

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6527888号
(P6527888)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月17日(2019.5.17)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 P	19/08	(2006.01)	C 1 2 P	19/08	Z N A
C 0 8 B	37/02	(2006.01)	C 0 8 B	37/02	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
A 2 3 C	19/02	(2006.01)	A 2 3 C	19/02	

請求項の数 15 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2016-568108 (P2016-568108)	(73) 特許権者	516240477
(86) (22) 出願日	平成26年2月10日 (2014.2.10)		バイオーエ・エッレ・ジ・エッセ・エッレ
(65) 公表番号	特表2017-509353 (P2017-509353A)		・エッレ
(43) 公表日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		イタリア・アンコーナ・1-60035・
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/000360		イエジ・ヴィア・デッラ・バルケッタ・1
(87) 国際公開番号	W02015/117624	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成27年8月13日 (2015.8.13)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成29年2月2日 (2017.2.2)	(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
微生物の受託番号	NCIMB NCIMB 42196	(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
前置審査		(72) 発明者	ジュリア・チンティ
			イタリア・アンコーナ・60121・アン
			コーナ・ヴィーコロ・デル・トリブナリ・
			17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デキストランの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 培養培地を準備する工程；
- b) 前記培養培地に適切化された量の細菌株を植菌する工程；
- c) 所定の時間、所定の温度で発酵を行う工程；
- d) デキストランを沈殿させて生産物を前記培養培地から分離する工程；

を含む、デキストランの製造のための方法であって、

前記細菌株が受託番号NCIMB 42196由来のワイセラ・シバリアの菌株であること、前記培養培地が1%~2% w/vの割合の酵母エキス及び10%~15% w/vの割合のスクロースを含むこと、前記培養培地の初期pH値がpH 6~7に調整されること、並びに発酵が25 ~ 35で行われ

10

【請求項 2】

前記培養培地が80%~90%の割合(w/v)のスコッタブROSをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記スコッタブROSが0.10~0.15%のタンパク質、並びに0.9~1.2%の塩及び0.20~0.25%の有機酸、0.15~0.30%の脂肪、4.0~4.6%の残留ラクトースを含有する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記培養培地の初期pH値が、pH 6.5に調整される、請求項1~3のいずれか一項に記載

20

の方法。

【請求項 5】

培養時間が20時間～36時間の間である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

培養が50 rpmの攪拌下で行われる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

培養が30 で行われる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

デキストランの製造のための、受託番号NCIMB 42196による、ワイセラ・シバリアの菌株。

10

【請求項 9】

デキストランスクラーゼを製造するための方法であって、受託番号NCIMB 42196によるワイセラ・シバリアの菌株を、スクロースを含む培地中で培養する工程を含む、方法。

【請求項 10】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法に従って製造されるデキストラン含有組成物であって、前記組成物中のデキストランが $5 \cdot 10^6 \sim 4 \cdot 10^7$ Daの範囲の平均分子量を有し、前記組成物のタンパク質含有量が7%～11%の間である、組成物。

【請求項 11】

請求項 2～7 のいずれか一項に記載の方法により製造される、少なくとも8～10%のデキストランを含む、デキストランペースト。

20

【請求項 12】

低脂肪チーズの発酵プロセス中に、生乳に請求項 11 に記載のデキストランペーストを加えることにより製造される、低脂肪チーズ。

【請求項 13】

デキストランの製造のための、受託番号NCIMB 42196によるワイセラ・シバリアの菌株の使用。

【請求項 14】

生成されたデキストランを少なくとも8～10%含有するデキストランペーストを調製する工程をさらに含む、請求項 2～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

低脂肪チーズの発酵プロセス中に、生乳に調製したデキストランペーストを加えることにより低脂肪チーズを調製する工程をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、デキストランの製造のための方法に関し、特に、最適化されたデキストランの生合成方法に関する。

【背景技術】

【0002】

デキストランは、グルコース単位から形成される多糖であり、その糖鎖伸長はデキストランスクラーゼにより触媒される。デキストランは、 α -D-1,6-グルコース結合されたグルカンであり、可変側鎖がデキストランポリマーの主鎖単位に1-3結合している；この生成物は種々の分子量(1000 Da)を有するはずであり、これにより最終的な溶液の特徴が影響を受ける。天然デキストラン粉末の化学的及び物理的な特性は、それを生産する微生物株に応じて、及び/又は製造方法により変化する。デキストランの生合成は、多数の細菌、特に、ミュータンス菌(*Streptococcus mutans*)、ロイコノストック・メセンテロイデス亜種メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*)、及びロイコノストック・メセンテロイデス亜種デキストラニカム(*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*)において実証されてきた。ロイコノストック属は、スクロースの存在下でデキストランスクラーゼという酵素を生産し、培養培地中に分泌する。この酵素、デキスト

40

50

ランスクラーゼは、グリコシル残基のスクロースからデキストランポリマーへの転移を触媒し、フルクトースを遊離させて、デキストランをスクロース基質から合成する。デキストランスクラーゼの起源(すなわち、生産微生物)は、デキストラン分子の分岐点の頻度及び性質に影響を与える。

【0003】

デキストランは、易溶性、生体適合性、及び生分解性のポリマーである；市販の天然デキストラン粉末は、複数の分野に用途を有する。特に、生化学において、Sephadex型のゲルでの濾過クロマトグラフィ用の支持体として用いられる。デキストランは、化粧品産業において、及び医薬組成物中に用いることができる(例えばUS5902800を参照)。加えて、治療学の分野では、血漿の代替品として用いられる(Biochimie generale (General Biochemistry) - J. H. WEIL-Masson, 6th edition-1990-p. 171)。さらに、ロイコノストック・デキストラニカムの菌株により合成されるデキストランは、ヨーグルト、クリーム系デザート、乳を原料とする飲料、及びサラダドレッシング等の食品製品のテクスチャを調整するために、食品産業において用いられる。欧州特許出願公開第EP0363633号は、ロイコノストック・デキストラニカムの菌株による、及び特にロイコノストック・デキストラニカムNRRL-B-18242株によるデキストランの合成を実証している。加えて、前記特許出願公開は、この細菌により合成されるデキストランを含有する組成物、及びこの組成物の食品分野における使用を特に記述している。デキストランの食品適用は、真正の、おいしく自然な食品を用意することを求め、化学添加物を含む食品に背を向ける顧客のトレンドに従うものである。天然添加物は、発酵により得られるが、安全性、信頼性、及び持続可能性をもたらす自然の原料の選択肢を求める食品メーカーの要求に応える。また、デキストラン粉末は、最終製品の技術的性能を強化するので、製パンにおいてもテクスチャ調整剤として、主にグルテンフリーのサワー種に利用されるべきである。この提案時において、高分子量デキストラン($1 \sim 2 \cdot 10^6$ Da)は、欧州連合によりパン製品における食品成分として承認されている(Naessens M.ら、2005)。

【0004】

現在、高分子量デキストランの高収率を達成することができる細菌の探索は、ワイセラ・シバリア(*Weissella cibaria*)として知られる種に対して取り組まれている。W.シバリアは、グラム陽性の、ヘテロ発酵型細菌の種であり、ロイコノストック科(*Leuconostocaceae*)に属しているが、これは2002年に定義された(Bjoerkroth KJ, Schillinger U, Geisen R,ら、2002年1月)、「Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52 (Pt 1): 141-8)。W.シバリアは、米国食品医薬品局(FDA)によるGRAS(一般に安全と認められる(Generally Recognized As Safe))細菌であり、またその属は、欧州食品安全機関により提示される分類単位の一覧(EFSA、QPSリスト、安全性適格推定(Qualified Presumption of Safety))に含まれている。この菌株は、多数の産業上用途を有するので、非常に重要であるはずである。この種は、天然の物質から単離され、スクロースからのスライム形成の後に選抜された。また、スクロースからのデキストラン合成に関して過剰生産性(hyper-productive)であることも見出されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】US5902800

【特許文献2】欧州特許出願公開第EP0363633号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Biochimie generale (General Biochemistry) - J. H. WEIL-Masson, 6th edition-1990-p. 171

【非特許文献2】Naessens M.ら、2005

10

20

30

40

50

【非特許文献3】Bjoerkroth KJ, Schillinger U, Geisen R,ら、2002年1月、「Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (Pt 1): 141-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明につながる研究の第一の目的は、天然食品物質から微生物を単離し、デキストランを高収率で生産することができるこの細菌株を同定することであり、細菌株は特にワイセラ・シバリア種由来の菌株である。本発明の別の目的は、高分子量デキストラン粉末を高収率で製造することを可能にする、デキストランの製造のための個別の方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明の対象は、

- ・(性質及び濃度に関して)適切化された炭素源及び窒素源を特に選択し、(このプロセスのために微調整された後に)所定のpHを有する、適正な栄養バランスを含む最適化された合成培養培地を準備する工程；

- ・(手順を標準化するために対数増殖期に達した後に凍結乾燥された)細菌前培養の(培養齢及び量に関して)適切な植菌物(inoculum)サイズを用いて良好な増殖速度を保証する工程；

20

- ・所定の時間、(高温により細胞増殖が減少し、酵素の部分的な不安定性がもたらされるはずであるので)所定の至適温度で、培養を実行する工程；

- ・下流にある生産物の回収を最適化し、収率を最大に増加させながら、合成されたデキストランを培養培地から分離する工程を含む、デキストランの製造に適合した方法である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

上述した全ての工程は、受託番号NCIMB 42196(2013年11月)に由来する、細菌株ワイセラ・シバリアに最適化されている。この菌株は、非孢子形成性、非運動性、微好気性、ヘテロ発酵型、カタラーゼ陰性であり、L-アラビノースから酸を生成するが、ガラクトースからは生成しない。

30

【0010】

本発明の対象は、受託番号NCIMB 42196による、高分子量デキストランの製造のためのワイセラ・シバリアの菌株である。

【0011】

本発明の好ましい実施態様において、デキストラン生産のための最良の窒素源は、約1%~2% w/vの割合の酵母エキスである。炭素源は、主に10%~15% w/vの割合のスクロースである。

【0012】

40

また、本発明の別の実施態様において、培養培地は、強化されたスコッタブロス(scotta-broth)又はチーズ産業の類似の副産物を、約80%~約90%の割合で含む。スコッタブロスは、(リコッタチーズの製造プロセス後に残る)塩及び無機物より本質的に作られる、変動性の物質である。この天然食品物質の組成は、通常、製造工程及び原材料(牛乳)の特徴に応じて変化する。

【0013】

培養培地の初期pH値は、pH 6~7周辺に調整されるのが良く、好ましくはpH約6.5である。

【0014】

培養時間は、20~36時間の間に含まれ、好ましくは24時間である。培養は、約50 rpmの

50

軽い攪拌下で行われる。

【0015】

培養は、約28 ~ 32、好ましくは30で行われる。

【0016】

別の対象は、上述したワイセラ・シバリア株の細菌により生産されるデキストランスクラーゼである。前記デキストランスクラーゼのゲノム配列及びタンパク質配列は検出され一覧にされており、本願に添付される。

【0017】

本発明のさらなる対象は、上述した方法に従って得られる高分子量($5 \cdot 10^6 \sim 4 \cdot 10^7$ Daの間)デキストラン粉末である。このデキストラン粉末は、7%~11%の間、主に9%のタンパク質含有量を有し、本発明の方法に従って得られる、4.0~5.0 mPa・sの間(20 ~ 25の温度で)のデキストラン溶液の特徴的な粘度の値が含まれる。

10

【0018】

文献には、様々なプロセスのパラメーターにより影響を受ける微生物合成に起因するデキストラン生産の変動性の多数の例が示される。産業上利用できる可能性があるデキストラン生産微生物の単離及びデキストラン生産に影響を与える因子の至適な組み合わせの同定は、この研究の2つの主要な焦点に相当する。

【0019】

(必須の栄養要求及び適合された変量に関して)適切な培地組成及び(特定の乳酸菌株を用いた工業的スケールの製造に関して)最適化されたプロセスのパラメーターを用いて高収率をもたらすために、振盪フラスコ(500 ml)及びバッチ発酵(pH制御無し)での実験を行った。

20

【0020】

全ての実験について、発明者らの凍結乾燥された受託番号NCIMB 42196によるワイセラ・シバリアの菌株の植菌物($6 \cdot 10^7$ CFU/ml)を、MRS培地中、30での18~20時間の増殖後に用い(添加量: 1/200 w/v)、デキストランをエタノール中の沈殿により測定し、100で乾燥させた。

【実施例】

【0021】

実施例1. 窒素源及び濃度がデキストラン生産に与える効果

30

スクロース濃度(10% w/v)を一定に維持したが、目的は、デキストラン生産が窒素(及び他の塩)の利用可能度により影響を受けるかを検証するためであった。リン酸塩源及び窒素源並びに濃度が強化されたいくつかの培地、並びにこれらの種類の栄養素(又はこれらの組み合わせ)に関して乏しい他の培地を試験した後、発明者らは、デキストラン生産が窒素源によって目立って影響を受けたこと、及び酵母エキスが(試験したものの間では)最良の栄養源であったことを見出した。酵母エキスが酵母細胞(サッカロマイセス(Saccharomyces))の自己消化により得られること、並びにアミノ窒素及びビタミン、特に水溶性のB複合ビタミンの良好な供給源であることを考慮すると、これにより(他の試験した供給源に関わらず)非常に短時間での良好な細胞増殖が保証された。加えて、酵母エキスは、いくつかの他の塩と組み合わせると(さらなる実施例を参照)、細胞増殖を促進するための最良の栄養バランスを与えた。

40

【0022】

培地1a (ペプトン1% w/v、スクロース10% w/v)

培地1b (ペプトン2%、スクロース10%)

培地2a (酵母エキス 1%、スクロース10%)

培地2b (酵母エキス 1.5%、スクロース10%)

培地2c (酵母エキス 2%、スクロース10%)

培地3 (硝酸アンモニウム 1%、スクロース10%)

培地4 (硫酸アンモニウム1%、スクロース10%)

培地5 (塩化アンモニウム0.5%、硝酸カリウム0.5%、及び硝酸ナトリウム0.5%、スクロー

50

ス10%)

【 0 0 2 3 】

培地	デキストラン (g/100ml)	スクロースの転換割合
1a	3.5 ± 0.2	35%
1b	3.8 ± 0.05	38%
2a	5.1 ± 0.02	51%
2b	6.0 ± 0.05	60%
2c	6.2 ± 0.1	62%
3	2.5 ± 0.2	25%
4	2.8 ± 0.05	28%
5	3.0 ± 0.08	30%

10

【 0 0 2 4 】

種々の窒素源(単塩又は複合物質)によって、(最終収率に関して)同じデキストラン生産は得られず、最大量のデキストランは、酵母エキス(1%~2%、スクロースの最大転換割合は1.5%)の導入に関連しており、またこれにより細胞増殖も向上した(製造時間の減少)。すなわち、約1.5%の酵母エキス濃度が、細菌の細胞増殖と生産物生成との間の最良の妥協点であることが明らかになった(さらなる実施例中で、この基本培地をいくつかの他の栄養源を用いて強化し、収率を最大化した)。

【 0 0 2 5 】

実施例2. 炭素源の性質及び濃度がデキストラン生産に与える効果

20

選択した窒素源(酵母エキス)を一定に維持したが、目的は、種々の炭素源(スクロースの代替)がデキストラン生産に与える影響を検証するためであった。各培地中に、5% w/vのスクロースを加えた。スクロースを代替炭素源と共に加えた：コーンステープリカー、グルコース、フルクトース、マンノース、ラクトース(1.5% w/vの酵母エキスを各培地に加えた)。

【 0 0 2 6 】

培地1：コーンステープリカー 5% (1a)及び10% (1b) + スクロース5%
 培地2：グルコース 10% w/v + スクロース5% w/v
 培地3：マンノース 10% + スクロース5%
 培地4：ラクトース 10% + スクロース5%

30

【 0 0 2 7 】

培地	デキストラン (g/100ml)
1a	1.6 ± 0.1
1b	1.5 ± 0.3
2	3.2 ± 0.1
3	3.3 ± 0.2
4	3.1 ± 0.1

【 0 0 2 8 】

デキストラン生産は、スクロースの代替となる種々の炭素源の存在下では常にかつ無差別に低かった。(L. メセンテロイデス等の他の種について報告されている(Cavenaghi, 2000)のと同様に)この菌株は、スクロースをデキストラン生産のための唯一の糖質源として用いる。スクロースは、(特定の酵素の誘導に起因して)他の試験した炭素源に関連するデキストラン生産の誘導物質であるようである。また、2種の異なる炭素源を混合することによっては、デキストランの生産は有意に増加しなかった。

40

【 0 0 2 9 】

実施例3. スクロース濃度がデキストラン生産に与える効果

酵母エキス濃度(1.5% w/v)を一定に維持し、スクロースを唯一の利用可能な炭素源として用いたが、目的は基質濃度がデキストラン生産に与える影響を決定することであった。

【 0 0 3 0 】

培地1：5% w/v スクロース

50

培地2：10% スクロース
 培地3：15% スクロース
 培地4：20% スクロース
 培地5：25% スクロース

【0031】

培地	デキストラン(g)	スクロースの転換割合
1	3.8 ± 0.2	76%
2	5.9 ± 0.3	59%
3	6.1 ± 0.08	40.7%
4	6.0 ± 0.1	30%
5	5.8 ± 0.07 *	23.2%

*高残留スクロース

【0032】

より高い初期濃度のスクロースでは、より高い単位体積当たりのデキストラン収率が得られた。その結果、増殖速度、デキストラン生産、及び転換時間との間の(また、基質残留物を含まないスクロースの転換割合も考慮すると)最良の妥協点は、10~15% (w/v)のスクロースを用いて得られた。至適実験条件下(pH 6.5、温度30、酵母エキス1.5% w/v、及び他の塩添加、適正な植菌物サイズ)での最大比増殖速度(μ_{MAX})は、およそ 0.94 h^{-1} と推定された。

【0033】

実施例4．初期pHがデキストラン生産に与える効果

MRS培地(スクロースを終濃度15% w/vまで添加)をこれらの実験に用いた。細胞増殖及び最終デキストラン生産に関して最良の初期pH (滅菌前、NaOH 1Mを用いて調整)は、6.0~7.0の間(6.5で至適結果)であった。

【0034】

培地の最終pH (発酵の終了時)は、約3.5である。

【0035】

実施例5．攪拌速度(かき混ぜ)がデキストラン生産に与える効果

MRS培地(スクロースを終濃度15% w/vまで添加)を含むフラスコをこれらの実験に用いた。種々の攪拌速度(50、100、150、200、250、300 rpm)を用いて、いくつかの実験を行った。結果により、デキストラン生産が攪拌速度によっては大きく影響を受けないことが見出され、したがって泡のリスクを減少させるために、及びプロセス中にエネルギーを節約するために、最良の攪拌速度を50 rpmと選択した。

【0036】

本菌株は通性好気性であり、実験的証拠により、酸素の利用可能性が菌株の増殖に正の影響を与えているが、デキストランの生産には有意に影響しないことが確認される。(20 lのバイオリクター中での)発酵実験中に用いられた好気状態は、酸素移動速度が約 $1.0 \text{ mmol/l} \cdot \text{h}$ であった。

【0037】

実施例6．植菌物サイズがデキストラン生産に与える効果

MRS培地(スクロースを終濃度15% w/vまで添加)を含むフラスコをこれらの実験に用いた。

【0038】

全ての実験について、発明者らの凍結乾燥された菌株の植菌物($6 \cdot 10^7 \text{ CFU/ml}$)を、合成培地(スクロース10~15% w/v、酵母エキス1.5% w/v、 K_2HPO_4 0.4% w/v、酢酸ナトリウム $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v、クエン酸0.4% w/v、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% w/v)中、30 での18~20時間の増殖後に用いた(植菌物の添加量：1/100 w/v、1/200 w/v、1/250 w/v、1/300 w/v)。

【0039】

10

20

30

40

【表 1】

植菌物サイズ	デキストラン (g/L)
1	49.5 ± 0.1
2	58.3 ± 0.07
3	60.2 ± 0.2
4	48.8 ± 0.1

10

【 0 0 4 0 】

植菌物サイズは、発酵時間に主に影響し、(細胞増殖、発酵時間、及びデキストラン生産の標準化に関して)最良の実験結果は、1/200 w/v希釈の凍結乾燥したW. シバリア株の細胞を用いて得られた。

20

【 0 0 4 1 】

実施例7. 培養時間がデキストラン生産に与える効果

MRS培地(スクロースを終濃度15% w/vまで添加)を含むフラスコをこれらの実験に用いた。デキストラン生産を決定するために、細菌の細胞が誘導期を通過し、培地に適応し、炭素源(及び他の栄養素)がまだ利用可能である時まで増殖しなければならないことを考慮しなければならない。これらの理由により、最良のデキストラン生産を見出すために、培養時間を16~36時間の範囲で追跡した。

【 0 0 4 2 】

24時間の培養時間(最大でも36時間)が最適な培養時間であることが見出された。どちらにしても、生産プロセスは、二重のチェックにより制御するべきである: 発酵中の培地の粘度の増加及びpHの減少。

30

【 0 0 4 3 】

増殖速度を最大化し、最高水準のデキストラン生産を維持する(少なくとも24/36時間で)ための最終的な複合及び合成培地の組成(水中):

【 0 0 4 4 】

スクロース 10~15% wt (145 g/l)

酵母エキス 1.5% wt (10~15 g/l)

K₂HPO₄ 0.4% wt (4g/l)

酢酸ナトリウム・3H₂O 1% wt (10g/l)

クエン酸0.4% wt (4g/l)

MgSO₄・7H₂O 0.05% wt (0.5g/l)

pH 6.0~7.0

温度: 30

発酵時間: 24時間(最大36時間)

植菌物サイズ: 1/200 w/vの凍結乾燥した細胞(6・10⁷ CFU/ml、30、MRS培地中で18~20時間後)

40

【 0 0 4 5 】

デキストランは、中性かつ水溶性の多糖であり、この理由により、粘度はpH又は塩濃度の変化によっては著しく影響を受けない。デキストランは、寸法の大きな中性ポリマーで

50

あるので、ヒトの細胞及び組織に容易に通過/拡散せず、好ましい浸透圧を維持する。(レオメーターの下部のプレートでの)動的レオロジー実験(dynamic rheological experiments)及びデキストラン水溶液の粘度(種々の濃度、pH 6.5)を測定し(理想的な粘性流体(ideal-viscous liquid)の特性のため、全ての溶液の粘度はせん断速度から独立である)、15%デキストラン水溶液の最終的な粘度は、約210 (mPa*s)、及び1%デキストラン最終溶液の粘度は、約5 (mPa*s)であった。

【0046】

高分子量デキストランの別の食品用途の可能性には、チーズ製造が含まれ、これは良好な脂肪代用品になるはずであるデキストランの特性に基づく。多数の市販の脂肪代用品(例えば、ホエイタンパク質、デンプン、及びキサンタンガム、又は微結晶セルロースに基づくもの)は、優れた低脂肪製品を作る可能性で既に知られている；これらの多くは微粒子化された材料に基づいており、高い製造コストを必要とする。

10

【0047】

同じW.シバリアの菌株(受託番号NCIMB 42196)を用いて、スコッタブロスを原料としスクロース及び他の塩で強化された合成培地に植菌した。このプロジェクトの第二の部分の目的は、副産物を取り除くコストを回避し、食品製品の品質を改善するために、酪農産業の副産物を回収することであった。スコッタブ羅斯は、リコッタチーズの製造プロセスに由来する物質であり、塩及び栄養成分に関して変動する副産物である。

【0048】

スコッタブ羅斯は、通常低濃度のタンパク質(0.10~0.15%)並びに高濃度の塩(0.9~1.2%)及び有機酸(0.20~0.25%)を含有している；脂肪はおよそ0.15~0.30%であり、残留ラクトース濃度は低い。スコッタブ羅斯を原料とする(以下に示すとおりスクロース及び酵母エキスで強化された)合成培地を発酵すると、粘性のある自然発酵した流体を得ることができ、これを今度はさらなるチーズ作りの製造に含めることができ、デキストランペーストと呼ばれる(発酵中にデキストランで自然に強化され、8~10%の終濃度である)。これは、この副産物の価値を向上させ、(実際のプロセスのいかなる工程も変更することなく)最終製品の健康的な特性を強化する機会となり得る。

20

【0049】

発酵させたデキストランペーストをチーズ製造中に単に生乳に加えるだけで(発酵中のデキストランの蓄積に起因する、約600~700 cpの粘度を特徴とする)、生産の収率を向上させ、低脂肪チーズを実現することができる(脂肪の終濃度4~5%まで、低脂肪食品について3 g脂肪/50gの参照量という米国の食品表示要件において報告されているとおり)。

30

【0050】

クリーンラベリング(clean labeling)の概念に従って、発酵させたデキストランペーストは、チーズの母材(マトリックス)中に直接組み込むべきであり(他の食品成分の依存について全く宣言するものではないが)、デキストランペーストはカゼインと相互作用し、チーズの構造の分布に影響を与える。デキストランによって形成される水の結合によりチーズの水分含量が増加するので、低脂肪チーズの特徴及び性能は改善され得る。チーズの脂肪含有量は製品の微細構造及び高水分含量に影響する。

【0051】

デキストランペースト用の培地組成：

スクロース 10~15% w/v

酵母エキス 1~1.5% w/v

スコッタブ羅斯 83~89% w/v

【0052】

デキストラン合成に関与する酵素について：

デキストランスクラーゼ、又はグルカンスクラーゼ(GH 70)は、グリコシドヒドロラーゼファミリー70の細胞外酵素であり、グルコース間のグリコシド結合を切断し、また糖質モジュールに結合することも多い。この酵素は、単分子形又は多分子形で存在し、種々の分子量を有する。Ca²⁺、Mg²⁺、及びCo²⁺等の金属イオンにより、酵素活性が増加するはず

40

50

であり、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、及び Mn^{2+} 等の他の金属イオンにより、デキストランスクラーゼ活性が阻害される(Kobayashi M.及びMatsuda K., 1976 : Goyal A., Nigam M.及びKatiyar S.S., 1995)。

【 0 0 5 3 】

受託番号NCIMB 42196によるワイセラ・シバリアの菌株により生産されるデキストランスクラーゼのゲノム配列は、検出され一覧にされており、本願に添付される。

【 配列表 】

0006527888000001.app

フロントページの続き

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 Weissella cibaria partial gts gene for glucansucrase, isolate F28. [online]. 2010-APR-01 uploaded. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION No.FN706438 (GI:293324763) [Retrieved on 2017-NOV-27]. Retrived from the internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/293324763?sat=2&satkey=29857685>
Int. Dairy J., (2014.01), 34, [1], p.125-134

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 0 8 B 1 / 0 0 - 3 7 / 1 8

A 0 1 J 1 / 0 0 - 9 9 / 0 0

A 2 3 C 1 / 0 0 - 2 3 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

D D B J / G e n e S e q