

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-502236

(P2010-502236A)

(43) 公表日 平成22年1月28日(2010.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/16 (2006.01)	C 1 2 N 1/16 Z	4 B 0 4 7
C 1 2 N 1/06 (2006.01)	C 1 2 N 1/06	4 B 0 5 0
C 1 2 P 19/32 (2006.01)	C 1 2 P 19/32 Z	4 B 0 6 4
A 2 3 L 1/221 (2006.01)	A 2 3 L 1/221 H	4 B 0 6 5
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 C	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2009-527867 (P2009-527867)
 (86) (22) 出願日 平成19年9月11日 (2007. 9. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年5月11日 (2009. 5. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2007/051905
 (87) 国際公開番号 W02008/031982
 (87) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 0653686
 (32) 優先日 平成18年9月12日 (2006. 9. 12)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 506261567
 ルサッフル・エ・コンパニー
 LESAFFRE ET COMPAGN
 I E
 フランス、エフ-75001パリ、リュ・
 エティエンヌ・マルセル41番
 (74) 代理人 100082175
 弁理士 高田 守
 (74) 代理人 100106150
 弁理士 高橋 英樹
 (72) 発明者 エリック オリオル
 フランス エフ-94500 シャンピニ
 ー シュール マルヌ リュ シャルルザ
 ンフロア 20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物由来の新規ホスホジエステラーゼ製剤

(57) 【要約】

本発明は、ソルガムから抽出した5'-ホスホジエステラーゼの調整、および5'-ヌクレオチドが豊富な組成物、具体的に酵母抽出物の調整のための5'-ホスホジエステラーゼの使用に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 5' -ヌクレオチドが豊富でグルテンを含まない酵母抽出物を調整する方法であって、
- a) 酵母懸濁液を加熱するステップ；
 - b) 上記酵母懸濁液を 5' -ホスホジエステラーゼと共に処理するステップ；
 - c) 上記懸濁液から不溶性物質を分離するステップ；及び、
 - d) 上記酵母抽出物を回収するステップ；

を含み、上記 5' -ホスホジエステラーゼが、ソルガム麦芽根から抽出されたことを特徴とする。

【請求項 2】

ソルガム麦芽根から抽出された上記 5' -ホスホジエステラーゼが、30分から4時間、50から80の温度で酢酸亜鉛水溶液(0.2から5g/l)中の懸濁状態の麦芽ソルガム根の粉末を煮出し、不溶性成分を除去することで調整されることを特徴とする請求項1の方法。

【請求項 3】

上記粉末の粒子径が20から2000µm、好ましくは100から200µmであることを特徴とする請求項2の方法。

【請求項 4】

上記酵母懸濁液をソルガム 5' -ホスホジエステラーゼと共に処理するステップが、5から30時間、35から70の間の温度で5.0から7.5の間のpHで行われることを特徴とする請求項1乃至3何れか1項の方法。

【請求項 5】

上記方法が、上記加熱ステップの後に、上記酵母懸濁液を酵素消化するステップを更に含むことを特徴とする請求項1乃至4何れかの方法。

【請求項 6】

上記方法が、上記酵母懸濁液をソルガム 5' -ホスホジエステラーゼと共に処理するステップの前に、RNAの完全または部分精製のためのステップを更に含むことを特徴とする請求項1乃至5の何れか1項の方法。

【請求項 7】

上記方法が、デアミナーゼと共に処理するステップを更に含むことを特徴とする請求項1乃至6の何れか1項の方法。

【請求項 8】

上記酵母のRNA含有量が、乾燥重量で6から15%であることを特徴とする請求項1乃至7の何れか1項の方法。

【請求項 9】

前記酵母が、サッカロミセス属、カンジダ属またはクルイベロミセス属であることを特徴とする請求項1乃至8の何れか1項の方法。

【請求項 10】

請求項1乃至9の何れか1項の方法により得られる5' -ヌクレオチドが豊富で、グルテンを含まない酵母抽出物。

【請求項 11】

請求項10または請求項1乃至9の何れか1項の方法により得られる5' -ヌクレオチドが豊富な酵母抽出物を含む香味修飾剤。

【請求項 12】

請求項11の香味修飾剤が用いられることを特徴とする食料品の香味付けの方法。

【請求項 13】

請求項11の香味修飾剤を含む食料品。

【請求項 14】

5' -ヌクレオチドが豊富な組成物の調整のためのソルガム麦芽から抽出した5' -ホスホジエステラーゼの使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、酵母の酵素処理による香味修飾剤の調整のための方法、それにより得られる香味修飾剤および香味修飾剤の使用に関する。

【0002】

酵母抽出物は、粉末状又はペースト状で市販されているとともに、農業食品産業において香味剤として広く使用されている。

【0003】

酵母抽出物は、一般的に自己分解又は加水分解によって得られる酵母の可溶成分の濃縮物として定義される。

10

【0004】

自己分解とは、基本的に、酵母の实在分解酵素（プロテアーゼ）の活性化によって行われる酵母の細胞膜の損傷と、その結果としての細胞内化合物の可溶化とを目的とした方法である。

【0005】

酵母抽出物は、高分解状態にある細胞内含有物の放出を可能とする試薬または酵素剤を用いる加水分解によっても得ることができる。

【0006】

酵母抽出物は、天然香味剤という名で農業食品産業において広く受け入れられている。

20

【0007】

酵母抽出物はまた、同等の香味強度をもつ他の香味剤（時に非天然のもの）と、価格面で非常に競合している。

【0008】

酵母の酵素処理については、当該技術分野で広く知られている。

【0009】

自己の内因性酵素化物質によって酵母を分解することにより調整される酵母の自己分解物は、食品添加物として広く知られている。

【0010】

この自己分解は、酵母細胞を高温でインキュベートする方法、有機溶剤を加える方法、NaClの濃度を増加する方法やこれらの様々な方法を組み合わせることによって開始させることができる。

30

【0011】

自己分解の間にかかる主な変換として、タンパク質のペプチドおよびアミノ酸への分解がある。

【0012】

結果として得られる自己分解物は、苦い香りや独特の強い酵母臭を有する。別のデメリットとしては、内因性リボヌクレアーゼが細胞間RNAを3'-リボヌクレオチドに変換するため、この自己分解物が香りに関して全く貢献しない3'-リボヌクレオチドのみを含むことが多いということがある。

40

【0013】

酵母抽出物の調整方法は、Quest International B.V.による欧州特許第0354610号に示されており、先ず第1に、嫌気条件下で外因性タンパク質分解酵素により細胞壁を分解し、続いて酸素条件下で細胞間RNAを分解する。この方法によれば、5'-ヌクレオチドの多い自己分解物を得ることが可能となる。

【0014】

酵母自己分解物に含まれる公知の風味化合物は、アミノ酸、ペプチド、5'-ヌクレオチド、サッカリドおよび有機酸といった核酸を含む。5'-ヌクレオチド含有物は、風味化合物や香味化合物にとって非常に重要である。このような核酸は、例えば5'-イノシン酸（5'-IMP）や5'-グアノシン酸（5'-GMP）といった食品

50

製剤の香味付けの際の粗化合物として使用されているが、医薬品の製造にも応用されている。

【0015】

旨味は、甘味、塩味、苦味および酸味に続く第5の基本の味として認識されている。高い味覚増進力を有する5'-ヌクレオチドは旨味をも生産し、それ故、酵母抽出物に由来見られるグルタミン酸ナトリウム(MSG)効果を強化する。

【0016】

5'-ヌクレオチドの生産には、極めて特異な酵素である5'-ホスホジエステラーゼ(5'-PDE)を用いた粗RNAの加水分解を必要とする。CohnおよびVolkin(1953)は初めて、ヘビ毒内の5'-ホスホジエステラーゼ活性の存在を実証した。ヘビ毒は、その非常に高い能力にも関わらず、明確な理由のために、農業食品産業で使用することができない。

10

【0017】

5'-PDEの他の主要源には、ペニシリウム・シトリウム(*Penicillium citrium*)といった特定の菌類や、ストレプトマイセス・アウレウス(*Streptomyces aureus*)といった特定の放射菌が含まれる。

【0018】

実際、ペニシリウム・シトリウムにより得られる5'-PDEは、とりわけ、ヌクレアーゼRP-1G(またはEC3.1.30.1)という名で天野エンザイムから市販されている。非常に高い生産コストのため、この酵素は、工業規模上、主に固定化型で用いられる。5'-ヌクレオチドが豊富な酵母抽出物の生産方法にこの酵素を用いると、非常に高い追加の酵素コストが発生してしまう。

20

【0019】

特定の植物胚における5'-PDE活性の存在は、Schuster(1957)によって実証されている。多数の最近の研究は、特許出願のテーマとなるとともに、麦芽根(麦芽は大麦胚芽)の抽出物から5'-ヌクレオチドが豊富な酵母抽出物を生産する方法を主に開示している。麦芽は、醸造産業における副産物であり、したがって、酵母RNA由来の5'-ヌクレオチド生産のための安価な酵素源となる可能性がある。この場合、5'-PDEは、酵素を安定化させるための酢酸亜鉛を含む水溶液中の麦芽根粉末を単に煮出すだけで調整でき、その使用により発生する、5'-ヌクレオチドの豊富な酵母抽出物の製造に掛かる追加コストは小さい。

30

【0020】

酵素源として大麦麦芽を用い、5'-ヌクレオチドが豊富な酵素誘導体を生産する方法は、例えば、US-A-4 810 509、EP-A-0299078、FR 75 08446の文献や、G.ReedおよびT.W.Nagodawithana、“Yeast Technology”第2版(Van Nostrand Reinhold、ISBN 0-442-31892-8)、382~385頁の参照マニュアルに開示されている。

【0021】

麦芽または大麦胚芽から得た5'-PDEを用いることの主たるデメリットとして、アレルギー特性がある。酵素の派生源である原材料は、この場合大麦であるが、アレルギー特性を示すとともに、アレルギー(セリアック病)を引き起こす小麦グリアジンに似たプロラミンというホルデインを含む。実際、大麦は、EC指令2000/13/EC、EC指令2003/89/ECにより修正、にグルテンを含む穀物に属するとしてリストされている。それ故、「アレルゲン」指令と称するこのEC指令によれば、大麦または大麦の誘導体を含む製品は、標示の対象である。

40

【0022】

これらのタンパク質の主たる特性としては、胃の酸性環境下においても、腸内の消化酵素によっても分解されないことである。分解されない状態であることから、これらのタンパク質は、そのままの状態です腸内に吸収され、それ故、免疫反応を引き起こしてしまう。

50

セリアック病の場合、プロラミンの消費が体内反応を引き起こす。これらのタンパク質の消費は、小腸の細胞表面を損傷する強い炎症反応を引き起こすため、いわゆるセリアック病患者にとって、全てのこれらのプロラミンタンパク質は有毒である。このことは、タンパク質、脂肪、炭水化物、ビタミンやミネラルといった栄養素を吸収する小腸の能力を低下させるという影響をもつ。アレルギーは、胃腸性の兆候：胃けいれん、拡張および慢性下痢と関係がある。このことは、各種栄養素（鉄、カルシウム、葉酸）の吸収不良、消化不良（貧血や体重減少）、疲労、骨痛、筋けいれんや過敏症に繋がる可能性がある。

【0023】

大麦麦芽からのPDEの精製は、酵素と大麦プロラミンとが難なく分離できる場合、代替を構成する可能性がある。しかし、Ai-Yu Wangら（（1993）*Biochemistry and Molecular Biology International*、1095～1102頁、第29巻、第6版）、またはBeluhanら（（2003）*in Biotechnology Letters* 25、1099～1103頁）により発行された研究は、調製液中の大麦プロラミンの存在を測定することなく大麦麦芽から精製された5'-PDEを特徴つけることに焦点をおいている。この代替の精製方法は、高価であると見られ、酵素調製液からのグルテンの除去を示す分析記録はあるが、この酵素の活性に由来するアレルギー特性の不存在を立証する臨床記録は特にない。

10

【0024】

代替の第2の精製方法としては、ペニシリウム・シトリヌムや黒色アスペルギルスといった糸状菌の菌株、またはアクタノミセス属やストレプトミセスといった細菌から得られる微生物起源の5'-PDEを用いるものがある。しかし、これら微生物起源は、菌株改良段階を伴う非常に長い進化である。加えて、この型の製品は、工業発酵/工業精製プラントや、プロセスを必要とし、その結果、高価な酵素となってしまう。

20

【0025】

代替の第3の精製方法としては、プラント5'-PDEを工業用微生物内でクローンする方法があるだろう。この精製方法については本出願人の調査チームによって評価がなされているが、この酵素をコード化する配列が知られていないこと、このことが遺伝子組み換え生物（GMO）由来の酵素に繋がるであろうこと、このようなタイプの製品は、様々なユーザークライアントから依然として非常に良く見られていないという事実があった。

【0026】

それ故、市場で入手可能な市販酵素に見られるような経済的デメリットの無いグルテンフリーの食物酵素源を発見することは、今日まで未解決の問題である。本発明の製剤は更に、RNA断片やヌクレオチドを分解して味覚増進力を有しない分解産物にするヌクレアーゼまたはホスファターゼを含まないはずである。本発明の製剤は、服用中に不本意ながら感受する可能性のある臭味や香味臭のいずれも生産しないはずである。

30

【0027】

本出願人は、5'-ヌクレオチドの豊富な酵母抽出物の調整においてアレルギー特性を有する大麦麦芽に、ソルガム麦芽が完全に取って代わることができることを全く予想せずまた意外にもちょうど今見出した。さらに、ソルガムは、EC指令2003/89/ECのグルテンを含む穀物のリストには記載されておらず、したがってグルテンの様なアレルギー特性が無い。

40

【0028】

本出願人は、ソルガム麦芽の胚芽や細根を含む混合物から5'-PDEの酵素調整剤を作り出した。

【0029】

より詳しくは、ソルガム麦芽根を煮出す方法により、ソルガム5'-ホスホジエステラーゼを作り出した。故に、粒径20から2000 μm 、好ましくは100から200 μm のソルガム根の粉末が、酢酸亜鉛または酢酸亜鉛の同等剤、すなわち同一の5'-PDE安定化効果を備える薬剤の水溶液中に懸濁されている。この懸濁液は、50から80の温度で30分から4時間インキュベートされる。好ましくは、この懸濁液は攪拌される。

50

例えば、ソルガム根の粉末は5から20% (w/w)、好ましくは10から15 (w/w)、具体的に13%の割合で用いられる。酢酸亜鉛の濃度は、好ましくは0.2から5g/lである。他の実施形態では、細根を含む全ソルガム麦芽が用いられる。そして、好ましい実施形態としては、懸濁液の可溶性部分が回収される。例えば、調整液が遠心分離式のデカンタで分離され、その後、デカンタの上澄みが遠心清澄機で分けられる。

【0030】

このようにして得られたソルガム5'-PDE製剤は、5'-ヌクレオチドが豊富なグルテンフリーの組成物、5'-ヌクレオチドが豊富な酵母抽出物の調整剤のために用いることができる。

【0031】

本発明はしたがって、酢酸亜鉛水溶液(0.2から5g/l)中の麦芽ソルガム根の懸濁液を50から80の温度で30分から4時間調整するステップと、その後不溶性成分を除去するステップとを含む、ソルガム5'-PDEの調整方法に関する。この調整方法は、濃縮するステップをさらに含んでもよい。

【0032】

本発明は、この調整方法により得られるソルガム5'-PDEの調整剤、およびRNAを分解するためのソルガム5'-PDEの使用に関し、より詳細には、5'-ヌクレオチドが豊富な組成物、好ましくは酵母抽出物であり、グルテンを含まない組成物の調整に関する。本発明はまた、RNA含有組成物の5'-ヌクレオチドを豊富にするための、ソルガム麦芽から抽出した5'-PDEの使用に関する。本発明はしたがって、5'-ヌクレオチドの豊富なグルテンフリーな組成物、好ましくは酵母抽出物を調整するための方法であって、RNAを細胞外培地に放出させるための微生物細胞を処理するステップと、放出されたRNAを5'-ヌクレオチドに変換させるために、得られた懸濁液をソルガム5'-PDE調整剤と共に処理するステップとを含む。本方法で使用可能な他の微生物細胞の例としては、例えば、アスペルギルス属やトリコデルマ属型の糸状菌や、好ましくは乳酸菌属の乳酸桿菌である細菌がある。本方法は、RNAの完全または部分精製の間ステップを含んでもよい(JP 51106791参照)。

【0033】

好ましい実施形態としては、本発明は、酵母抽出物またはソルガム懸濁液を5'-PDE調整剤と共に処理するステップを含む。

【0034】

したがって、本発明は、より詳細には、5'-ヌクレオチドが豊富でグルテンを含まない酵母抽出物を調整する方法に関し、

酵母懸濁液を加熱するステップ、

酵母懸濁液を5'-ホスホジエステラーゼと共に処理するステップ、

懸濁液から不溶性物質を分離するステップ、及び、

酵母抽出物を回収するステップ、を含み、

5'-ホスホジエステラーゼが、ソルガム、詳しくはソルガム麦芽、より詳しくはソルガム麦芽根から抽出されたことを特徴とする。

【0035】

本発明に有用な酵母は、食用酵母である。本発明によれば、抽出物を調整するために用いられる酵素は、好ましくはサッカロミセス属であり、好ましくは更に、いわゆるサッカロミセス・カールスベルゲンシスを含むサッカロミセス・セレピシエ種である。サッカロミセス・セレピシエの酵母細胞は、ビール酵母の場合、サッカロミセス・カールスベルゲンシスと呼ばれることが多いが、“THE YEASTS, a taxonomic study”第3版、N. J. W. Kregger van Rij版 - 1984年によれば、正確な分類名はサッカロミセス・セレピシエである(他方、このマニュアルの1998年の第4版では、サッカロミセス・カールスベルゲンシスには二つの類義語: サッカロミセス・セレピシエおよびサッカロミセス・パストリアヌス(Saccharomyces pastorianus)があるが、本明細書に参照として取り込むのは、1984

10

20

30

40

50

年からあるこのマニュアルの第3版とする。) 。更に、この酵母は、カンジダ属(例えばカンジダ酵母)、ピキア属、ハンゼヌラ、クルイペロミセス属(例えば、クルイペロミセス・ラクチス、クルイペロミセス・マルキサヌスまたはクルイペロミセス・フラジリス)、トルラ、フザリウム属、ザイモナス属などの由来であってもよい。この酵母は、未使用の酵母または醸造プロセスで使用された酵母の細胞由来であってもよい。好ましい実施形態としては、この酵母は、サッカロミセス属、カンジダ属またはクルイペロミセス属である。

【0036】

このように酵母が選ばれるのは、RNA含有量が高いからである。特定の実施形態において、RNA含有量は、乾燥重量で6から15%である。

10

【0037】

酵母は、そのRNA含有量を増加可能とするための予備処理を施してもよい。このような予備処理は、酵母の変異および抽出による予備処理としてUS3,909,352およびJP11-196856に、培地中の硫酸カリウムの制限による予備処理としてJP5-176757に開示されている。

【0038】

酵母懸濁液中のRNA含有量は、人間の食品または動物性食品として承認されている微生物から得られたRNAを添加することで増加させてもよい。このような微生物の例としては、例えばアスペルギルス属やトリコデルマ属型の糸状菌や、好ましくは乳酸菌属の乳酸桿菌である細菌がある。この場合、微生物はそのRNA含有量を放出するように処理される。特定の実施形態において、RNAを公知の手法(超ろ過法、クロマトグラフィー法または沈殿法)により完全または部分精製することができる。

20

【0039】

酵母抽出物を調整する方法は、当業者に広く知られている。このような方法は、例えば以下の特許に開示されている: EP 249 435; EP 299 078; EP 354 610; EP 466 922; EP 1 199 353; EP 1 479 299; US 3,961,080; US 4,303,680; US 4,810,509。これらの方法は、一般に酵母懸濁液を加熱するステップを含み、追加的に酵母の自己分解および/または加水分解のためのステップを含み、好ましくは懸濁液から不溶性物質を分離するステップを含む。この懸濁液は、生きている酵母の懸濁液である。

30

【0040】

好ましくは、ホスファターゼおよびヌクレアーゼを含む酵母酵素を不活性化させ、酵母の細胞内含有量およびRNAを放出するように酵母を透過処理し、好ましくは細胞外培地にRNAを選択的に可溶化し、結果的に酵母懸濁液のRNA含有量よりも多い5'-ヌクレオチド力価を得られるように、酵母懸濁液が原形質分離される。好ましくは、酵母懸濁液は10から25%の乾燥物質を含む。好ましい実施形態において、酵母懸濁液は、5から95の範囲の温度で5分から3時間加熱される。具体的に、懸濁液を75で2時間加熱し、その後60まで冷却することができる。

【0041】

例えば機械処理(フレンチプレス、ガラス球、電磁場など)、化学処理(酸、塩基、塩、溶媒、浄化剤など)または酵素処理(α-グルカナーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼなど)といった、酵母の細胞内含有量を放出させる当業者に広く知られた他の技術を用いることもできる。

40

【0042】

更に、本発明の方法は、酵素処理ステップを含んでもよく、この酵素は、プロテアーゼ、α-グルカナーゼ、アミラーゼ、リパーゼなどから選択できる。

【0043】

故に、本発明は、5'-ヌクレオチドの豊富な酵母抽出物を調整する方法に関し、

a) 酵母懸濁液の加熱ステップ;

b) 酵母の自己分解および/または酵素加水分解ステップ;

50

c) 懸濁液からの不溶性物質の分離ステップ；

d) 酵母抽出物の回収ステップ；

を含み、この方法は、酵母懸濁液をソルガム麦芽から抽出した 5' - ホスホジエステラーゼと共に処理するステップを含むことを特徴とする。

【0044】

ステップ b は、酵母外部から酵素を用いて処理されることが好ましく、酵母タンパク質の分解を促進するために、具体的にプロテアーゼを用いて処理されることが好ましい。このようなプロテアーゼの例としては、植物プロテアーゼ（パパイン、プロメラインなど）または微生物プロテアーゼ（枯草菌、コウジカビなど）がある。

【0045】

本発明の方法は、ソルガム 5' - ホスホジエステラーゼと共に処理するステップの前に、RNA の完全または部分精製のステップを含んでもよい。

【0046】

好ましい実施形態において、ソルガム 5' - P D E と共に酵母懸濁液を処理するステップは、35 から 70 の間の温度で 5.0 から 7.5 の間の pH で行われる。ソルガム 5' - P D E が入った酵母懸濁液のインキュベーション時間は、5 から 30 時間まで幅があってよい。好ましくは、ソルガム 5' - P D E の調整液は、酵母懸濁液の 10% w/w 加えられる。例えば、酵母懸濁液をソルガム 5' - P D E と共に処理するステップは、6.3 の pH、60 で 18 時間行うことができる。

【0047】

好ましくは、本発明の酵母抽出物は、5' - G M P および / または 5' - I M P が豊富である。具体的には、共に 0.1 から 15% の 5' - G M P および 5' - I M P レベル達成でき（二ナトリウム、七水和物の塩として表した場合）、好ましくは 2 から 5% を達成できる。得られた酵母抽出物は、グルテンを含まない。

【0048】

本発明の方法は、酵母懸濁液をデアミナーゼと共に処理するステップを追加的に含んでもよい。本処理は、酵母懸濁液をソルガム P D E と共に処理する間または処理した後に行うことができる。好ましい実施形態において、デアミナーゼと共に処理する本ステップは、ソルガム P D E と共に処理するステップと同時またはその後に行われる。例えば、デアミナーゼが、5' - P D E との処理の最終段階で添加されてもよく、例えば 45 まで懸濁液が冷却された後に添加されてもよい。本ステップにより、5' - A M P を所望の 5' - I M P に変換可能となる。この追加的ステップは、当業者に広く知られており、例えば E P 249 435 や E P 354 610 に開示されている。市販されているデアミナーゼの一例としては、天野から生産されているデアミナーゼ 50000 G がある。好ましい実施形態として、本発明の方法は、多糖類を乳酸やコハク酸といった有機酸に変換可能な発酵ステップを含む。本ステップは当業者に広く知られており、例えば E P 191 513 や E P 354 610 に開示されている。この発酵は、乳酸菌属または同等菌属の細菌補助剤と共に好ましく行うことができる。

【0049】

好ましくは、本発明の酵母抽出物は、酵母細胞の不溶性部分からその後分離される。不溶性部分からこのように分離された酵母抽出物は、不溶性部分の膜脂質の酸化による臭味の発生が無いという良好な保存の効果をもたらす。例えば、本ステップは、液体成分の遠心分離またはろ過または回収により行うことができる。

【0050】

可溶性成分にはその後、酵母抽出物に対する公知のあらゆる最終処理、具体的に、濃縮、ろ過、低温殺菌および / または乾燥が施される。

【0051】

上述したように、酵母抽出物は普通、味覚増進剤として用いられる。「酵母抽出物」という表現は、本発明では、一般に自己分解または加水分解によって得られる酵母の可溶性成分の濃縮物を意味するものと解される。5' - ヌクレオチドが豊富な本発明の酵母抽出物

10

20

30

40

50

は、例えば、液体状、ペースト状、固体状といった様々な形態で供給される。本発明の酵母抽出物は、乾燥物質の少なくとも90重量%、好ましくは乾燥物質の94から98重量%の5'-ヌクレオチドを有利に含む。

【0052】

本発明はしたがって、本発明による方法により得られるまたは得ることのできる酵母抽出物、またはこれら酵母抽出物の食料部門への適用に関する。これら酵母抽出物は、グルテンを含まない。これら酵母抽出物は、好ましくは共に0.1から15%の5'-GMPおよび5'-IMPレベルを含む(二ナトリウム、七水和物の塩として表した場合)。

【0053】

本発明は、本発明による酵母抽出物の食事献立における利用、このようにして得られた食事献立およびこの献立に基づいて得られる消費食料品に関する。食事献立は例えば、ブロス、ソース、惣菜、パン生地または香辛料とできる。

【0054】

本発明は、本発明による酵母抽出物を含む香味修飾剤にも関する。本発明による香味修飾剤は、不溶性物質も含むことができる。

【0055】

本発明は、本発明による香味修飾剤の食事献立における利用、このようにして得られた食事献立およびこの献立に基づいて得られる消費食料品に関する。食事献立は例えば、ブロス、ソース、惣菜、ベーカリー製品または香辛料とできる。

【0056】

故に、本発明は、本発明による香味修飾剤が用いられることを特徴とする食料品の香味付けの方法に関する。

【0057】

以下の実施例は、本発明を明らかにするために示されるものであるが、本発明の範囲を限定するものとして考慮されるべきではない。

【0058】

実施例1

ソルガム根の抽出物の調整

使用するソルガム根は、アフリカのソルガム麦芽会社から入手した。500 μ mの平均粒子サイズを有する粉末を得るため、ソルガム根の13gが磨り潰されまたは挽かれた。この粉末は、0.2g/lの酢酸亜鉛水溶液中、2時間、60の温度で、13%(w/w)の煮汁に調整された。2回の遠心分離ステップにより固体および不溶物を抽出した後、ソルガム根の抽出物を得た。

【0059】

実施例2

5'-ヌクレオチドが豊富な酵母抽出物の調整 -

ソルガム由来の5'-PDEと市販酵素との比較

15%の乾物含有量および9.5%のRNA含有量(Induction of Autolytic Breakdown of RNA in Yeast by Addition of Ethanol and by Drying/Rehydration; Trevelyan, J., Sci. Food Agric., 1977, 28, 579-588; および Processing Yeast to Reduce its Nucleic Acid content. Induction of Intracellular RNase Action by a Simple Heat-shock Procedure, and an Efficient Chemical Method Based on Extraction of RNA by Salt Solutions at low pH; Trevelyan, J., Soc. Chem. Ind., 1978, pp141-174に記載されたTrevelyan法による加水分解により測定。)を有するサッカロミセス・セレピシエ属のクリーム酵母の1,000gが2時間75で熱処理され、その後56に冷却されると共に、5.3

10

20

30

40

50

のpHに調節された(原形質分離)。このクリームは、5'-PDEを含む(10% w/w)ソルガム根の懸濁液の上澄みと共に混合される。混合液全体は、RNAを5'-ヌクレオチドに加水分解するため、56℃で15時間、穏やかに攪拌されながらインキュベートされる。固形物はその後、遠心分離によって分離され、再度遠心分離する前に脱塩水による洗浄にさらされる。2つの上澄み物は、混ぜ合わされ、濃縮され、スプレードライされる。粉体の分析をしたところ、2.44%の5'-GMP含有量を示した(二ナトリウム、七水和物の塩として表した場合)。この分析は、Enzymatic Production of Ribonucleotides from Autolysate of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey; Belem, M. A. F., ら、Journal of Food Science, 62, pp 851-854に記載されたRP-HPLCにより実施した。

10

【0060】

同一条件で原型質分離を行うと共に、天野から入手した市販の5'-PDE(トレードネーム=PDE RP-1、天野エンザイム・ヨーロッパ)の1gと15時間インキュベートされた同一クリームの1kgは、分離、濃縮および乾燥後、2.60%5'-PDEの力価を有する粉体を与えた。加水分解の効率はしたがって、両者とも同様であり、RNAの加水分解という観点からも、ソルガム由来の5'-PDEは、より高価な市販酵素と同様の効率である。

【0061】**実施例3**

本方法は、麦芽になったソルガム根の13gおよび前実施例で上述したクリーム酵母の1,000gからスタートした。しかしながら、インキュベーションの15時間後、温度を45℃まで下げ、天野から入手した5'-アデニルデアミナーゼ(トレードネーム=Deamizyme 50000G、天野エンザイム・ヨーロッパ)の0.1gを加えた。5'-アデニルデアミナーゼで5'-AMPを5'-IMPに変換させるために、混合物全体が5時間インキュベートされた。固形物はその後、遠心分離によって分離され、再度遠心分離する前に脱塩水による洗浄にさらされる。2つの上澄み物は、混ぜ合わされ、濃縮され、スプレードライされる。粉体の分析をしたところ、2.80%の5'-GMP含有量および3.21%の5'-IMP含有量を示した(分析はRP-HPLCによるものであり、これらは二ナトリウム、七水和物の塩として表した)。

20

30

【0062】

本方法は、麦芽になったソルガム根の13gおよび前実施例で上述したクリーム酵母の1,000gからスタートした。しかしながら、ソルガム麦芽5'-PDEを加える前に、酵母の乾物含量の可溶化を促進するためにパピインの0.5gが加えられた。本方法の残りの部分は、実施例3で5'-アデニルデアミナーゼを加えることを含み同様であった。結果物である粉体の分析をしたところ、1.96%の5'-GMP含有量および2.07%の5'-IMP含有量を示した(分析はRP-HPLCによるものであり、これらは二ナトリウム、七水和物の塩として表した)。

【0063】

本方法は、サッカロミセス・セレピシエのクリーム酵母を、13%の乾物含有量および12.5%のRNA含有量を有するカンジダ酵母クリームに置き換えた他は、実施例1および2同様に行った。結果物である粉体の分析をしたところ、3.75%の5'-GMP含有量および3.98%の5'-IMP含有量を示した(これらは二ナトリウム、七水和物の塩として表した)。

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/FR2007/051905
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23L1/229 C12N1/06 C12P19/30		
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) A23L C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89/09276 A (CPC INTERNATIONAL INC [US]) 5 October 1989 (1989-10-05)	14
Y	page 1, paragraphs 1,2; claim 1 page 3, paragraphs 3,4	1-14
Y	EP 0 299 078 A1 (KOHJIN CO [JP]) 18 January 1989 (1989-01-18) cited in the application page 3, line 19 - page 9, line 12; claims 1,3-5; examples 3,5	1-14
A	US 4 303 680 A (TANEKAWA TETSUO ET AL) 1 December 1981 (1981-12-01) cited in the application column 4, lines 13-68; claims 1,5; examples 1-3	1-14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">25 février 2008</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">05/03/2008</div>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Tallgren, Antti</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/051905

(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 354 610 A1 (UNILEVER NV [NL]; QUEST INT [NL] QUEST INT [NL]) 14 February 1990 (1990-02-14) cited in the application claims 1,7,9; examples 3-6	1-14
A	EP 1 629 720 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 1 March 2006 (2006-03-01) claims 1-7; examples 1-3	1-14
A	US 3 318 710 A (KINICHIRO SAKAGUCHI ET AL) 9 May 1967 (1967-05-09) example 2	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2007/051905

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8909276 .	A	05-10-1989	AT 118248 T 15-02-1995
			AU 625555 B2 16-07-1992
			AU 3421389 A 16-10-1989
			CA 1313636 C 16-02-1993
			DE 68921070 D1 23-03-1995
			DE 68921070 T2 01-06-1995
			DK 230290 A 24-09-1990
			EP 0406319 A1 09-01-1991
			ES 2012288 A6 01-03-1990
			IE 890835 L 25-09-1989
			JP 4504649 T 20-08-1992
			MX 171136 B 04-10-1993
			NZ 228178 A 26-07-1991
			PH 25082 A 19-02-1991
ZA 8901699 A 29-11-1989			
EP 0299078	A1	18-01-1989	AU 611128 B2 06-06-1991
			AU 1184988 A 10-08-1988
			CA 1320462 C 20-07-1993
			WO 8805267 A1 28-07-1988
US 4303680	A	01-12-1981	DE 3000188 A1 17-07-1980
			FR 2445857 A1 01-08-1980
			JP 1134631 C 14-02-1983
			JP 55092672 A 14-07-1980
			JP 57022313 B 12-05-1982
NL 8000022 A 08-07-1980			
EP 0354610	A1	14-02-1990	AT 117367 T 15-02-1995
			AU 616544 B2 31-10-1991
			AU 3828889 A 25-01-1990
			CA 1336174 C 04-07-1995
			DE 68920663 D1 02-03-1995
			DE 68920663 T2 06-07-1995
			DK 361589 A 23-01-1990
			JP 2086749 A 27-03-1990
			JP 2097623 C 02-10-1996
			JP 8002267 B 17-01-1996
			MX 170983 B 23-09-1993
			US 5288509 A 22-02-1994
			EP 1629720
AU 2005276308 A1 02-03-2006			
CA 2576516 A1 02-03-2006			
CN 101014251 A 08-08-2007			
DE 602004005334 T2 20-12-2007			
DK 1629720 T3 16-07-2007			
ES 2283912 T3 01-11-2007			
WO 2006021693 A1 02-03-2006			
KR 20070050971 A 16-05-2007			
US 3318710	A	09-05-1967	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/051905

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23L1/229 C12N1/06 C12P19/30		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23L C12N C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, formes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data; FSTA, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 89/09276 A (CPC INTERNATIONAL INC [US]) 5 octobre 1989 (1989-10-05)	14
Y	page 1, alinéas 1,2; revendication 1 page 3, alinéas 3,4	1-14
Y	EP 0 299 078 A1 (KOHJIN CO [JP]) 18 janvier 1989 (1989-01-18) cité dans la demande page 3, ligne 19 - page 9, ligne 12; revendications 1,3-5; exemples 3,5	1-14
A	US 4 303 680 A (TANEKAWA TETSUO ET AL) 1 décembre 1981 (1981-12-01) cité dans la demande colonne 4, ligne 13-68; revendications 1,5; exemples 1-3	1-14
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (liste qu'indiquée) *C* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre la priorité ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *A* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 février 2008		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 05/03/2008
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Tallgren, Antti

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2007/051905

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 354 610 A1 (UNILEVER NV [NL]; QUEST INT [NL] QUEST INT [NL]) 14 février 1990 (1990-02-14) cité dans la demande revendications 1,7,9; exemples 3-6	1-14
A	EP 1 629 720 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 1 mars 2006 (2006-03-01) revendications 1-7; exemples 1-3	1-14
A	US 3 318 710 A (KINICHIRO SAKAGUCHI ET AL) 9 mai 1967 (1967-05-09) exemple 2	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/051905

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8909276	A	05-10-1989	AT 118248 T	15-02-1995
			AU 625555 B2	16-07-1992
			AU 3421389 A	16-10-1989
			CA 1313636 C	16-02-1993
			DE 68921070 D1	23-03-1995
			DE 68921070 T2	01-06-1995
			DK 230290 A	24-09-1990
			EP 0406319 A1	09-01-1991
			ES 2012288 A6	01-03-1990
			IE 890835 L	25-09-1989
			JP 4504649 T	20-08-1992
			MX 171136 B	04-10-1993
			NZ 228178 A	26-07-1991
			PH 25082 A	19-02-1991
			ZA 8901699 A	29-11-1989
EP 0299078	A1	18-01-1989	AU 611128 B2	06-06-1991
			AU 1184988 A	10-08-1988
			CA 1320462 C	20-07-1993
			WO 8805267 A1	28-07-1988
US 4303680	A	01-12-1981	DE 3000188 A1	17-07-1980
			FR 2445857 A1	01-08-1980
			JP 1134631 C	14-02-1983
			JP 55092672 A	14-07-1980
			JP 57022313 B	12-05-1982
			NL 8000022 A	08-07-1980
EP 0354610	A1	14-02-1990	AT 117367 T	15-02-1995
			AU 616544 B2	31-10-1991
			AU 3828889 A	25-01-1990
			CA 1336174 C	04-07-1995
			DE 68920663 D1	02-03-1995
			DE 68920663 T2	06-07-1995
			DK 361589 A	23-01-1990
			JP 2086749 A	27-03-1990
			JP 2097623 C	02-10-1996
			JP 8002267 B	17-01-1996
			MX 170983 B	23-09-1993
			US 5288509 A	22-02-1994
			EP 1629720	A1
AU 2005276308 A1	02-03-2006			
CA 2576516 A1	02-03-2006			
CN 101014251 A	08-08-2007			
DE 602004005334 T2	20-12-2007			
DK 1629720 T3	16-07-2007			
ES 2283912 T3	01-11-2007			
WO 2006021693 A1	02-03-2006			
KR 20070050971 A	16-05-2007			
US 3318710	A	09-05-1967	AUCUN	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ナディア カイド

フランス エフ - 9 2 0 0 0 ナンテール アレ ジョルジュ ポリツァー 3 5

Fターム(参考) 4B047 LB06 LG56 LP18

4B050 CC01 DD13 LL05

4B064 AF23 CA21 CC06 DA01 DA10

4B065 AA72X AA80X BD01 BD44 CA23 CA41 CA44