

明 細 書

発明の名称：

ノンアルコールビールテイスト飲料、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強剤及び酸味低減剤、並びに、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強方法及び酸味低減方法

技術分野

[0001] 本発明は、ノンアルコールビールテイスト飲料、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強剤及び酸味低減剤、並びに、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強方法及び酸味低減方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の消費者の嗜好の多様化にともなって、様々な香味特徴をもつノンアルコールビールテイスト飲料の開発が望まれている。

[0003] 例えば、特許文献1にはビール様飲料のkokumi感を増強するために、甘味系成分、アルデヒド系成分などをビール様飲料用風味改善剤とすることなどが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2016-214262号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、特許文献1のような風味改善剤は、香味に影響を与えるものであり、使用に適さない場合もあった。

[0006] また、ノンアルコールビールテイスト飲料の原材料として、麦類、コーン等の穀類由来原料は普通に用いられる。穀類由来原料はノンアルコールビールテイスト飲料に普通に用いられる原料であるので、穀類由来原料をkokumiを増強するための材料に使用することは、製造者及び飲料の需要者にとって抵

抗が少ない。そのため、穀類由来原料を使用してコク味を増強する方法が望まれていた。

[0007] また、ノンアルコールビールテイスト飲料には、pHを下げて腐敗を防止するためにクエン酸等の酸を添加することがある。酸を添加すると酸味を感じるため、pHはそのままにして酸味を低減する方法が望まれていた。

[0008] 本発明は、穀類由来原料を用いてコク味が強く、酸味が低減されたノンアルコールビールテイスト飲料を提供することを目的とする。また、本発明は、穀類由来原料であるノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強剤及び酸味低減剤を提供することを目的とする。さらに、本発明は、穀類由来原料を用いたノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強方法及び酸味低減方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明は、以下のノンアルコールビールテイスト飲料等に関する。

〔１〕 アルコール度数が１．０％未満であるノンアルコールビールテイスト飲料であって、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量３５～５０ｋＤａの糖修飾タンパク質を含む、ノンアルコールビールテイスト飲料。

〔２〕 上記糖修飾タンパク質が有する、グリケーションされたリジンの含有量が、４．７ｎｍｏｌ／ｍＬ以上である上記〔１〕に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

〔３〕 上記糖修飾タンパク質が有する、グリケーションされたリジンの含有量が、９．４ｎｍｏｌ／ｍＬ以上である上記〔１〕又は〔２〕に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

〔４〕 上記グリケーションされたリジンのアミノ基にグリケーションしている糖が、単糖又は二糖である上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

〔５〕 上記穀類が、大麦、小麦、トウモロコシ、イネ及び大豆からなる群よ

り選択される少なくとも１種である上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

〔６〕麦汁を含まない上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

〔７〕穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量３５～５０ｋＤａの糖修飾タンパク質を含む、アルコール度数が１．０％未満であるノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強剤。

〔８〕アルコール度数が１．０％未満であるノンアルコールビールテイスト飲料に、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量３５～５０ｋＤａの糖修飾タンパク質を添加することにより、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumiを増強する、ノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強方法。

〔９〕穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量３５～５０ｋＤａの糖修飾タンパク質を含む、アルコール度数が１．０％未満であるノンアルコールビールテイスト飲料の酸味低減剤。

〔１０〕アルコール度数が１．０％未満であるノンアルコールビールテイスト飲料に、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量３５～５０ｋＤａの糖修飾タンパク質を添加することにより、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味を低減する、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味低減方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、穀類由来原料を用いてkokumiが強く、酸味が低減されたノンアルコールビールテイスト飲料を提供することができる。また、穀類由来原料であるノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強剤及び酸味低減剤を提供することができる。さらに、穀類由来原料を用いたノンアルコールビールテイスト飲料のkokumi増強方法及び酸味低減方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、糖修飾タンパク質を含む。

糖修飾タンパク質は、その分子量が35～50 kDaである。

[0012] 分子量35～50 kDaのタンパク質は、ノンアルコールビールテイスト飲料の原料液に対して30 kDaのカットオフ膜を用いて限外濾過を行い、次いでSDS-PAGEによる電気泳動で測定される分子量が35～50 kDaの領域にみられるタンパク質である。

好ましくは約40 kDaのタンパク質であり、本明細書では約40 kDaのタンパク質を40 kDaタンパク質ともいう。

[0013] 糖修飾タンパク質は、穀類由来タンパク質である。

上記穀類は、大麦、小麦、トウモロコシ、イネ及び大豆からなる群より選択される少なくとも1種であることが好ましい。

また、穀類が麦である場合、ノンアルコールビールテイスト飲料の製造に使用される公知の麦に由来するタンパク質を含有することができる。このような麦としては、大麦、小麦、ライ麦、カラス麦、オート麦、エン麦などが挙げられ、好ましくは大麦である。また、発芽した麦、未発芽の麦のいずれでもよいが、好ましくは発芽した麦の麦芽である。これらは、単独で含有していてもよく、2種以上を組み合わせる含有していてもよい。

[0014] 糖修飾タンパク質は、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされたタンパク質である。

本発明の「リジンのアミノ基がグリケーションされた」とは、リジンのアミノ基に糖が結合していることを意味する。

リジンの有するアミノ基のうち、側鎖のアミノ基に糖がグリケーションしていることが好ましい。

リジンのアミノ基がグリケーションされていることの確認は、NBT法（Nitroblue tetrazolium法）により比色定量することにより行うことができる。

リジンのアミノ基にグリケーションしている糖は、単糖、二糖、三糖以上の多糖のいずれであってもよいが、単糖又は二糖であることが好ましい。

単糖としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含むすべての糖が挙げられる。

二糖としては、マルトース、ラクトース等のマルトース型二糖が挙げられる。

三糖としては、マルトトリオース、セルトリオース、フコシルラクトース、シアリルラクトース等が挙げられる。

[0015] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、上記のような糖修飾タンパク質を含有するために、コク味が強く、酸味が低減されたノンアルコールビールテイスト飲料とすることができる。

また、糖修飾タンパク質は穀類由来原料であるため、特許文献1に記載された風味改善剤のように香味に意図しない影響を与えることが防止される。また、穀類由来原料はノンアルコールビールテイスト飲料に普通に用いられる原料であるので、穀類由来原料をコク味を増強するための材料、又は、酸味を低減するための材料に使用することは、製造者及び飲料の需要者にとって抵抗が少ない。

[0016] 本発明において、「コク味」とは、5基本味、すなわち、甘味、塩味、酸味、苦味及びうま味では表せない味覚であり、味の強さ（飲み応え）、味の広がり、味の厚み、味の経時変化（余韻又は持続性）等によって表される味覚である。本発明においてコク味を増強するとは、例えば、コク味を有しない飲食品に、コク味を付与すること、コク味を有する飲食品のコク味を増強することを含む。コク味の有無や程度は、専門パネルによる官能評価によって評価することができる。

また、酸味の有無や程度も、専門パネルによる官能評価によって評価することができる。

[0017] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料では、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味を低減する観点からは、グリケーションされたリジンの含有量が4.7nmol/mL以上であることが好ましい。

また、ノンアルコールビールテイスト飲料のコク味を増強する観点からは、

グリケーションされたリジンの含有量が 9.4 nmol/mL 以上であることが好ましい。

また、グリケーションされたリジンの含有量が 50.0 nmol/mL 以上であることが好ましく、 80.0 nmol/mL 以上であることも好ましく、 100 nmol/mL 以上であることも好ましい。

また、グリケーションされたリジンの含有量が $50.0 \sim 1000 \text{ nmol/mL}$ であることが好ましく、 $80.0 \sim 1000 \text{ nmol/mL}$ であることも好ましく、 $100 \sim 1000 \text{ nmol/mL}$ であることも好ましい。

グリケーションされたリジンの含有量の定量は、NBT法により比色定量することにより行うことができる。

[0018] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料のエキス分重量は特に限定されないが、好ましくは $0.01 \sim 20.0$ 重量%である。

本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、麦芽を原料として使用してもよい。

また、原料中の麦芽の比率が 0 重量%であってもよい。

ここで「麦芽の比率」とは、麦芽、米、トウモロコシ、コウリャン、バレイショ、デンプン、麦芽以外の麦、及び糖類など、水とホップ以外の原料中に占める麦芽の重量の比率をいう。ただし、酸味料、甘味料、苦味料、調味料、香料など、微量に添加され得る成分については上記比率の計算に含めない。

本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、麦汁を含まなくてもよい。

[0019] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、プリン体濃度が 5.0 mg 未満/ 100 mL であることが好ましい。また、プリン体濃度が $0 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ であることも好ましい。

プリン体濃度が上記範囲にあるノンアルコールビールテイスト飲料について、糖修飾タンパク質を添加することによってコク味を特に増強させ、酸味を低減させることができる。

[0020] ノンアルコールビールテイスト飲料とは、アルコール度数が 1% 未満のビー

ルテイスト飲料であり、好ましくは、アルコールを実質的に含まない。また、アルコール度数が0%であってもよい。

ビールテイスト飲料とは、ビール風味の炭酸飲料である。

ここで、アルコールを実質的に含まない態様の飲料は、検出できない程度の極微量のアルコールを含有する飲料を除くものではない。アルコール度数が四捨五入により0.0%となる飲料、中でも、アルコール度数が四捨五入により0.00%となる飲料は、ノンアルコールビールテイスト飲料に含まれる。本発明のノンアルコールビールテイスト飲料の種類としては、例えば、ノンアルコールのビールテイスト飲料、ビールテイストの清涼飲料などが含まれる。なお、ここでの「アルコール度数（アルコール含有量）」はエタノールの含有量を意味し、脂肪族アルコールは含まれない。

[0021] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料のアルコール度数は、飲料中のアルコール分の含有量（ $v/v\%$ ）を意味し、公知のいずれの方法によっても測定することができるが、例えば、振動式密度計によって測定することができる。具体的には、飲料から濾過又は超音波によって炭酸ガスを抜いた試料を調製し、そして、その試料を直火蒸留し、得られた留液の15℃における密度を測定し、国税庁所定分析法（平19国税庁訓令第6号、平成19年6月22日改訂）の付表である「第2表アルコール分と密度（15℃）及び比重（15/15℃）換算表」を用いて換算して求めることができる。アルコール度数が1.0%未満の場合は、市販のアルコール測定装置や、ガスクロマトグラフィーを用いても良い。

[0022] 以下に、一般的なノンアルコールビールテイスト飲料の製造工程を示す。

酵母による発酵工程を有さないことにより、ノンアルコールビールテイスト飲料を容易に製造することができる。一般的な非発酵のノンアルコールビールテイスト飲料は、麦芽を原料として使用するものとししないものがあり、以下のように製造することができる。

[0023] 麦芽を原料として使用して製造されるノンアルコールビールテイスト飲料は、まず、麦芽等の麦の他、必要に応じて他の穀物、でんぷん、糖類、苦味料

、又は着色料などの原料及び水を含む混合物に、必要に応じてアミラーゼなどの酵素を添加し、糊化、糖化を行なわせ、ろ過し、糖化液とする。必要に応じてホップや苦味料などを糖化液に加えて煮沸し、清澄タンクにて凝固タンパク質などの固形分を取り除く。この糖化液の代替として、麦芽エキスを温水を加えたものにホップを加えて煮沸してもよい。ホップは煮沸開始から煮沸終了前のどの段階で混合してもよい。糖化工程、煮沸工程、固形分除去工程などにおける条件は、知られている条件を用いればよい。煮沸後、得られた麦汁を濾過し、得られた濾過液に炭酸ガスを加える。その後、容器に充填し殺菌工程を経て目的のノンアルコールビールテイスト飲料を得る。上記各工程において糖修飾タンパク質を添加する場合は、充填までのどの工程で行ってもよい。

[0024] 麦芽を原料として使用しないノンアルコールビールテイスト飲料を製造する場合には、まず、炭素源を含有する液糖、麦又は麦芽以外のアミノ酸含有材料としての窒素源、ホップ、色素等を、温水と共に混合し、液糖溶液とする。該液糖溶液は、煮沸する。原料としてホップを用いる場合、ホップは煮沸開始前ではなく、煮沸中に、該液糖溶液に混合してもよい。煮沸後の液糖溶液に対して、炭酸ガスを加える。その後、容器に充填し殺菌工程を経て目的のノンアルコールビールテイスト飲料を得る。上記各工程において糖修飾タンパク質を添加する場合は、充填までのどの工程で行ってもよい。

[0025] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料に、酒感を付与する観点から、脂肪族アルコールを添加してもよい。脂肪族アルコールとしては、公知のものであれば特に制限されないが、炭素数4～5の脂肪族アルコールが好ましい。本発明において、好ましい脂肪族アルコールとしては、炭素数4のものとして、2-メチル-1-プロパノール、1-ブタノール等が、炭素数5のものとして、3-メチル-1-ブタノール、1-ペンタノール、2-ペンタノール等が挙げられる。これらは1種又は2種以上の組み合わせで用いることができる。

炭素数4～5の脂肪族アルコールの含有量は好ましくは0.0002～0.

0.007質量%であり、より好ましくは0.0003～0.0006質量%である。本明細書において、脂肪族アルコールの含有量は、ヘッドスペースガスクロマトグラフ法を用いて測定することができる。

[0026] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料については、近年の低カロリー嗜好に合わせて、低カロリーであることが望ましい。従って、本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料のカロリー数は、好ましくは5 kcal / 100 mL未満、より好ましくは4 kcal / 100 mL未満、更に好ましくは3 kcal / 100 mL未満である。

[0027] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料に含まれるカロリー数は、基本的に健康増進法に関連して公表されている「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」に従って算出する。すなわち、原則として、定量した各種栄養成分の量に、それぞれの成分のエネルギー換算係数（タンパク質：4 kcal / g、脂質：9 kcal / g、糖質：4 kcal / g、食物繊維：2 kcal / g、アルコール：7 kcal / g、有機酸：3 kcal / g）を乗じたものの総和として算出することができる。詳細は、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」を参照されたい。

[0028] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料に含まれる各栄養成分量の具体的な測定手法は、健康増進法「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」に記載の各種分析法に従えばよい。または、財団法人日本食品分析センターに依頼すれば、このような熱量及び／又は各栄養成分量を知ることができる。

[0029] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料に含まれる糖質とは、食品の栄養表示基準（平成15年厚生労働省告示第176号）に基づく糖質をいう。具体的には、糖質は、食品から、タンパク質、脂質、食物繊維、灰分、アルコール分及び水分を除いたものをいう。また、食品中の糖質の量は、当該食品の重量から、タンパク質、脂質、食物繊維、灰分及び水分の量を控除することにより算定される。この場合に、タンパク質、脂質、食物繊維、灰分及び水分の量は、栄養表示基準に掲げる方法により測定する。具体的に

は、タンパク質の量は窒素定量換算法で測定し、脂質の量はエーテル抽出法、クロロホルム・メタノール混液抽出法、ゲルベル法、酸分解法またはレーゼゴットリーブ法で測定し、食物繊維の量は高速液体クロマトグラフ法またはプロスキー法で測定し、灰分の量は酢酸マグネシウム添加灰化法、直接灰化法または硫酸添加灰化法で測定し、水分の量はカールフィッシャー法、乾燥助剤法、減圧過熱乾燥法、常圧加熱乾燥法またはプラスチックフィルム法で測定する。

- [0030] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料は、近年の低糖質嗜好に合わせて、低糖質であってもよい。従って、本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料の糖質の含有量は、 $2.5\text{ g}/100\text{ mL}$ 未満であってもよく、 $0.5\text{ g}/100\text{ mL}$ 未満であってもよい。また、下限は特に設定されないが、通常、 $0.1\text{ g}/100\text{ mL}$ 程度であり、例えば、 $0.15\text{ g}/100\text{ mL}$ 以上であっても、 $0.2\text{ g}/100\text{ mL}$ 以上であってもよい。
- [0031] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料は、酸味料を含んでいてもよい。酸味料としては、クエン酸、乳酸、リン酸、及びリンゴ酸からなる群より選ばれる1種以上の酸を用いることが好ましい。また、本発明においては、上記酸以外の酸として、コハク酸、酒石酸、フマル酸および氷酢酸等も用いることができる。これらは食品に添加することが認められているものであれば制限なく用いることができる。本発明においては、まろやかな酸味を適切に付与する観点から乳酸と、やや刺激感のある酸味を適切に付与する観点からリン酸との組み合わせを用いることが好ましい。
- [0032] 酸味料の含有量は、本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料中、クエン酸換算で、ビールテイスト感の付与の観点から、 200 ppm 以上が好ましく、 550 ppm 以上がより好ましく、 700 ppm 以上がさらに好ましく、また、酸味の観点から、 15000 ppm 以下が好ましく、 5500 ppm 以下がより好ましく、 2000 ppm 以下がさらに好ましい。従って、本発明において、酸味料の含有量は、クエン酸換算で、好ましくは $200\text{ ppm}\sim 15000\text{ ppm}$ 、より好ましくは $550\text{ ppm}\sim 5500\text{ ppm}$

m、さらに好ましくは700ppm～2000ppmなどの好適範囲が挙げられる。なお、本明細書において、クエン酸換算量とは、クエン酸の酸味度を基準として各酸味料の酸味度から換算される量のことであり、例えば、乳酸100ppmに相当するクエン酸換算量は120ppm、リン酸100ppmに相当するクエン酸換算量は200ppm、リンゴ酸100ppmに相当するクエン酸換算量は125ppmとして換算する。

[0033] ノンアルコールビールテイスト飲料中の酸味料の含有量については、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等により分析して算出されたものを指す。

[0034] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料においては、原料の一部にホップを用いることができる。

ホップを使用する際には、ビール等の製造に使用される通常のペレットホップ、粉末ホップ、ホップエキスを、所望の香味に応じて適宜選択して使用することができる。また、イソ化ホップ、還元ホップなどのホップ加工品を用いてもよい。本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料に使用されるホップには、これらのものが包含される。また、ホップの添加量は特に限定されないが、典型的には、飲料全量に対して0.0001～1重量%程度である。

[0035] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料は、本発明の効果を妨げない範囲で、必要に応じて、その他の原料を用いてもよい。例えば、甘味料（高甘味度甘味料を含む）、苦味料、香料、酵母エキス、カラメル色素などの着色料、大豆サポニンやキラヤサポニン等の植物抽出サポニン系物質、コーンや大豆などの植物タンパク質およびペプチド含有物、ウシ血清アルブミン等のタンパク質系物質、食物繊維やアミノ酸などの調味料、アスコルビン酸等の酸化防止剤を、本発明の効果を妨げない範囲で必要に応じて用いることができる。

[0036] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料のpHは、飲料の風味を良好にする観点から、3.0～5.0が好ましく、3.5～4.5がより好

ましく、さらに好ましくは3.5～4.0である。

[0037] 本発明にかかるノンアルコールビールテイスト飲料は、容器詰めとすることができる。容器の形態は何ら制限されず、ビン、缶、樽、またはペットボトル等の密封容器に充填して、容器入り飲料とすることができる。

[0038] 本発明のコク味増強剤は、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量35～50kDaの糖修飾タンパク質を含む、アルコール度数が1.0%未満であるノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強剤である。

また、本発明の酸味増強剤は、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量35～50kDaの糖修飾タンパク質を含む、アルコール度数が1.0%未満であるノンアルコールビールテイスト飲料の酸味低減剤である。

穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた、分子量35～50kDaの糖修飾タンパク質を含む剤は、ノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強剤及び酸味低減剤として同時に機能する剤とすることができる。

以下、ノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強剤及び酸味低減剤についてまとめて説明する。

[0039] 本発明のコク味増強剤及び酸味低減剤は、ノンアルコールビールテイスト飲料のコク味を増強するため及び／又は酸味を低減するために用いられる、糖修飾タンパク質そのもの又は糖修飾タンパク質を含む組成物である。

糖修飾タンパク質は、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた分子量35～50kDaのタンパク質であり、その詳細は上述した通りである。

コク味増強剤及び酸味低減剤が糖修飾タンパク質を含む組成物である場合、本発明の効果を阻害しない限りにおいて、飲料に添加することのできる公知の添加剤が任意に含まれていてもよい。

[0040] 本発明のコク味増強剤及び酸味低減剤に含まれる糖修飾タンパク質における

、グリケーションされたリジンの含有量は、糖修飾タンパク質 1 μg あたりのグリケーションされたリジンの含有量 (nmol) として、0.04 $\text{nmol}/\mu\text{g}$ 以上であることが好ましく、0.4 $\text{nmol}/\mu\text{g}$ 以上であることがより好ましい。

このような糖修飾タンパク質は、糖修飾タンパク質中においてグリケーションされたリジンの含有量が多いので、少量の使用でノンアルコールビールテイスト飲料のkokumiを増強することができるkokumi増強剤、又は、酸味を低減するための酸味低減剤として使用することができる。

[0041] 本発明のkokumi増強剤及び酸味低減剤は、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた分子量 35～50 kDa の糖修飾タンパク質を多く含む、北米産麦芽から醸造したビールから精製することによって得ることができる。

また、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた分子量 35～50 kDa の糖修飾タンパク質を含む麦芽又は大麦から精製することによって得ることもできる。

また、マッシングにより、リジンのアミノ基がグリケーションされた分子量 35～50 kDa の糖修飾タンパク質を多く含むようにタンパク質を抽出するようにしてもよい。

[0042] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料の製造方法は、特に限定されるものではないが、アルコール度数が 1.0%未満であるノンアルコールビールテイスト飲料に、分子量 35～50 kDa の糖修飾タンパク質を添加する工程を有する製造方法が例示される。

より具体的には、アルコール度数が 1.0%未満であるノンアルコールビールテイスト飲料に、穀類由来タンパク質を構成するリジンのアミノ基がグリケーションされた分子量 35～50 kDa の糖修飾タンパク質を添加することにより、kokumiが増強された及び／又は酸味が低減されたノンアルコールビールテイスト飲料を得る方法が挙げられる。

当該方法によるノンアルコールビールテイスト飲料の製造方法は、本発明の

ノンアルコールビールテイスト飲料のコク味増強方法及びノンアルコールビールテイスト飲料の酸味低減方法でもある。

- [0043] ノンアルコールビールテイスト飲料に対してコク味増強剤又は酸味低減剤を添加する場合、コク味増強剤及び酸味低減剤の添加量は、コク味増強の観点からは糖修飾タンパク質が有する、グリケーションされたリジンの含有量が、 9.4 nmol/mL 以上となるようにすることが好ましく、酸味低減の観点からは糖修飾タンパク質が有する、グリケーションされたリジンの含有量が、 4.7 nmol/mL 以上となるようにすることが好ましい。

また、糖修飾タンパク質が有する、グリケーションされたリジンの含有量が、 50.0 nmol/mL 以上となるようにすることも好ましく、 80.0 nmol/mL 以上となるようにすることも好ましく、 100 nmol/mL 以上となるようにすることも好ましい。

この場合、コク味増強剤及び酸味低減剤の添加量は、コク味増強の観点からは糖修飾タンパク質の量として $5 \mu\text{g/mL}$ 以上となるようにすることが好ましく、酸味低減の観点からは糖修飾タンパク質の量として $10 \mu\text{g/mL}$ 以上となるようにすることが好ましい。

実施例

- [0044] (ビール由来の糖修飾タンパク質の精製)

北米産麦芽を適当な粒度に粉砕し仕込み槽に入れた後、温水と混ぜ合わせた。麦芽酵素に適した温度で、糖化に十分な時間保持し、麦芽の酵素の働きででんぷん質を糖分に変換させ、糖化液を製造した。その後、糖化液をろ過してホップを加え、煮沸し、熱麦汁を製造し、発酵に備えた。熱麦汁を冷却し、これにビール酵母を加えた。数日の間に酵母の働きにより、麦汁中の糖分をアルコールと炭酸ガスに分解させ若ビールを製造した。若ビールを貯酒タンクに移し、低温で数十日間貯蔵した。この間にビールを熟成させ、ビールの味と香りを調和させた。熟成終了後、ビールをろ過し瓶詰を行った。上記の方法で北米産麦芽から醸造したビールから、下記に従い糖修飾タンパク質の精製を行った。

(1) 陽イオン交換樹脂による分画

陽イオン交換樹脂 SP Sepharose 50 mL を空きカラムに入れた。北米産麦芽から醸造したビールを樹脂に吸着させた。その後、樹脂をカラムに移し替え、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で洗浄した。次いで、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) + 0.5 M-NaCl で溶出し画分を集めた。得られた画分を SDS-PAGE で評価し、40 kDa の糖修飾タンパク質が含まれる画分を集め陽イオン交換樹脂結合画分とした。

(2) 限外濾過 (バッファー交換)

水洗浄した限外ろ過ユニット (Merck 製 Amicon Ultra-15 30K) に (1) で得た陽イオン交換樹脂結合画分を添加し、3500 rpm で遠心し限外ろ過し濃縮液を得た。

(3) 硫酸分画

(2) で得た濃縮液を、20 mM リン酸バッファー (pH 7.0) + 2 M 硫酸アンモニウムをビーカーに入れ濃縮液を滴下、攪拌した。次に懸濁液を遠心 (2330 g、10 分間、室温) した。上清を別容器に集めた。集めた溶液は限外ろ過ユニットを用いて濃縮した。濃縮液を 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) に加え遠心 (2330 g、10 分間、室温) し、濃縮を行い、糖修飾タンパク質精製品 (Bradford 定量 (ウシ血清アルブミン (BSA) 換算)、20.4 mg/mL、2.21 mL) を得た。得られた糖修飾タンパク質精製品の純度は SDS-PAGE で確認した。

[0045] (糖修飾タンパク質の修飾解析)

(1) ゲル片の調製

精製した糖修飾タンパク質溶液 (濃度 1 mg/mL、20 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.5)) 10 μ L を SDS-PAGE で泳動し CBB (クマシーブリリアントブルー) で染色後、40 kDa 付近の糖修飾タンパク質のゲルを切り出した。

[0046] (2) タンパク質の酵素消化

切り出したゲル片を細切し、ジチオスレイトールによる還元（56℃、1時間）、ヨードアセトアミドによるカルバミドメチル化（遮光下、室温、45分間）を行った。次いで0.01%ProteaseMax含有10ng/μLキモトリプシン溶液（5mM塩化カルシウム、50mM炭酸水素アンモニウム溶液）15μL、5mM塩化カルシウム、50mM炭酸水素アンモニウム溶液15μLを添加し一晩インキュベートした後、酵素消化液を回収した。回収した溶液を減圧乾固し、0.1%ギ酸溶液に再溶解した。

[0047] (3) LC-MS/MSによる測定

LC-MS/MSの測定は下記の条件で行った。

使用装置：ダイレクトフローnanoLCシステムEasy-nLC 1000TM (Thermo Scientific)

トラップカラム：Acclaim PepMap（登録商標）(Thermo Scientific)

分析カラム：NANO HPLC CAPILLARY COLUMN (日京テクノス(株))

液体クロマトグラフ質量分析計：Q Exactive Plus (Thermo Scientific)

移動相：A液：0.1%ギ酸/水、B液：0.1%ギ酸/アセトニトリル

流速：300nL/min

グラジエント：0-40%B/0-30min、40-60%B/30-35min、60-90%B/35-37min、90%B/37-45min

注入量：10μL

イオン化モード：ESI Positive

測定範囲：MS1 (m/z 350-1750)

Data Dependent Scanモード

[0048] (4) タンパク質および修飾解析

タンパク質同定および修飾検索は下記の条件で行った。

検索ソフト: Proteome Discoverer 2.2.0.388
(ThermoFisher製)

生物種: 大麦 (Hordeum vulgare)、ホップ (Humulus)、酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

検索条件: 消化酵素: Chymotrypsin

修飾 (Static): Carbamidomethyl (Cysteine)

修飾 (Dynamic): Oxidation (Methionine),
Hex (K, R, Protein N-term), Hex (2)
(K, R, Protein N-term), Hex (3) (K, R,
Protein N-term), Acetyl (Protein N-term)

プリカーサーイオン質量誤差範囲: Monoisotopic、 ± 10 ppm

プロダクトイオン質量誤差範囲: ± 0.02 Da

最大ミスクリベージ数: 5

コンフィデンスレベル (Percolator): High (確からしさ3段階のうち最も確率が高いレベル)

データベース: SwissProt

[0049] 修飾解析の結果、糖修飾タンパク質のリジンのアミノ基がグリケーションされていることを確認した。

[0050] (糖修飾タンパク質の糖修飾度の評価)

精製した糖修飾タンパク質の糖修飾度は Fructosamine Assay kit (abcam社製品、ab228558) を用いて NBT 法にて比色定量した。

ビール由来精製糖修飾タンパク質の糖修飾度を求めた。

各タンパク質につき試験数は $n = 2$ として、平均値を採用した。

糖修飾タンパク質 $1 \mu\text{g}$ あたりのグリケーションされたリジンの量は、0.

94 nmol / μ g (糖修飾タンパク質)であった。

[0051] (市販ノンアルコールビールテイスト飲料中の糖修飾タンパク質の濃度測定)

市販ノンアルコールビールテイスト飲料A, Bの飲料中の糖修飾タンパク質の濃度はLabChip™ GXII装置(パーキンエルマー製)でHT Protein Expressチップを用いて、標準プロトコルに従い実施した(n=2)。その結果、市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aおよび市販ノンアルコールビールテイスト飲料B中の糖修飾タンパク質の濃度は検出できなかった。

[0052] (市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aに糖修飾タンパク質を添加した場合の酸味及びコク味評価)

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aに、ビール由来精製糖修飾タンパク質を添加し、酸味及びコク味の官能評価を行った。

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aのアルコール度数は0.00%である。

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aのプリン体濃度は5.0mg未満/100mLである。総プリン体濃度は、日本食品分析センターで分解法にて実施した(以下同様)。

官能評価は、糖修飾タンパク質の添加をしていない市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aの酸味を基準点の3.0点、コク味を基準点の0.5点とし、専門パネル5名により0.1点刻みでスコア化した。

糖修飾タンパク質の添加濃度を変化させて評価を行い、その結果を表1に示した。

酸味及びコク味は以下の基準とした。

0点: 全く感じられない

1点: やや感じられる

2点: 明確に感じる

3点: 非常に強く感じる

表1には、ノンアルコールビールテイスト飲料における、糖修飾タンパク質

が有するグリケーションされたリジンの含有量 (nmol/mL) を示している。

[0053] [表1]

	糖修飾タンパク質の添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)						
	添加なし	5	10	15	20	25	50
グリケーションされたリジンのビール テイストアルコール飲料中濃度 (nmol/mL)	0.0	4.7	9.4	14.1	18.8	23.5	47.0
酸味強度 (点)	3.0	2.84	2.64	2.48	2.30	2.20	1.96
コク味強度 (点)	0.5	0.5	0.52	0.56	0.64	0.68	0.84
Δ 酸味強度 (点)	-	-0.16	-0.36	-0.52	-0.70	-0.80	-1.04
Δ コク味強度 (点)	-	0	0.02	0.06	0.14	0.18	0.34

[0054] 表1に示す結果から、ノンアルコールビールテイスト飲料に対して糖修飾タンパク質を添加して、グリケーションされたリジンの含有量を増加させることによって、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味を低減し、コク味を増強できることが分かる。

[0055] (市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aにアルコールを加え、さらに糖修飾タンパク質を添加した場合の酸味及びコク味評価)

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aに、エタノールを加え、アルコール度数が0.999%となるようにした。さらにビール由来精製糖修飾タンパク質を添加し、酸味及びコク味の官能評価を行った。

この場合もアルコール度数は1.0%未満であるので、飲料としてはノンアルコールビールテイスト飲料である。

官能評価は、市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aにビール由来糖修飾タンパク質を添加した場合の評価と同様にした。

表2には、ノンアルコールビールテイスト飲料における、糖修飾タンパク質が有するグリケーションされたリジンの含有量(nmol/mL)を示している。

[0056] [表2]

	糖修飾タンパク質の添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)		
	添加なし	25	50
グリケーションされたリジンのビールテイストアルコール飲料中濃度 (nmol/mL)	0.0	23.5	47.0
酸味強度(点)	2.7	2.1	1.72
コク味強度 (点)	0.6	0.8	0.94
Δ 酸味強度 (点)	-	-0.6	-0.98
Δ コク味強度 (点)	-	0.2	0.34

[0057] 表2に示す結果から、アルコール度数が0.999%であるノンアルコールビールテイスト飲料に対して糖修飾タンパク質を添加して、グリケーションされたリジンの含有量を増加させることによって、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味を低減し、コク味を増強できることが分かる。

[0058] (市販ノンアルコールビールテイスト飲料Bに糖修飾タンパク質を添加した

場合の酸味及びコク味評価)

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Bに、ビール由来精製糖修飾タンパク質を添加し、酸味及びコク味の官能評価を行った。

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Bのアルコール度数は0.00%である。

市販ノンアルコールビールテイスト飲料Bのプリン体濃度は5.0mg未満/100mLである。

官能評価は、糖修飾タンパク質の添加をしていない市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aの酸味を基準点の3.0点、コク味を基準点の0.5点とし、専門パネル5名により0.1点刻みでスコア化した。

糖修飾タンパク質の添加濃度を変化させて評価を行い、その結果を表3に示した。

酸味及びコク味は以下の基準とした。

0点：全く感じられない

1点：やや感じられる

2点：明確に感じる

3点：非常に強く感じる

4点：市販ノンアルコールビールテイスト飲料Aよりも強く感じる

表3には、ノンアルコールビールテイスト飲料における、糖修飾タンパク質が有するグリケーションされたリジンの含有量(nmol/mL)を示している。

[0059]

[表3]

	糖修飾タンパク質の添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	添加なし	25	50
グリケーションされたリジンのビールテイストアルコール飲料中濃度 (nmol/mL)	0.0	23.5	47.0
酸味強度(点)	3.6	3.2	2.8
コク味強度 (点)	0.4	0.5	0.6
Δ 酸味強度 (点)	-	-0.4	-0.8
Δ コク味強度 (点)	-	0.1	0.2

[0060] 表3に示す結果から、異なる種類のノンアルコールビールテイスト飲料に対しても、糖修飾タンパク質を添加して、グリケーションされたリジンの含有量を増加させることによって、ノンアルコールビールテイスト飲料の酸味を低減し、コク味を増強できることが分かる。

産業上の利用可能性

[0061] 本発明によれば、穀類由来原料を用いてコク味が強く、酸味が低減されたノンアルコールビールテイスト飲料を提供することができる。