수 있다. 그러므로, 유용한 우유 기질로서는 단백질을 함유하는 임의의 우유 또는 유사 우유 제품의 용액/현탁액, 예컨대 전지 우유 또는 저지방 우유, 무지방 우유, 버터 우유, 재구성 분유, 연유, 분유, 유청, 유청 막투과액(whey permeate), 젖당, 젖당의 결정화 모액, 유청 단백질 농축액 또는 크림을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 명백히, 상기 우유 기질은 임의의 동물(포유 동물) 또는 비(非)동물원으로부터 유래한 것, 예컨대 실질적으로 순수한 우유 또는 재구성 분유일 수 있다. 좋기로는 상기 우유 기질 내 단백질의 적어도 일부는 우유에 천연적으로 존재하는 단백질, 예컨대 카세인 또는 유청 단백질이다. 그러나, 상기 단백질 중 일부는 우유에 천연적으로 존재하는 않는 단백질일 수 있다. 발효 전에, 상기 우유 기질은 이 기술 분야에 알려져 있는 방법에 따라 균질화 및 살균 처리될 수 있다.
- [0074] "우유"라는 용어는 소, 양, 암양, 염소, 버팔로 또는 낙타와 같은 임의의 포유류를 착유하여 얻어지는 젖 분비물로 이해되어야 한다. 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 우유는 소의 우유이다. 또한, 우유라는 용어는 비(非)동물 또는 식물 유래(예컨대, 야채 또는 곡식원 유래) "밀크", 예컨대 두유, 오크 밀크, 라이스 밀크, 아몬드 밀크 등을 포함한다. 다른 유래원은 면화, 밀, 맥아, 옥수수, 감자, 콩, 루핀 및 사탕수수이다. 필요에 따라, 상기 우유는, 예컨대 산(예컨대, 시트르산, 아세트산 또는 젖산)을 첨가함으로써 또는, 예컨대 물과 혼합하여 산을 첨가함으로써 산성화된다. 상기 우유는 원유 또는 가공유, 예컨대 여과, 살균, 멸균, 균질화 등으로 가공된 가공유이거나, 또는 재구성 분유일 수 있다. 본 발명에 따른 "소(bovine)의 우유" 중 중요한 예시는 멸균된 소의 우유이다. 우유는 박테리아로 접종되기 전, 접종 중 및/또는 접종 후에 산성화, 글리코시다제 처리, 혼합 또는 가공될 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0075] 본 발명의 맥락상, 낙농 제품이라는 용어는 우유 기질을 N 또는 0-결합 글리코시다제로 처리함으로써 제조되는 제품을 말하고, 필요에 따라 상기 제품은 발효되거나 산성화된다. 상기 용어는 발효유 제품(마시는 형, 스타드 형 또는 세트 형일 수 있다) 및 치즈를 포함한다.
- [0076] "균질화"라는 용어는 격렬하게 혼합하여 용해성 현탁액 또는 에멀전을 얻는 것을 의미한다. 발효 전에 균질화가 수행되는 경우, 우유 지방을 작은 크기로 분쇄함으로써 우유 지방이 더 이상 우유로부터 분리되지 않도록 상기 균질화를 수행할 수 있다. 이는 작은 오리피스를 통하여 우유에 고압의 힘을 가함으로써 달성될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 방법에 있어서 "발효"는 미생물의 작용을 통하여 탄수화물을 알코올 또는 산으로 전환시키는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 있어서 발효는 젖당의 젖산으로의 전환으로 이루어지는 것이 좋다.
- [0078] 젖산 박테리아, 예컨대 락토바실러스 종 및 스트렙토코쿠스 써모필러스는 보통 벌크 스타터(bulk starter) 증식을 위한 냉동 또는 동결 건조 배지로서, 또는 소위 "다이렉트 배트 세트(Direct Vat Set)"(DVS) 배지로서 유업계에 공급되고, 낙농 젖산 박테리아, 예컨대 발효유 제품 제조용의 발효관 또는 발효통으로 직접 접종된다. 이들 배지를 일반적으로 "스타터 배지" 또는 "스타터(starter)"라고 부른다.
- [0079] 필요에 따라, 발효되는 우유 기질은 미생물을 불활성화하기 위하여 열 처리될 수 있다.
- [0080] 발효유 제품의 제조에 이용되는 발효 공정은 잘 알려져 있고, 이 기술 분야의 숙련자라면 온도, 산소, 탄수화물의 첨가 및 미생물의 양과 특성 및 공정 시간 등의 적절한 공정 조건을 선택하는 방법을 알게 될 것이다. 명백히, 발효 조건은 본 발명의 목적, 즉 발효유 제품을 얻기 위한 목적을 뒷받침하기 위하여 선택된다.
- [0081] 본 발명의 맥락상, 요거트 스타터 배양체는 1종 이상의 락토바실러스 균주, 예컨대 락토바실러스 불가리쿠스 균

주와 1종 이상의 스트렙토코쿠스 써모필러스 균주를 포함하는 박테리아 배양체인 것이 좋다. 본 명세서에 따르면, 요거트는 우유를 락토바실러스 균주 및 스트렙토코쿠스 써모필러스 균주로 접종하고 발효시킴으로써 얻은 발효유 제품이다.

[0082] "스푼으로 뜰 수 있는(spoonable)"이라는 용어는 스푼으로 소비될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. "스푼으로 뜰 수 있는 유제품"이라는 용어는 스테드 제품을 포함한다. "스테드-타입 제품"이라는 용어는 특히 발효 후 기계적인 처리를 거친 결과, 발효 단계에서 형성된 응고물의 해체 및 액화가 이루어진 발효유 제품을 말한다. 기계적 처리는 통상적으로 겔을 휘젓기, 펄핑, 여과 또는 균질화하거나, 다른 성분들과 함께 혼합함으로써 얻어지지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0083] "세트-타입 제품"이라는 용어는, 예컨대 스타터 배지로 접종하고, 접종 단계 후 패키징한 다음, 그 패키지 내에서 발효시킨 우유에 기초한 제품을 포함한다.

[0084] "마실 수 있는 제품"이라는 용어는 "마시는 요거트" 및 유사한 것 등의 음료를 포함한다. "마시는 요거트"라는 용어는 통상적으로 락토바실러스 종 및 스트렙토코쿠스 써모필러스의 조합으로 발효 제조된 유제품을 포함한다. 마시는 요거트의 비지지방 유고형분 함량은 8% 또는 그 이상인 것이 통상적이다. 게다가, 마시는 요거트의 생 배양체 수는 통상적으로 ml당 10^6 세포 형성 단위(CFU) 이상이다.

[0085] **발명의 상세한 설명**

[0086] 낙농 동물유 제품

[0087] 일반적으로 말해 - 본 발명의 유제품, 예컨대 낙농 동물유 제품(즉, 동물유에 기초한 제품)의 양호한 pH는 pH 3 내지 pH 6.5의 pH이고 - 더욱 양호하기로는 pH 3.5 내지 5.75이다.

[0088] 당업자에게 알려진 바와 같이 - 예컨대, 적절한 젖산 박테리아 배양체로 발효시킴으로써 적절한 우유의 pH를 얻을 수 있다. 그러나, 당업자에게 알려진 바, 간단히 적절한 산(예컨대, 젖산)을 첨가하여 원하는 pH를 얻을 수도 있다. 혹은, 락톤(예컨대 GDL 락톤)을 첨가하여 원하는 pH를 얻거나 기타 적절한 공지의 방법(예컨대, 효소적 방법이나 이산화탄소를 이용한 압력 반응(pressureatiation)을 사용하여 원하는 pH를 얻을 수도 있다.

[0089] 전술한 바와 같이 - 겔 견고성을 향상시키기 위하여 본 명세서에서 설명하는 대로 글리코시다제를 사용하는 것은 특히 소위 저지방 유제품과 관련하여 유용할 수 있다.

[0090] 따라서, 한 가지 양호한 실시 상태에 있어서, 제1 측면의 방법 중 단계 (i)에서 사용되는 우유 기질은 저지방 성분의 우유 기질이다 - 즉 지방 성분이 3.5% 미만, 좋기로는 지방 성분이 1.5% 미만, 더욱 좋기로는 지방 성분이 0.75% 미만이다.

[0091] 전술한 대로 - 겔 견고성을 향상시키기 위하여 앞서 설명한 대로 글리코시다제를 사용하는 이점은, 예컨대 충분히 적당한 겔 견고성을 얻기 위하여 저지방 유제품에서 단백질 함량을 증가시킬 필요가 없으므로 최종 저지방 유제품(예컨대, 저지방 요거트)의 총칼로리량/총에너지량을 최소화할 수 있다는 것이다.

[0092] 따라서, 양호한 실시 상태에 있어서, 최종 유제품(예컨대, 요거트)의 최종 총칼로리량/총에너지량은 유제품 100 g당 150 킬로 칼로리 미만이고, 더 양호하게는 최종 유제품(예컨대, 요거트)의 최종 총칼로리량/총에너지량은 유제품 100 g당 100 킬로 칼로리 미만이다. 알려진 대로 - 대상으로 하는 유제품의 칼로리량을 측정하는 것은 당업자에게는 일상적인 일이다.

[0093] 유제품의 적절한 예는 발효유 제품 또는 치즈다. 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 유제품은 발효유 제품이다.

[0094] 양호한 실시 상태에 있어서 - 상기 발효유 제품은 요거트, 대체 배양 요거트(alternate culture yogurt), 버터 밀크, 유산균 우유, 케피어(kefir), 쿠미스(kumys) 및 퀴크(quark)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 발효유 제품이다. 가장 양호하기로는, 발효유 제품은 요거트이다.

[0095] 본 발명의 맥락에 있어서 - "요거트" 및 "발효유"라는 용어는 보통의 의미이다. US2005/0095316A1 및 US2005/0095317A1(모두 Danone)에서, 이들 용어는 프랑스의 관련 공식 법령/규칙에 따라 정의된다 - 하기에 이들 용어의 정의로 알려진 동일한 표준을 언급한다.

[0096] 당업자에게 알려진 바 - "요거트 또는 발효유"를 얻기 위하여, 특히 유청을 많이 제거하여서는 안되고 적어도 멸균과 균등한 열 처리가 있어야 함을 상기하여야 한다. 예컨대, 요거트와 같은 발효유 제품의 제조를 위한 적절한 열 처리는, 예컨대 15 초 내지 30 분간의 85°C 내지 98°C의 열처리이다. 적어도 표준 멸균과 균등한 열 처

리를 적용하기 때문에, 우유 기질의 유청 단백질들은 거의 변성된다(대략 25 내지 99%).

- [0097] 당업자에게 명백하게 - 요거트 또는 발효유 제품에 대하여는 "유청을 많이 제거하여서는 아니"되기 때문에, 요거트 또는 발효유 제품은 US7560127B2(상기 참조)에 기재된 것과 같은 치즈 제품이 아니다.
- [0098] "발효유"라는 용어는 무지방유 또는 비무지방유, 또는 무지방 또는 비무지방의 농축유 또는 분말화유, 우유 성분으로 강화되거나 강화되지 않은 우유로 제조한 낙농 제품을 말하고, 이것은 최소한 멸균과 균등한 열 처리를 받고 각 제품에 특징적인 종에 속하는 미생물로 접종된 것이다. 함유된 자유 젖산의 양은 종기로는 소비자에게 판매되는 때 100 그램당 0.6 그램 미만이어야 한다. 발효유는 종기로는 소비자에게 판매될 때까지 변패를 방지할 수 있는 온도에서 보관되어야 한다.
- [0099] "요거트"라는 용어는 시장 및 전통적인 관행에 따라, 종기로는 특정 고온성 젖산 박테리아만을 개입시켜, 예컨대 락토바실러스 델브루에키아 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) 및 스트렙토코쿠스 써모필러스 등을 개입시킴으로써 얻는 발효유로 정의되는데, 이들은 종기로는 동시에 접종되어야 하고 종기로는 완성된 제품에서, 종기로는 우유 함유분 그램당 천만 박테리아의 수로 살아있어야 한다.
- [0100] 발효유 제품은 일반적으로,
- [0101] (A) 10^5 내지 10^{13} cfu/ml(종기로는 10^6 to 10^{11} cfu/ml)의 젖산 박테리아(LAB) 배양체를 동물유 기질에 접종하는 단계; 및
- [0102] (B) 10°C 내지 55°C의 온도에서 2 내지 120 시간 상기 우유 기질을 발효시키는 단계에 의하여 얻어진다.
- [0103] 당업자에 알려진 바와 같이 - 적절한 젖산 박테리아 종으로는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 락토바실러스(예컨대, 락토바실러스 델브루에키아 아종 불가리쿠스, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)), 스트렙토코쿠스(예컨대, 스트렙토코쿠스 써모필러스), 락토코쿠스(예컨대, 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*)), 류코노스톡(예컨대, 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*), 류코노스톡 메센테로이즈(*Leuconostoc mesenteroides*))를 들 수 있다.
- [0104] 우유 기질이 락토바실러스 델브루에키아 아종 불가리쿠스 및 스트렙토코쿠스 써모필러스 균주로 이루어진 발효체로 접종되는 경우의 제품이 일반적으로 요거트로 이해된다.
- [0105] 이 기술 분야에 알려진 대로 - "대체 배양 요거트"라는 용어는 스트렙토코쿠스 써모필러스와 임의의 락토바실러스 종으로 이루어진 배양체를 이용하여 제조된 발효유 제품을 말한다.
- [0106] 이 기술 분야에 알려진 대로 - "유산균 우유"는 락토바실러스 아시도필러스로 이루어진 배양체를 이용하여 제조된 발효유 제품을 말한다.
- [0107] 이 기술 분야에 알려진 대로 - "케피어"라는 용어는 케피어 알갱이, 락토바실러스 케피리(*Lactobacillus kefir*), 강력한 특정 관계로 자라는 류코노스톡, 락토코쿠스 및 아세토박터속의 종으로부터 제조되는 스타터 배양체를 사용하여 제조되는 발효유를 말한다. 케피어 알갱이는 유당 발효 효모(클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 및 비(非)유당 발효 효모(새커로미세스 유니스포러스(*Saccharomyces unisporus*), 새커로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 새커로미세스 엑시구우스(*Saccharomyces exiguus*)) 양자 모두를 구성한다.
- [0108] 이 기술 분야에 알려진 대로 - "쿠미스"라는 용어는 락토바실러스 델브루에키아 아종 불가리쿠스 및 클루이베로미세스 마르시아누스로 이루어진 배양체를 이용하여 제조된 발효유 제품을 말한다.
- [0109] 양호한 실시 상태에 있어서 - 유제품은 요거트이고, 여기서 요거트는 세포외 폴리설타카라이드(EPS)를 합성할 수 있는 요거트 젖산 박테리아 배양체로 접종함으로써 제조된다 - 요거트가 저지방 요거트, 즉 제1 측면의 방법 중 단계 (i)에서 사용되는 우유 기질이 저지방 성분의 우유 기질, 즉, 지방 함량이 3.5% 미만, 더 좋기로는 지방 함량이 1.5% 미만이고 더욱 좋기로는 지방 함량이 0.75% 미만이라면 이 양호한 실시 상태는 특히 중요하다.
- [0110] 전술한 바와 같이 - 선행 기술은 EPS를 생성하는 이러한 스트렙토코쿠스 써모필러스 균주를 다수 개시하고 있다 - 예컨대, W02007/095958A1(Chr. Hansen A/S) 참조. 따라서, 당업자는 쉽게 이러한 EPS 생성 균주들을 다수 식별할 수 있고, 또한 대상의 특정 균주가 EPS를 합성할 수 있는 것인지 아닌지 역시 쉽게 식별할 수 있다.
- [0111] 본 발명에서 가능한 이론적 사업 시나리오의 한 예는 회사가 우유 농축물/분말을 본 발명에 설명되는 글리코시

다제를 이용하여 제조하여 이 우유 농축물/분말을, 예컨대 이를 요거트 제조에 사용하는 요거트 제조자에게 판매하여 겔 견고성이 향상/증가된 요거트를 얻는 것일 수 있다 - 즉, 그들은 이로써 요거트를 제조하는 동안 어떠한 글리코시다제도 추가로 첨가하지 않고 겔 견고성 향상을 이룰 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바 - 이러한 이론적 사업 시나리오는 본 명세서에서 논의되는 제1 측면의 방법의 범위 내인 방법의 한 예일 수 있다. 상기 우유 농축물/분말은 제1 측면의 방법 중의 낙농 동물유의 한 예로 보일 수 있다. 또한, 본 발명의 맥락상 당업자에 의하여 이해되는 바 - 우유에 이미 글리코시다제를 첨가하였기 때문에 최종 요거트의 겔 견고성은 향상/증가될 것이다 - 즉, 요거트 제조자는 본 발명에서 논의한 제1 측면의 방법의 범위 내에서 반응을 수행할 수 있을 것이다.

[0112] 글리코시다제

[0113] 전술한 바와 같이 - "글리코시다제"라는 용어는 글리코시드 연결/결합의 가수분해를 촉매하는 효소를 말한다 - 글리코시드 결합은 탄수화물(당) 분자를 다른 기능기에 결합시키는 일종의 공유결합으로, 다른 기능기는 다른 탄수화물일 수 있고 아닐 수도 있다. 전술한 바와 같이 - 본 명세서에서 글리코시다제는 탈당화 효소로 칭할 수도 있다.

[0114] 글리코시다제는 천연 글리코시다제이거나 천연 글리코시다제의 변종/변이체일 수 있다 - 당업자에게 알려진 것과 같이, 예컨대 효소의 핵심 효소 활성(여기서는 글리코시다제 활성)은 유지하면서 그 효소의 안정성을 향상시키기 위하여 목적 효소(여기서는 글리코시다제)의 돌연변이된 변종을 만들 수 있다.

[0115] 예컨대, 원치않는 이수를 최소화하기 위하여(특히, 유제품이 요거트와 같은 발효유 제품이라면) - 글리코시다제는 N-결합 글리코시다제인 것이 바람직할 수 있다.

[0116] 전술한 바와 같이, N-결합 글리코시다제라는 용어는 이 기술 분야에서 잘 정의된 용어이고 당업자라면 특정 글리코시다제가 N-결합 글리코시다제인지 아닌지 알고 있다. 또한, 선행 기술은 본 발명에 적합한 여러 가지 N-결합 글리코시다제를 기재하고 있다.

[0117] 본 발명에 적합한 N-결합 글리코시다제의 예시는 펩타이드-N(4)-(N-아세틸-베타-글루코사미닐)아스파라긴 아미다제(EC 번호: 3.5.1.52; 다른 이름: N-글리코시다제-F 또는 PNGase-F) 및 엔도-β-N-아세틸글루코사미니다제 H(EC 번호: 3.2.1.96; 다른 이름 ENDO-H).

[0118] 바로 위에 기재된 N-결합 글리코시다제는 본 발명에서 N-결합 글리코시다제 활성을 가지는 글리코시다제로서 개시된 것으로 어떠한 유의한 O-결합 글리코시다제 활성을 갖지 않는 것일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 N-결합 글리코시다제는 본 발명과 관련한 O-결합 글리코시다제 활성을 갖지 않는(예컨대, O-결합 글리코시다제 활성이 없는) N-결합 글리코시다제인 것이 양호하다.

[0119] 본 공정에서 사용되는, PNGase-F로도 알려진 N-글리코시다제-F는 플라보박테리움 메신고셉티쿰(*Flavobacterium mesingosepticum*)으로부터 유래할 수 있는 아스파라긴 아미다제(EC 3.5.1.52)이다. 이것은 당단백질의 N-결합 올리고사카라이드의 완전하고 온전한 분해를 촉매한다. 이것은 PNGase-F라는 시판명의 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있고 또는 본 명세서 실시예 1에 기재된 플라스미드와 방법을 사용하여 한 것처럼 대장균 등의 균주에서 재조합하여 제조될 수도 있다. ENDO-H로도 알려진 엔도-β-N-아세틸글루코사미니다제 H(EC 3.2.1.96)는 스트렙토미세스 플리카투스(*Streptomyces plicatus*)로부터 유래할 수 있다. ENDO-H는 N-결합 글리코실화물의 2 개의 N-아세틸글리코사민 사이의 글리코시드 결합의 가수분해를 촉매한다. 이것은 ENDO-H라는 시판명의 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있다.

[0120] 적절한 본 발명의 O-결합 글리코시다제의 예시는 α-N-아세틸-갈락토사미니다제(EC 번호: 3.2.1.49; 다른 이름: GalNAC); α-갈락토시다제(EC 번호: 3.2.1.22); 및 뉴라미니다제(EC 번호: 3.2.1.18)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 글리코시다제일 수 있다.

[0121] GalNAC은 α-결합 D-N-아세틸-갈라토사민 잔기의 가수분해를 촉매하는 고도로 특이적인 엑소글리코시다제이다. 이것은 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있다.

[0122] 전술한 바와 같이, O-결합 글리코시다제라는 용어는 이 기술 분야에 잘 정의되어 있고, 당업자라면 대상이 되는 특정 글리코시다제가 O-결합 글리코시다제인지 아닌지를 알고 있다. 또한 선행 기술은 본 발명에 적합한 여러 가지 O-결합 글리코시다제 다수를 개시하고 있다.

[0123] 본 발명에서 글리코시다제의 유효량/활성은 통상의 기술에 따라 결정된다.

- [0124] 이 기술 분야에서 - N-결합 글리코시다제(예컨대, PNGase-F 및 Endo-H 등)에 대하여, 1 활성 유닛은 총반응부피 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C를 기준으로 1 시간에 변성 RNase-B 10 μ g 중의 탄수화물을 >95% 제거하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다.
- [0125] GalNAC(0-결합 글리코시다제)에 대하여, 1 활성 유닛은 총반응부피 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C를 기준으로 1 시간에(GalNac α 1-3)(Fuc α -2)Gal α 1-4Glc-7-아미노-4-메틸-쿠마린(AMC) 1 nmol 중의 말단 α -D-N-아세틸-갈락토사민을 >95% 분해하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다.
- [0126] 본 발명과 관련된 다수의 글리코시다제 효소들은 New England Biolabs사로부터 구매 가능하다 - 본 발명과 관련된 글리코시다제 활성 유닛의 구체적인 표준 정의에 관한 상세는 New England Biolabs의 제품 카탈로그(예컨대, 온라인과 해당사의 웹페이지에서 이용 가능)를 참조할 수도 있다.
- [0127] 제1 측면 방법의 단계 (i)
- [0128] 본 발명에 기재된 제1 측면 방법의 단계 (i)은: "(i) 동물유 기질에 유효량의 N-결합 글리코시다제 및/또는 0-결합 글리코시다제를 첨가하는 단계"이다.
- [0129] 본 발명의 문맥상 당업자에게 이해되는 바와 같이 - N-결합 글리코시다제 및/또는 0-결합 글리코시다제는 실질적으로 순수한 글리코시다제 조성물로서 동물유 기질에 첨가되는 것이 일반적이다 - 예컨대, 이러한 글리코시다제 조성물의 총효소활성 중 5% 이상이 글리코시다제 활성인 것인 글리코시다제 조성물. 이것은 글리코시다제 조성물의 총효소활성 중 25% 이상이 글리코시다제 활성인 것인 글리코시다제 조성물이거나 글리코시다제 조성물의 총효소활성 중 50% 이상이 글리코시다제 활성인 것인 글리코시다제 조성물일 수 있다. 많은 경우, 이러한 실질적으로 순수한 글리코시다제 조성물은, 글리코시다제 조성물의 총효소활성 중 90% 이상이 글리코시다제 활성인 것인 글리코시다제 조성물인 것이 바람직하다.
- [0130] 유효량의 글리코시다제는 1종의 특정 타입 글리코시다제(예컨대, PNGase-F) 또는 본 명세서의 관련 글리코시다제 효소들의 혼합물(예컨대, 2종의 상이한 N-결합 글리코시다제, 또는 N-결합 글리코시다제 하나와 0-결합 글리코시다제 하나)일 수 있다.
- [0131] 본 명세서에서, 제1 측면 방법의 단계 (i)에서 첨가되는 글리코시다제는 N-결합 글리코시다제인 것이 양호할 수 있다고 하는 경우, 이것은 물론 단계 (i)에 유효량의 N-결합 글리코시다제를 첨가하여야 함을 의미하고, 이 N-결합 글리코시다제는 그 존재의 결과로 낙농 유제품의 겔 견고성을 향상시키는 것이다. 그러나, N-결합 글리코시다제가 양호하다고 말하는 경우가, 단계 (i)에 어떠한 0-결합 글리코시다제가 첨가되어서는 아니된다는 것을 의미하는 것은 물론 아니다. 본 발명에서 0-결합 글리코시다제가 양호하다고 말하는 경우에도 동일한 내용이 적용된다 - 즉, 이때 단계 (i)에 0-결합 글리코시다제가 첨가되어야 하지만 N-결합 글리코시다제 역시 첨가될 수 있는 것이다. 반대로, 당업자에게 자명하듯이 - 본 명세서에서 글리코시다제는 0-결합 글리코시다제 뿐이라고 하는 경우, 제1 측면의 단계 (i)에는 N-결합 글리코시다제가 첨가되어서는 아니된다. 본 명세서에서 글리코시다제가 N-결합 글리코시다제 뿐이라고 하는 경우에도 마찬가지로 제1 측면의 단계 (i)에 0-결합 글리코시다제가 첨가되어서는 아니된다.
- [0132] 이 기술 분야에 알려진 바와 같이 - 낙농 유제품은 일반적으로 열 처리를 받는다. 이 기술 분야에 알려진 대로 - 매우 높은 온도에서는 카세인 미셀이 비가역적으로 응집(또는 "분리(curdle)")하기 때문에 열 처리는 통상적으로 끓기 전 온도를 이용한다.
- [0133] 본 발명의 문맥상 - 멸균된 낙농 동물유 제품에 관하여 "멸균된"이라는 용어는 표준 멸균 단계(즉, 우유에 대한 적절한 열 처리를 포함)를 말한다. 본 발명의 문맥상 - 당업자라면 대상인 특정 유제품이 멸균된 낙농 동물유 제품인지 아닌지 알 것이 자명하다.
- [0134] 당업자에 의하여 이해되는 바 - 표준 멸균 단계는 약 15~20 초간 약 71~72 $^{\circ}$ C의 열 처리일 수 있다.
- [0135] 진술한 바 - "요거트 또는 발효유" 제품을 얻기 위하여 유청을 많이 제거하여서는 아니되고 적어도 멸균과 균등한 열 처리가 있어야 함을 특히 상기한다. 예컨대, 요거트 등의 발효유 제품을 제조하기 위한 적절한 열 처리는, 예컨대 15 초 내지 30 분간 85 내지 98 $^{\circ}$ C의 열 처리이다.
- [0136] 이용되는 열 처리의 종류에 따라 - 열 처리는, 분획당 1 초 내지 30 분간 65 내지 150 $^{\circ}$ C의 온도를 이용한 우유의 열 처리일 수 있다.
- [0137] 진술한 대로 - 유제품이, 예컨대 요거트와 같은 발효유 제품일 때, 적어도 멸균과 균등한 열 처리가 있어야 한

다. 단계 (i)에서 글리코시다제는 상기 열 처리 단계 전 또는 후에 첨가될 수 있다 - 즉, 상기 우유의 열 처리는 분획당 1 초 내지 30 분간 65 내지 150°C의 온도를 사용하여 이루어진다.

- [0138] 몇 가지 경우, 글리코시다제는 이미 열 처리된 우유에 첨가되는 것이 양호할 수 있다. 전술한 대로 - 유제품이 발효유 제품인 경우, 우유 기질은 젖산 박테리아(LAB) 배양체로 접종 및 발효된다.
- [0139] 유제품이 발효유 제품인 경우 - 글리코시다제는 젖산 박테리아(LAB) 배양체로 우유 기질을 접종하기 전, 접종과 함께 또는 접종 후에 첨가될 수 있다.
- [0140] 유제품에 관하여 일반적으로 - 글리코시다제는 우유 기질의 pH가 pH 6 아래로 되기 전에 첨가되는 것이 양호할 수 있다.
- [0141] 발효유 제품에 관하여 - 글리코시다제는 젖산 박테리아 발효 공정이 끝나기 전에 첨가되는 것이 바람직하다 - 즉, 종기로는 우유 기질의 pH가 pH 6 아래로 되기 전에 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0142] 우유 ml당 10 활성 유닛 내지 1000 활성 유닛의 글리코시다제를 첨가하면 본 발명의 유효량의 글리코시다제가 되기에 충분하다고 여겨진다 - 즉, 본 발명의 겔 견고성 향상을 얻기에 충분하다. 특정한 목적을 위해서라면 - 우유 ml당, 예컨대 20000 활성 유닛에 이르는 글리코시다제를 더 첨가할 수 있다. 전술한 바와 같이 - 본 발명에서 글리코시다제의 유효량/활성은 통상의 기술에 따라 결정된다.
- [0143] 제1 측면 방법의 단계 (ii)
- [0144] 본 발명에서 개시되는 제1 측면 방법의 단계 (ii)는: "(ii) 적절한 단계를 수행하여 낙농 동물유 제품을 얻는 단계로, 상기 적절한 단계는 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 상기 낙농 유제품의 겔 견고성을 향상시키는 조건에서 수행되는 것인 단계"이다.
- [0145] 전술한 바와 같이 - 적절한 단계를 수행하여 목적 낙농 동물유 제품을 얻는 것은 당업자에게 일상적인 일이다 - 예컨대, 유제품이 예컨대 요거트라면, 당업자는 물론 목적하는 요거트를 얻는 적절한 단계를 알고 있다. 유효량의 글리코시다제가 낙농 유제품의 겔 견고성을 향상시키는 조건에 관하여 - 이들 조건은 이러한 글리코시다제 효소가 충분한 기간 동안 활성인 조건일 것이라는 것이 명백하다.
- [0146] 본 명세서의 실시예에서 보여지는 바 - 본 발명의 발명자들은 다수의 여러가지 글리코시다제 효소들이 요거트와 같은 본 발명의 유제품 제조를 위한 통상적인 적절 조건(예컨대, 온도 pH 등)에서 적절한 활성을 갖는다는 것을 밝혔다.
- [0147] 간단히 그리고 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 - 본 발명의 양호한 글리코시다제 활성을 얻는 바람직한 조건은 사용되는 구체적인 글리코시다제 효소(예컨대, PNGase-F)와 제조되는 구체적인 유제품(예컨대, 요거트)에 달려있다.
- [0148] 본 발명의 맥락상 - 글리코시다제가 겔 견고성을 향상시키는 적절한 반응 조건의 예시는:
- [0149] - 10 내지 50°C의 온도(예컨대, 20 내지 40°C);
- [0150] - pH 3 내지 pH 9의 pH(예컨대, pH 4 내지 7.5, 3 내지 7 또는 3 내지 6.5);
- [0151] - 10 분 내지 120 시간의 시간(예컨대, 1 시간 내지 120 시간, 또는 0.5 시간 내지 5 시간)일 수 있다.
- [0152] 양호한 실시 상태에 있어서, 단계 (ii)의 글리코시다제의 존재는 낙농 유제품에 1.25 배의 겔 견고성 향상을 가져온다; 더 좋기로는 낙농 유제품에 1.50 배의 겔 견고성 향상을 가져오며 더욱 좋기로는 낙농 유제품에 1.7 배의 겔 견고성 향상을 가져온다.
- [0153] 전술한 바와 같이 - 본 발명의 발명자들은 글리코시다제의 사용이 최종 유제품의 점도에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 밝혔다.
- [0154] 따라서, 양호한 실시 상태에 있어서 - 단계 (ii)는 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 낙농 유제품의 점도에 어떠한 부정적인 영향도 미치지 않는 조건하에서 수행된다.
- [0155] 대상 유제품(예컨대, 요거트)의 점도를 측정하는 것은 당업자에게는 일상적인 것이다. 본 명세서의 실시예 2에, 대상 유제품의 점도를 측정하는 적절한 표준 방법에 제공되어 있다 - 좋기로는 본 발명에서 점도는 이 실시예 2의 방법에 따라 측정된다. 전술한 문헌[A.N. Hassan et al(J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003)] 역시 점도를 측정하는 적절한 표준 방법을 기재하고 있다. 예컨대, 전단 응력을 측정하는 재료 및 방법 섹션과 도 1을 참조

하면 - 본 명세서의 실시예 2에서 볼 수 있는 바와 같이 전단 응력 변수가 점도의 척도로 사용되었다.

- [0156] 당업자가 대상 유제품의 점도를 측정하는 것은 쉽기 때문에 - 당업자에게 "단계 (ii)가, 유효량의 상기 글리코시다제가 존재한 결과로 낙농 유제품의 점도에 어떠한 부정적인 영향도 미치지 않는 조건하에서 수행"되는지 아닌지, 제1 측면 방법의 단계 (ii)의 양호한 실시 상태를 결정하는 것 역시 물론 용이하다.
- [0157] 이 요건을 결정하기 위하여 - 당업자는 유효량의 글리코시다제가 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 간단히 "유제품을 얻기 위한 적절한 단계"를 수행할 것이고 - 그 후, 본 발명에서 글리코시다제 첨가량의 점도 효과를 측정할 것이다.
- [0158] 본 명세서의 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이 - 본 발명의 글리코시다제를 이용함으로써 실제로 향상된 점도를 얻을 수 있다.
- [0159] 따라서, 양호한 실시 상태에 있어서, 단계 (ii)의 글리코시다제의 존재는 낙농 유제품에 1.10 배 점도 증가를 가져오고; 더 좋기로는 낙농 유제품에 1.20 배의 점도 증가를 가져온다.
- [0160] 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 - 예컨대, 본 명세서의 실시예 2 및 문헌 A.N. Hassan et al.에 기재된 것과 같은 점도 측정 방법은 동일한 상대 결과를 가져올 것이다(비교적 적은 측정 오차 내로) - 즉, 사용되는 방법과는 무관하게 점도의 상대적 향상에 관한 동일한 결과를 얻을 수 있을 것이다.
- [0161] 전술한 바 대로 - 본 발명의 실시예에는 요거트를 제조함에 있어 N-결합 글리코시다제 및 O-결합 글리코시다제 양자 어떤 것도 원치않는 이수 효과를 가져오지 않는다는 것이 입증되어 있다.
- [0162] 따라서, 양호한 실시 상태에 있어서, 단계 (ii)는 유효량의 글리코시다제가 존재한 결과로 낙농 유제품에 이수 효과를 증가시키지 않는 조건하에서 수행된다. 이러한 이수 효과를 증가시키지 않는 것은 특히 낙농 유제품이, 예컨대 요거트와 같은 발효 유제품인 경우 유의미하다.
- [0163] 당업자가 대상 유제품(예컨대, 요거트)의 이수 효과를 측정하는 것은 일상적인 일이다. 본 명세서 실시예 3에, 대상 유제품의 이수를 측정하는 적절한 표준 방법이 제공되어 있다 - 좋기로는, 본 발명에서 이수는 이 실시예 3의 방법에 따라 측정된다. 기본적으로, 실시예 3의 이수 효과 측정 표준 방법은 대상 유제품의 적정 보관 및 대상 유제품 상부의 유효량의 측정에 기초한다.
- [0164] 당업자가 대상 유제품의 이수를 측정하는 것은 쉽기 때문에 - 당업자가 "단계 (ii)가, 유효량의 글리코시다제의 존재 결과로서 낙농 유제품에 어떠한 이수 증가 효과도 가져오지 않는 조건하에서 수행"되는지, 제1 측면 방법의 단계 (ii)의 양호한 실시 상태를 결정하는 것 역시 물론 용이하다. 이 요건을 결정하기 위하여 - 당업자는 유효량의 글리코시다제가 존재하거나 존재하지 않는 조건하에서 단계 (ii)의 "유제품을 얻기 위한 적절한 단계"를 간단히 수행할 것이고 - 그 후 본 발명에서의 글리코시다제의 첨가량에 따른 이수 효과를 결정할 것이다.
- [0165] 또한, 본 발명은 유제품 제조 방법에 관한 것이고, 상기 방법은:
- [0166] a) 우유 기질을 제공하는 단계;
- [0167] b) 상기 우유 기질을 N-결합 글리코시다제 활성을 갖는 효소로 처리하는 단계; 및
- [0168] c) 필요에 따라 상기 우유 기질을 미생물, 예컨대 젖산 박테리아로 발효시키는 단계를 포함한다. 흥미로운 실시 상태에 있어서, 단계 b)는 단계 c) 전 또는 단계 c) 도중에 수행된다.
- [0169] 전술한 바와 같이, 우유 기질은 임의의 동물 또는 비동물원으로부터 유래할 수 있다.
- [0170] 유제품은 실질적으로 증점제 및/또는 안정화제, 예컨대 펙틴, 젤라틴, 전분, 변형 전분, 카라기난, 알지네이트 및 구아 검 등을 첨가함이 없이, 또는 일절 첨가하지 않고 제조되는 것이 좋다.
- [0171] 흥미로운 실시 상태에 있어서, 상기 미생물은 젖산 박테리움 및/또는 폴리새커라이드, 예컨대 엑소폴리새커라이드(EPS)를 생성하는 미생물이다.
- [0172] 상기 미생물은 젖산 박테리움일 수 있고, 좋기로는 스트렙토코쿠스 써모필러스, 락토바실러스 델브루에키이 아종 불가리쿠스, 락토코쿠스 락티스, 락토코쿠스 락티스 아종 크레모리스(*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), 류코노스톡 메센테로이즈 아종 크레모리스(*Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*), 수도류코노스톡 메센테로이즈 아종 크레모리스(*Pseudoleuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*), 페디오코쿠스 펜토사케우스(*Pediococcus pentosaceus*), 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 생태형 디아세틸락티스(*Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*), 락토바실러스 카세이 아종 카세이(*Lactobacillus casei subsp.*

Casei), 락토바실러스 파라카세이 아종 파라카세이(*Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*), 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*), 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 종에 속하는 것이 좋다.

- [0173] 본 발명의 임의의 방법에 대한 흥미로운 실시예는:
- [0174] - 우유 기질이 산성화 이전에 멸균되고 효소 처리는 멸균 이전에 수행되는 것인 방법;
- [0175] - 우유 기질이 N-결합 글리코시다제 활성을 갖는 효소로 처리되기 전에 열 처리되는 것인 방법;
- [0176] - 유제품이 세트-타입 발효유 제품, 마시는 발효유 제품 및 스푼으로 뜰 수 있는 발효유 제품으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법;
- [0177] - 유제품이 8% 미만의 비지방 유고형분 함량을 갖는 것인 방법;
- [0178] - 유제품이 2% 미만의 지방 함량을 갖는 것인 방법;
- [0179] - 유제품이 0.5% 미만의 지방 함량을 갖는 것인 방법;
- [0180] - 유제품이 패키징되는 것인 방법(즉, 이 방법은 패키징을 포함한다) 및/또는
- [0181] - 글리코시다제는 α -N-아세틸-갈락토사미니다제(GalNAC); α -갈락토시다제; 및 뉴라미니다제; 펩타이드-N(4)-(N-아세틸-베타-글루코사미닐)아스파라긴 아마이드제; N-글리코시다제-F; PNGase-F; 엔도- β -N-아세틸글루코사미니다제 H; ENDO-H 및 EC 3.2.1.49, EC 3.2.1.18, EC 3.2.1.22, EC 3.5.1.52, 또는 EC 3.2.1.96로 분류되는 임의의 효소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 글리코시다제인 것인 방법이다.
- [0182] 본 발명의 맥락상, (적절한 양의) 제품을 적절한 패키지에 "패키징"한다는 용어는 제품을 분배 가능한 형태로 하여, 예컨대 한 사람 또는 1군의 사람들에 의하여 소비될 수 있도록 제품을 최종 패키징하는 것을 말한다. 그러므로, 적절한 패키지는 병, 컨테이너, 패키지 또는 그 유사한 것일 수 있고, 적절한 양은, 예컨대 10 ml 내지 5000 ml일 수 있지만 본 발명에서는 패키지량이 50 ml 내지 1000 ml인 것이 양호하다. 이러한 패키징된 제품은 본 발명의 일부이다.
- [0183] 또 다른 측면으로, 본 발명은 또한 본 발명의 방법으로 얻을 수 있는 유제품에 관한 것이다.
- [0184] 또 하나의 다른 측면으로, 본 발명은 우유 기질에 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제를 첨가하는 것을 포함하는 방법으로 얻을 수 있는 유제품에 관한 것이다. 원하는 겔 견고성을 부여하기 위하여 상기 글리코시다제는 "유효량"으로 첨가되어야 한다.
- [0185] 본 발명의 유제품은 글리코시다제로 처리되기 전 및/또는 처리 중 및/또는 처리 후에 젖산 박테리아로 접종되어 발효될 수 있다.
- [0186] 유제품은, 예컨대 10 ml 내지 5000 ml 부피 범위를 갖는 밀봉 컨테이너, 예컨대 25 ml 내지 1500 ml 부피의 컨테이너 또는 50 ml 내지 1000 ml 부피의 컨테이너에 패키징될 수 있다.
- [0187] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 유제품, 예컨대 발효유 제품(예컨대, 요거트) 또는 치즈(예컨대, 생치즈, 프로마쥬 프레, 퀴크 등)의 제조 방법에 있어 N-결합 글리코시다제의 용도에 관한 것이다.
- [0188] 또한, 본 발명은 유제품, 예컨대 발효유 제품(예컨대, 요거트) 또는 치즈(예컨대, 생치즈, 프로마쥬 프레, 퀴크 등)의 텍스처(예컨대, 겔 견고성 또는 강성)를 향상시키는 방법에 있어서 N-결합 글리코시다제의 용도에 관한 것이다.
- [0189] 본 발명의 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명은 유제품, 예컨대 요거트의 구강감을 향상시키기 위한 N-결합 글리코시다제 및/또는 O-결합 글리코시다제 활성을 갖는 효소의 용도에 관한 것이다.
- [0190] 상기 용도는 유제품이 폴리새커라이드, 예컨대 엑소폴리새커라이드(EPS)를 생성하는 젖산 박테리아를 사용하여 제조되는 것을 포함할 수 있다.
- [0191] 본 발명의 설명과 관련하여(특히 후술하는 청구 범위와 관련하여), "a"와 "an" 및 "the"와 이에 유사한 낱말의 사용은 본 발명에서 달리 표시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 양자 모두를 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. "포함하는(comprising)", "가지는(having)", "비롯한(including)" 및 "함유하는(containing)" 이라는 용어들은 달리 표시되지 않는 한, 개방형(open-ended) 용어(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 아니하는"을 의미)로 이해되어야 한다.

[0192] 본 발명에 있어서, 수치 범위에 관한 언급은 달리 명시하지 않는 한, 그 범위에 속하는 별도의 각 값을 개별적으로 나타내는 약기(略記) 방식으로서 사용하고자 하는 것일 뿐이며, 별도의 각 값은 이것이 마치 본 명세서에서 개별적으로 설명되어 있는 것처럼 본 명세서에 포함된다. 달리 명시하거나 문맥상 명백히 반대되는 경우가 아닌 한, 본 명세서에 설명된 방법들은 모두 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 발명에 제시된 임의의 실시예 및 모든 실시예, 또는 예를 들고자 한 용어(예컨대, "...과 같은")의 사용은, 단지 본 발명을 더 분명히 나타내기 위한 목적인 것이며, 달리 필요하지 않는 한 본 발명의 범위에 대한 한정을 가하지 않는다. 본 명세서 중의 어떠한 언어도, 어떤 청구되지 않은 사항을 본 발명의 실시예에 필수적인 것을 나타낸다고 해석되어서는 아니된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0193] **실시예 1: 글리코시다제**

[0194] 본 명세서에 기재된 방법에서 사용되는 글리코시다제의 예시는 아스파라긴 아미다제, 아세틸글루코사미니다제 또는 갈락토사미니다제이다. 이 공정에서 사용된 PNGase-F로도 알려진 N-글리코시다제-F는 플라보박테리움 메신 고셉티쿰으로부터 유래할 수 있는 아스파라긴 아미다제(EC 3.5.1.52)이다. 이것은 당단백질의 N-결합 올리고사커라이드의 완전하고 온전한 분해를 촉매한다. 이것은 PNGase-F라는 시판명의 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있고 또는 문헌[Loo et al(Protein Expression and Purification 24, 90-98, 2002)]에 기재된 플라스미드와 방법을 사용하여 한 것처럼 대장균 등의 균주에서 재조합하여 제조될 수도 있다. ENDO-H로도 알려진 엔도-β-N-아세틸글루코사미니다제 H(EC 3.2.1.96)는 스트렙토미세스 플리카투스(*Streptomyces plicatus*)로부터 유래할 수 있다. ENDO-H는 N-결합 글리코실화물의 2 개의 N-아세틸글리코사민 사이의 글리코시드 결합의 가수분해를 촉매한다. 이것은 ENDO-H라는 시판명의 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있다. α-N-아세틸-갈락토사미니다제(EC 3.2.1.49)는 트레오닌 또는 세린의 α-결합 D-N-아세틸-갈락토사민 잔기의 가수분해를 촉매하는 고도로 특이적인 엑소글리코시다제이다. 이것은 α-N-아세틸-갈락토사미니다제라는 시판명의 New England Biolabs Inc.의 시판 제품일 수 있다. 인하우스 제조 PNGase-F에 대하여는, 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 후 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB) 염색을 이용하여 높은 등급의(>95%)의 순도를 확인하였다. 순도를 추가로 확인하기 위하여, 모인 효소를 SDS-PAGE로 분리하고, 은을 이용하여 염색하였다. 그 후, 나타난 밴드를 질량분석하여 PNGase-F의 존재 및 PNGase-F 뿐임을 확인하였다.

[0195] 보바인-카파-카세인(Sigma-Aldrich)을 기질로 사용하여 단백질분해시험으로 인하우스 정제된 PNGase-F의 잠재적인 비특이적 단백질분해 활성을 평가하였다. 이 시험에서, 우리는 요거트 발효시 일어나는 천연의 pH 하강과 유사한 다양한 pH에서 단백질분해 활성을 시험하였다. 시스템을 하기 위하여, 우리는 본 발명의 공정에서보다 20 배 강한 농도의 효소를 이용하였고, 각 pH값에서 4 시간 동안 반응시켰다. 이 조건하에서, 우리는 어떠한 비특이적 단백질분해 활성의 증거를 발견하지 못하였다.

[0196] **결론:**

[0197] 전술한 결과에 기초하여 - 소위 인하우스 제조된 PNGase-F가 오염물질을 함유하지 않는다는 것이 명백해졌다. 전술한 시판 구입 가능한 기타 글리코시다제들 역시 공급사의 설명대로 오염물질을 함유하고 있지 않았다.

[0198] **실시예 2: 겔 견고성 및 점도 측정 방법**

[0199] 자동 시료 교환기(automatic sample changer)를 장착한 안톤 파르 레오미터(Anton Paar rheometer)(Physica DSR Rheometer + ASC)를 이용하여 겔 견고성을 측정하였다. 측정용 볼(bob)을 20 ml 시료를 담은 측정컵 내에 위치시켜 손으로 교반하고 13℃로 가열하였다. 볼을 시료 내로 위치시키고 대기 시간을 적용하였다. 그 후, 겔 견고성을 진동(osillation)으로 측정하였다. 이때 압력은 0.3%로 일정하게 유지하고 주파수를 0.5 Hz부터 30 Hz 까지 증가시켰다. 측정치로부터 탄성 계수(G')과 점도 계수(G'')를 계산할 수 있었고, 이들로부터 복소 탄성 계수(G*)를 얻었다:

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

[0200] .
 [0201] 그 후, 1 Hz에서 G*를 겔 견고성 척도로 사용하여 여러 시료를 비교하는 데 사용하였다.

[0202] 동일한 장치(Anton Paar rheometer)를 사용하여, 전단율을 0.2707 1/s에서 300 1/s까지 증가시키며 측정 포인트 매 10 초로 점도를 측정하였다(전단 응력). 그 후 전단율을 측정 포인트 매 10 초로 275 1/s에서 0.2707 1/s

로 감소시켰다. 그 후, 300 1/s의 전단 응력을 제품의 점도 척도로 사용하였다.

[0203] 결론:

[0204] 상기 겔 견고성 및 점도 측정 표준 방법에 기초하여, 본 명세서에 기재된 낙농 동물유 제품 제조 방법에 따라 글리코시다제를 첨가함으로써 대상 낙농 유제품에 겔 견고성 및/또는 점도의 향상이 있었는지를 결정하는 것은 당업자에게 일상적인 일이다.

[0205] 실시예 3: 이수 측정 방법

[0206] 본 발명에서는 이수량을 측정하기 위한 2 가지 상이한 방법이 사용되었다:

[0207] 방법 1: 50 ml의 요거트(실시예 4에서와 같이 제조)를 에펜도르프 튜브에 넣고 14 일간 차갑게 보관(5°C)한 후, 요거트 상층의 유청량을 자로 측정하였다(mm). 당업자에게 자명하듯 - 요거트 외 다른 유제품의 이수 효과 역시 대상 유제품을 저장하여 대상 유제품 상층의 유청량을 측정함으로써 측정할 수 있다.

[0208] 방법 2: 무지방유를 2% 무지방 분유(SMP)로 강화하여 밤새 냉장고에 두었다. 배치를 90°C에서 20 분간 열 처리 하였다. 75 ml 우유 용액을 0.02% YoFlex® 어드밴스 2.0 요거트 배양체(Chr. Hansen A/S(Denmark)로부터 얻을 수 있다) 및 효소(PNGase 또는 GalNAC 중 하나)와 함께 100 ml 부피 플라스크에 넣었다. 우유, 배양체 및 효소의 총중량이 기록되었다. 이 용액을 43°C로 가열하고 pH4.55로 발효시킨 후 플라스크를 7 일간 차갑게 보관하였다. 7 일 후, 요거트 상층의 유청을 따라 중량을 재었다. 이후 이수량은 백분율로 계산될 수 있다. 당업자에게 자명하듯 - 요거트 외 다른 유제품의 이수 효과 역시, 예컨대 대상 요거트 배양체가 아닌 다른 것으로 발효, 저장하고 대상 유제품 상층의 유청량을 측정함으로써 측정할 수 있다.

[0209] 결론:

[0210] 상기 이수 효과 측정 표준 방법에 기초하여, 본 명세서에 기재된 낙농 동물유 제품 제조 방법에 따라 글리코시다제를 첨가함으로써 대상 낙농 유제품에 현저한 이수 효과가 있었는지를 결정하는 것은 당업자에게 일상적인 일이다.

[0211] 실시예 4: 겔 견고성에 대한 PNGaseF의 효과(2 l 스케일)

[0212] 2 리터의 무지방유(0.1% 지방, Arla Express, Slagelse)를 1.6% 무지방 분유(SMP)로 강화하여 밤새 냉장고에 두었다. 이 용액을 90°C에서 20 분간 가열하고 43°C로 식혀 0.02% YoFlex® 어드밴스 2.0(Chr. Hansen A/S(Denmark)에서 얻음) 와 10 ml PNGase-F 또는 레퍼런스 시료인 pH 7.5의 50 mM NaCl를 함유하는 20 mM Na-인산 완충액 10 ml 둘 중 하나와 함께 접종하여 pH 4.55까지 발효시켰다. pH 4.5에 다다르면, 요거트를 교반하고 후처리 유닛(PTU)을 통과시키는데, 이것은 요거트의 배압이 2 바가 되도록 한다. 제5 일에 최종 제품을 레오미터 분석하였다.

[0213] 표 1

인하우스 PNGase-F의 존재 및 부재하에서 2 l 스케일의 저지방 요거트 제조 실험의 결과

	복소 계수 (Pa)	전단 응력 (300 1/s)	이수 (mm)
어드밴스 2.0	29.2 ± 0.86	63.7 ± 0.61	8
어드밴스 2.0 + PNGase-F (250 U/ml 우유)	51.0 ± 0.57	70.7 ± 0.2	4

[0215] N-결합 글리코시다제에 대하여, 1 활성 유닛은 총반응부피 10 µl, 37°C를 기준으로 1 시간에 변성 RNase-B 10 µg 중의 탄수화물을 >95% 제거하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다.

[0216] 표 1의 수치는 PNGase-F가 저지방 요거트의 겔 견고성을 증가시킴을 보여준다. 이 조건하에서 레퍼런스에 비하여 75% 증가한 것이다. PNGase-F 존재하에 얻은 점도는 레퍼런스 시료와 비슷하거나 약간 좋았다. 본 명세서에 나타내지 않았지만, PNGase-F 처리에 대한 겔 견고성 증가는 처리량에 의존적이었다. 실시예 3의 방법 1을 이용하여 이수 역시 평가되었으며 PNGase-F 처리에 반응하여 이수는 감소하였다.

[0217] 결론:

[0218] 상기 결과는 PNGase-F가 저지방 요거트의 겔 견고성을 증가시킨다는 것을 입증하였다. 이 실험의 조건하에서, 레퍼런스에 비하여 75% 증가한 것이다(즉, 1.75 배). 또한, PNGase-F 처리에 반응하여 이수가 감소한다는 것도 발견하였다. PNGase-F의 존재하에서 얻은 점도는 레퍼런스 시료와 비슷하게나 약간 좋았다.

[0219] 실시예 5: 저지방 요거트에서 다른 글리코시다제의 시험

[0220] 20 ml 레오미터 컵에서 요거트를 직접 제조하였다. 이로써 세트-타입 요거트를 얻었다. 무지방유(0.1% 지방, Arla Express, Slagelse)를 2% 무지방 분유(SMP)로 강화하고 밤새 냉장고에 두었다. 이 용액을 90°C에서 20 분간 가열하고, 43°C로 식혀 0.02% YoFlex® 어드밴스 2.0와 다른 디글리코시다제와 함께 접종하고 발효시켰다(표 1). 그 후, 시료를 냉장고에 넣고 실시예 2에 따라 제3 일에 레올로지를 측정하였다.

[0221] 표 2

시판으로 얻는 디글루코시다아제의 존재 및 부재시 20 ml 컵 실험실 스케일 저지방 요거트 제조 실험의 결과. 이 표에서 시험된 모든 효소는 New England Biolabs Inc.로부터 구득.

	농도 (U/ml 우유)	겔 견고성 (Pa)
어드밴스 2.0 + PNGase-F	250	608 ± 32.5
어드밴스 2.0 + Endo-H	250	564 ± -
어드밴스 2.0 + α-N-아세틸-갈락토사미니다아제	50	482 ± 19.8
어드밴스 2.0	0	391 ± 7.5

[0222]

[0223] N-글리코시다제 PNGase-F 및 Endo-H에 대한 1 유닛은 표 1에 정의되어 있다. α-N-아세틸-갈락토사미니다아제, O-글리코시다제에 대하여, 1 유닛은 총반응부피 10 μl, 37°C를 기준으로 1 시간에(GalNAc α1-3)(Fuc α-2)Gal α1-4Glc-7-아미노-4-메틸-쿠마린(AMC) 1 nmol 중의 말단 α-D-N-아세틸-갈락토사민을 >95% 분해하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다.

[0224] 시험된 모든 글리코시다제, N-글리코시다제 및 O-글리코시다제 GalNAc에 대하여, 겔 견고성이 현저히 증가됨이 밝혀졌다. 시험 농도에서 시판 구득된 PNGase-F가 저지방 요거트의 겔 견고성에 가장 강력한 효과를 미침이 밝혀졌다.

[0225] 결론:

[0226] 상기 결과는 시험된 모든 글리코시다제, N-글리코시다제 및 O-글리코시다제 GalNAc에 대하여, 겔 견고성의 현저한 향상을 밝힌 것을 입증하였다.

[0227] 실시예 6: O-결합 당화에 작용하는 글리코시다제를 사용한 이수 실험

[0228] US 7,560,127에, α-글리코시다제 GalNAc가 치즈 커드/응고 형성을 이끌어 낼 수 있음이 나타나 있다. 여기서는 저지방 요거트에서 GalNAc가 이수 형성에 어떤 효과를 나타내는지를 분석하였다. 실험은 실시예 3의 방법 2에 기재된 바와 같이 수행되었다. 100 ml 레오미터 컵에서 요거트를 직접 제조하였다. 이로써 세트-타입 요거트를 얻었다. 무지방유(0.1% 지방, Arla Express, Slagelse)를 2% 무지방 분유(SMP, Arla Express, Slagelse)로 강화하고 밤새 냉장고에 두었다. 이 용액을 90°C에서 20 분간 가열하고, 43°C로 식혀 0.02% YoFlex® 어드밴스

2.0와 100 U/ml 우유의 농도인 GalNAC와 함께 접종하였다. 효소가 없는 레퍼런스 시료에서는 21 일 후 유청의 백분율이 $0.3 \pm 0.04\%$ 인 반면, 효소 처리된 시료의 유청 분율은 $0.2 \pm 0.08\%$ 였다. 그러므로, 동일한 배양체로 발효된 레퍼런스 시료와 비교했을 때, 놀랍게도 GalNAC로의 처리는 이수를 증가시키지 않음이 밝혀졌다. US 7,560,127가 O-결합 글리칸을 제거하자 커드 형성 및 그로 인한 유청의 분리가 이루어짐을 보였기 때문에 이 결과는 예상치 못한 것이었다.

[0229] 결론:

[0230] 상기 결과는 시험된 O-결합 글리코시다제가 요거트 생성 중 이수를 증가시키지 않음을 입증하였다.

[0231] 실시예 7: LAB 및 화학적으로 산성화된 우유

[0232] 이 실시예에서 우리는 PNGase-F의 효과가 산성화 메커니즘에 의존적인지 여부에 대하여 접근하려고 하였다. 실험적으로 이것은 발효 요거트와 글루코- δ -락톤(GDL)로 화학적으로 산성화된 요거트에 대한 PNGase-F의 효과를 비교함으로써 설명되었다. 9.5% 건조 성분으로 이루어진 우유를 YoFlex® 어드밴스 2.0 또는 글루코- δ -락톤 둘 중 하나와 PNGase-F로 접종하고 표 3에 나타난 대로 43°C로 가열하여 pH 4.55까지 발효시켰다. 시료들을 5°C에서 3 일간 저장시킨 후, 교반기로 교반하여 레오미터 컵에 부어 실시예 2 및 3에 따라 레올로지를 측정하였다. 표 3에 제시된 결과는 PNGase-F 효과가 물리 현상으로 설명될 수 있음을 확인하여 주었다. 화학적으로 산성화된 요거트가 어드밴스 2.0 배양보다 훨씬 더 단단한 겔을 생성한다. 그러나, 두 가지 산성화 방법 모두에서, PNGase-F의 첨가가 겔 견고성을 향상시키는 것은 명백하다.

[0233] 표 3

산성화에 어드밴스 2.0 또는 GDL 중 어느 하나를 사용하여 PNGase-F의 존재하에 200 ml 실험실 스케일 저지방 요거트를 제조한 실험의 결과

	농도 (U/ml 우유)	겔 견고성 (Pa)
어드밴스 2.0 + PNGase-F	250	35.3 ± 7.8
어드밴스 2.0	0	24.7 ± 0.9
GDL + PNGase-F	250	148.0 ± 7.0
GDL	0	121.5 ± 6.4

[0234]

[0235] 결론:

[0236] 상기 결과는 두 가지 산성화 방법 모두에서, PNGase-F의 첨가가 겔 견고성을 향상시키는 것이 명백함을 입증하였다.

[0237] 본 발명을 수행하기 위하여 본 발명자들에게 알려진 베스트 모드를 포함한 본 발명의 양호한 실시 상태가 여기 개시된다. 전술한 설명을 읽으면 이 기술 분야의 당업자에게는 이러한 양호한 실시 상태들의 변형이 자명할 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 이러한 변형을 적절하게 채용할 것을 기대하며, 본 발명자들은 본 명세서에 구체적으로 개시된 것과 달리 본 발명이 실시될 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 시행법에 의하여 허용되는 바 본 명세서에 딸린 청구항에 기재된 대상의 모든 변형 및 균등물을 포함한다. 또한, 본 명세서에 달리 나타내거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 모든 가능한 그들의 변형 안에서 상기 기술된 요소들의 임의의 조합은 본 발명에 의하여 포괄된다.

[0238] 참조

[0239] 1. US2005/0095316A1(Danone)

- [0240] 2. US2005/0095317A1(Danone)
- [0241] 3. WO2007/095958A1(Chr. Hansen A/S)
- [0242] 4. A.N. Hassan et al(J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003)
- [0243] 5. US7560127B2(DSM)
- [0244] 6. E. Cases et al(Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410)
- [0245] 7. EP1489135A1

- [0246] 8. R. Scott,(1986), Cheesemaking process, second ed., Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- [0247] 9. G. Bylund,(1995), Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden
- [0248] 10. F. Kosikowski,(1982), Cheese and fermented milk foods, second ed., Kosikowski & Associates, New York
- [0249] 이 특허 문헌에 인용된 모든 참조는 그 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된다.