

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年1月6日(06.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/004725 A1

- (51) 国際特許分類:
A23L 2/00 (2006.01) *A23L 2/52* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/024565
- (22) 国際出願日: 2021年6月29日(29.06.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-114432 2020年7月1日(01.07.2020) JP
- (71) 出願人: サントリーホールディングス株式会社(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目1番40号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 高木 理沙(TAKAGI, Risa); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 首藤 菜子(SUDO, Saiko); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 岩佐 恵子(IWASA, Keiko); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 小沢 正晃(OZAWA, Masaaki); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 神田 直人(KANDA, Naoto); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 松尾 嘉英(MATSUO, Yoshihide); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所(YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: NON-ALCOHOLIC BEER-FLAVORED BEVERAGE

(54) 発明の名称: ノンアルコールビールテイスト飲料

(57) Abstract: An objective of the present invention is to provide a beverage with an enhanced richness, and in particular, a non-alcoholic beer-flavored beverage with an enhanced richness. The present invention relates to a non-alcoholic beer-flavored beverage having a 2'-deoxyadenosine concentration of 1 ppm or more.

(57) 要約: 本発明は、ふくらみが増強された飲料、特に、ふくらみが増強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。本発明は、2'-デオキシアデノシンの濃度が1 ppm以上であるノンアルコールビールテイスト飲料に関する。



WO 2022/004725 A1

明 細 書

発明の名称： ノンアルコールビールテイスト飲料

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] 特許文献1には、ビールテイスト飲料の香味を改善するために、特定の分子量のペプチドを含有させることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2016-149975号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1では、飲料の評価指標として、ビールらしい味わい、スムーズな味の流れ、口内に残るざらつき、といった指標を用いており、10-20kDaのペプチドを所定濃度含有することにより、これらの指標に基づく官能評価スコアが高い飲料が得られることが記載されている。

[0006] ここで、ビールテイスト飲料を飲んだ直後から感じられる味覚として、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、味の強さ、広がり、厚み、味が持続する又は味の強さのバランスがとれているという特徴が好まれることがある。このような特徴を本明細書中では「ふくらみ」という。

特許文献1に記載された飲料は、ふくらみの観点からはさらに改良の余地がある飲料であるといえ、ふくらみを増強する方法が望まれていた。

[0007] 本発明は、ふくらみが増強された飲料を提供することを目的とする。特に、ふくらみが増強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。ノンアルコールビールテイスト飲料は、ふくらみが乏しい傾向があるために、ふくらみを増強することが特に望まれる飲料である。

課題を解決するための手段

[0008] 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に関する。

〔１〕 ２’-デオキシアデノシンの濃度が 1 p p m 以上であるノンアルコールビールテイスト飲料。

〔２〕 ２’-デオキシアデノシンの濃度が 1 ～ 1 0 p p m 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〕 さらに、分子量 3 5 ～ 5 0 k D a のタンパク質を含み、前記タンパク質の濃度が 5 p p m 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〕 上記タンパク質の濃度が 3 0 p p m 以下である上記〔３〕に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、ふくらみが増強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。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、原料に麦芽を含むものであってもよく、原料に麦芽を含まないもの（原料中の麦芽比率が 0 重量%のもの）であってもよい。

ここでいう原料とは、水とホップ以外の穀物原料及び糖類を意味する。

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原料には含めない。

原料に麦芽を含む場合、原料として麦芽の他、米、トウモロコシ、コウリヤン、バレイショ、デンプン、麦芽以外の麦を含んでいてもよい。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. 0 1 ～ 2 0. 0 重量%である。

[0011] 「原料に麦芽を含まない」とは、麦芽、米、トウモロコシ、コウリヤン、バ

レイショ、デンプン、マメ類などの植物タンパク質、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が0であることをいう。

原料に麦芽を含まない場合、原料としては大豆タンパク分解物を主に含むことが好ましい。

また、原料に麦芽を含まない場合、後述する分子量35～50 kDaのタンパク質が麦芽由来のタンパク質であっても、これを使用することは許容される。

[0012] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、脱アルコールビールテイスト飲料でないことが好ましい。脱アルコールビールテイスト飲料とは、ビールテイストアルコール飲料からアルコールを除去して製造されたノンアルコールビールテイスト飲料である。

[0013] 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包含される。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、エタノール以外の脂肪族アルコールの含有量は含まれない。

[0014] 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。

[0015] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料は、2'-デオキシアデノシンを含む。2'-デオキシアデノシンは、デオキシリボヌクレオシドの一種である。本明細書中、2'-デオキシアデノシンを2' DAと表記することがある。

[0016] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料では、2'-デオキシアデノシンの濃度が1 ppm以上である。

2'-デオキシアデノシンの濃度が1 ppm以上であると、ノンアルコールビールテイスト飲料におけるふくらみを増強することができる。2'-デオキシアデノシンを所定濃度以上含有することとノンアルコールビールテイスト飲料におけるふくらみが関連することは、これまで知られておらず、本発明者らが見出した知見である。

[0017] 本発明のノンアルコールビールテイスト飲料では、2'-デオキシアデノシンの濃度が10 ppm以下であることが好ましい。

本発明のノンアルコールビールテイスト飲料では、2'-デオキシアデノシンの濃度は、好ましくは2 ppm以上、より好ましくは6 ppm以上である。

一態様において、ノンアルコールビールテイスト飲料中の2'-デオキシアデノシンの濃度は、1～10 ppmが好ましく、2～10 ppmがより好ましく、6～10 ppmがさらに好ましい。

[0018] また、本発明のノンアルコールビールテイスト飲料では、さらに、分子量35～50 kDaのタンパク質を含み、上記タンパク質の濃度が5 ppm以上

であることが好ましい。

[0019] 分子量35～50kDaのタンパク質は、ノンアルコールビールテイスト飲料をSDS-PAGEによる電気泳動に供した場合に分子量が35～50kDaの領域にみられるタンパク質である。ノンアルコールビールテイスト飲料をSDS-PAGEによる電気泳動に供する前に、例えば、前処理としてノンアルコールビールテイスト飲料に対して30kDaのカットオフ膜を用いて限外濾過を行ってもよい。

上記タンパク質は、好ましくは分子量が35～45kDaのタンパク質であり、より好ましくは約40kDaのタンパク質である。本明細書では分子量35～50kDaのタンパク質を40kDaタンパク質ともいう。

[0020] 40kDaタンパク質は、穀類由来タンパク質であることが好ましい。

上記穀類は、大麦、小麦、トウモロコシ、イネ、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含有していてもよい。

[0021] また、40kDaタンパク質として、大麦（学名：Hordeum vulgare）由来のSerpine Z4（別名：BSZ4、Horvuz4、Major endosperm albumin又はProtein Z）、大麦由来Serpine Z7（別名：BSZ7又はHorvuz7）が好ましい。また、上記タンパク質において、そのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

[0022] 2'-デオキシアデノシンに加えて40kDaタンパク質をさらに含有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におけるふくらみをさ

らに増強させることができる。

また、40 kDa タンパク質の濃度は30 ppm以下であることが好ましい。

[0023] また、2'-デオキシアデノシンと40 kDa タンパク質をともに含有する場合には、2'-デオキシアデノシンと40 kDa タンパク質の相乗効果によりノンアルコールビールテイスト飲料のふくらみを効果的に増強させることができる。

[0024] 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。

[0025] 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を製造する場合には、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。

[0026] 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。

[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、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0.0002～0.0007重量%であり、より好ましくは0.0003～0.0006重量%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。

[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。

[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。

[0030] 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。

[0031] 本発明に係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。

[0032] 本発明に係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、本発明に係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、2.5g/100mL未満であってもよく、0.5g/100mL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、0.1g/100mL程度であり、例えば、0.15g/100mL以上であっても、0.2g/100mL以上であってもよい。

[0033] 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。

[0034] 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、200ppm以上が好ましく、550ppm以上がより好ましく、700ppm以上がさらに好ましく、また、酸味の観点から、15000ppm以下が好ましく、5500ppm以下がより好ましく、2000ppm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、200ppm～15000ppm、好ましくは550ppm～5500ppm、より好ましくは700ppm～1500ppm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。

[0035] 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。

[0036] 本発明に係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。本発明に係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。

[0037] 本発明に係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。

[0038] 本発明に係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。

[0039] 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、ノンアルコールビールテイスト飲料に対して、2'-デオキシアデノシンを所定量添加する方法が例示される。

また、ノンアルコールビールテイスト飲料に対して、40kDaタンパク質を添加することが好ましい。

添加する2'-デオキシアデノシン及び40kDaタンパク質の調製は例えば後述する実施例に記載の手順で行うことができる。

また、2'-デオキシアデノシン及び40kDaタンパク質については、ノンアルコールビールテイスト飲料の製造過程における諸条件を調整することによって、これらの含有量が増えるようにしてもよい。

実施例

[0040] 以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。

[0041] （2'-デオキシアデノシンの精製）

下記に従い2'-デオキシアデノシン（2'-DA）の精製を行った。

（1）ビールのHP20による分画

60Lのビールを、10Lのダイヤイオン（登録商標）HP20（三菱ケミ

カル株式会社製）を用いて分画した。HP20は使用前に、エタノールにより3回洗浄し、次いで50%エタノールにより3回洗浄した。洗浄したHP20を大量分画用カラムへ充填し、水により置換した。脱気させた60Lのビールへ同量の蒸留水を混合し、中圧ポンプを用いてHP20カラムへ流した。HP20カラムを素通りした溶液を素通り画分として得た。中圧ポンプを用いて40Lの蒸留水を流し、溶出液を水溶出画分として得た。同様に、含水エタノール（10%エタノール、30%エタノール、および70%エタノール）を40Lずつ流し、溶出液をそれぞれ10%エタノール溶出画分、30%エタノール溶出画分、および70%エタノール溶出画分として得た。それぞれの溶出画分は、エバポレーターおよび凍結乾燥機を用いて、乾燥体として冷蔵保存した。

[0042] (2) 30%エタノール溶出画分のLH-20分画

HP20分画物のうち、30%エタノール溶出画分について、1.2kgのSephadex（登録商標）LH-20を用いて分画した。エタノールにより洗浄したLH-20を大量分画用カラムへ充填し、水により置換した。HP20分画により得られた30%エタノール溶出画分（87.9g）のうち、17.6gを蒸留水に溶解させ、LH-20カラムへアプライした。中圧ポンプを用いて13.5Lの蒸留水を流し、水溶出画分-1～6を得た。次いで、含水エタノール（35%エタノール、70%エタノール、および100%エタノール）を7Lずつ流し、溶出液をそれぞれ35%エタノール溶出画分、70%エタノール溶出画分、および100%エタノール溶出画分として得た。それぞれの溶出画分は、エバポレーターおよび凍結乾燥機を用いて、乾燥体として冷蔵保存した。

[0043] (3) 2' DAの分離

LH-20分画により得られた水溶出画分-4（0.56g）のうち86.4mgについて、HPLC（COSMOSIL 5C18-PAQ, 20×250mm）を用いて、10%エタノールにより溶出させた。次いで、10minから13minの溶出液を濃縮し、HPLC（COSMOSIL 5

C18-PAQ, 20×250mm) を用いて、エタノール-水 (5 : 95 → 15 : 85) の濃度勾配の混液により溶出させ、化合物 (1) (0.5 mg, $t_R = 21 \text{ min}$) を得た。

化合物 (1) は、MS、NMR の物理学的データの解析および標品との比較により 2'-デオキシアデノシンであると同定した。

使用した分析機器は以下の通りである。

LC-MS ; Q Exactive, Thermo Fisher Scientific 社製

NMR ; AVANCE 400, Bruker 社製

[0044] (40 kDa タンパク質の精製)

市販のビール (1 L) から下記に従い 40 kDa タンパク質の精製を行った。

[0045] (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。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。

[0046] (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 10 mL ずつ添加し、3500 rpm で遠心し限外ろ過し濃縮液を得た。

[0047] (3) 硫酸分画

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、(2) で得た濃縮液を滴下、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 (2330g、10分間、室温) し、濃縮を行い、40kDaタンパク質精製品 (Bradford定量 (ウシ血清アルブミン (BSA) 換算)、20.4mg/mL、2.21mL) を得た。得られた40kDaタンパク質の純度はSDS-PAGEで確認した。

[0048] 40kDaタンパク質を酵素で消化後、LC-MS/MSで分析することにより、タンパク質の同定を試みた。

SDS-PAGEで分離した40kDa付近のバンドを切り出し、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。

これをLC-MS/MS分析に使用した。

[0049] (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：Accclaim 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/30-3

5 min、60–90%B／35–37 min、90%B／37–45 min

注入量：10 μ L

イオン化モード：ESI Positive

測定範囲：MS1 (m/z 350–1750)

Data Dependent Scanモード

[0050] (4) タンパク質の解析

タンパク質同定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

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

[0051] その結果、40 kDaタンパク質は大麦由来Serpin Z4 (配列カバー率：77.2%) 及び大麦由来Serpin Z7 (配列カバー率：72.8%) であることがわかった。

[0052] (市販のノンアルコールビールテイスト飲料に2' DAを添加した場合の官能評価)

市販のノンアルコールビールテイスト飲料に、2' -デオキシアデノシン (2' DA) を添加し、ふくらみの官能評価を行った。

当該ノンアルコールビールテイスト飲料は、原料に麦芽を含むノンアルコール

ルビールテイスト飲料である。

原材料は麦芽、ホップ、炭酸、香料、酸味料、カラメル色素、ビタミンC、苦味料、甘味料であり、栄養成分として100mlあたりアルコール分0%、タンパク質0g、糖質0g、食物繊維0~0.1g、プリン体約0mgを含む。

[0053] 官能評価の基準点は以下の通りである。

専門パネル5名により0.05点刻みで下記の基準によりスコア化、そのスコア値を平均化した。

ふくらみ強度は以下の基準である。

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：非常に感じる

基準点として、評価対象とする上記市販のノンアルコールビールテイスト飲料とは異なる市販のビールテイストアルコール飲料を基準のビールテイストアルコール飲料(Ⅰ)としてふくらみを0.7点とした。また、他の市販のビールテイストアルコール飲料を基準のビールテイストアルコール飲料(ⅠⅠ)としてそのふくらみを基準点の1.5点とした。また、上記の市販のビールテイストアルコール飲料(Ⅰ)及び(ⅠⅠ)のふくらみを基準として、評価対象とする上記市販のノンアルコールビールテイスト飲料のふくらみを0.5点とした。

当該基準のビールテイストアルコール飲料(Ⅰ)は原料中の麦芽の比率が0重量%を超え、50重量%未満であるビールテイストアルコール飲料である。

原材料は発泡酒、麦芽、ホップ、糖類、食物繊維、スピリッツ(小麦)であり、栄養成分として100mlあたりアルコール分4%、タンパク質0~0.2g、糖質0.5~0.8g、プリン体約2.0mgを含む。

当該基準のビールテイストアルコール飲料(ⅠⅠ)は原料中の麦芽の比率が

50重量%以上であるビールテイストアルコール飲料である。

原材料は麦芽、ホップであり、栄養成分として100mlあたりアルコール分5.5%、タンパク質0.4~0.6g、糖質3.6g、プリン体約12.5mgを含む。

[0054] 官能評価の手順は以下の通りである。

- (1) ノンアルコールビールテイスト飲料を最終容量の1/10容量(v/v)バイアル瓶に分注する
- (2) 2' DAを任意の重量で秤量して加える
- (3) 30秒ソニケーションする
- (4) 30分室温で静置する
- (5) ノンアルコールビールテイスト飲料を最終容量にフィルアップする
- (6) 分注して飲み込み評価する

[0055] (市販のノンアルコールビールテイスト飲料の分析)

官能評価に使用した市販のノンアルコールビールテイスト飲料に含まれる2' DAの濃度を以下の手順によりLC-MSで定量した。

- (1) 標品の調製及び検量線の作成
- 2' DAについて、それぞれ下記の濃度となるように希釈し、0.22μmのフィルターに通してから測定に供した。
- 最終濃度：0.001ppm, 0.025ppm, 0.050ppm, 0.100ppm, 0.200ppm, 0.300ppm, 0.500ppm, 0.750ppm, 1.000ppm
- (1ppm=1μg/mLである)

希釈液には、5%(v/v)のエタノール水溶液を用いた。

なお、標品の分析結果において、検量線の直線性が保たれる範囲($R^2 > 0.99$)に測定値が入るような希釈倍率の測定値を採用した。

[0056] LC-MSの測定条件は以下の通りである。

LC-MS：エービー・サイエックス社製X500R

分離カラム：Waters社製 HSS T3 1.8μm, 2.1x150

mm

溶離液：

A液：0.1%ギ酸／水、B液：0.1%ギ酸／アセトニトリル

グラジエント：A液：B液＝98：2→2：98（27min）

注入量：5 μ L

流速：0.2 mL/min

カラムオーブン：40℃

(MS)

イオン化モード：ESI Positive

測定範囲：MS1 (m/z 100–1000)

Data Independent Scanモード

イオン源温度：350℃

- [0057] (2) 市販のノンアルコールビールテイスト飲料からの測定用試料の調製
市販のノンアルコールビールテイスト飲料をソニケーションにより脱気し、
気泡が落ち着いてから適宜希釈し、0.22 μ mのフィルターに通してから
測定に供した。
希釈液には、5% (v/v) のエタノール水溶液を用いた。
市販のノンアルコールビールテイスト飲料に含まれる2' DAの濃度をコン
トロールとした。

- [0058] (実施例1：2' DA添加による評価)
市販のノンアルコールビールテイスト飲料（コントロール）に含まれる2'
DAの濃度は0 ppmであった。
これに対して2' DA濃度が1 ppm、6 ppm、10 ppmにそれぞれな
るように2' DAを加えて官能評価を行った。また、市販のノンアルコール
ビールテイスト飲料に2' DA濃度が0.1 ppmとなるように2' DAを
加えて官能評価を行った（対比試料1）。
官能評価の結果を表1に示した。

- [0059]

[表1]

	コントロール	対比試料1	試料1	試料2	試料3
2'DA濃度(ppm)	0	0.1	1	6	10
パネラーA	0.50	0.50	0.60	0.65	0.70
パネラーB	0.50	0.50	0.55	0.60	0.65
パネラーC	0.50	0.55	0.65	0.75	0.80
パネラーD	0.50	0.50	0.55	0.65	0.70
パネラーE	0.50	0.50	0.60	0.70	0.80
官能評価平均	0.50	0.51	0.59	0.67	0.73

[0060] 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つき、2'DA濃度が1ppm以上であるとふくらみが増強されることが分かる。

[0061] (実施例2: 2'DAと40kDaタンパク質の相乗効果の評価)

市販のノンアルコールビールテイスト飲料(コントロール)に、2'DAを加えて2'DAの濃度を1ppmとした飲料を基準として、さらに40kDaタンパク質を加えることにより2'DAと40kDaタンパク質の相乗効果を評価した。40kDaタンパク質の濃度は5ppm、10ppmとした。40kDaタンパク質には、上記で精製したものを使用した。

また、対比のために市販のノンアルコールビールテイスト飲料に40kDaタンパク質だけを添加して40kDaタンパク質の濃度を5ppmとしての評価も行った(対比試料2)。

官能評価の結果を表2に示した。

[0062] [表2]

	コントロール	試料1	試料2	試料3	対比試料2
2'DA濃度(ppm)	0	1	1	1	0
40kDaタンパク質濃度(ppm)	0	0	5	10	5
パネラーA	0.50	0.60	0.65	0.75	0.50
パネラーB	0.50	0.55	0.55	0.70	0.50
パネラーC	0.50	0.65	0.70	0.75	0.50
パネラーD	0.50	0.55	0.70	0.80	0.50
パネラーE	0.50	0.60	0.65	0.75	0.55
官能評価平均	0.50	0.59	0.65	0.75	0.51

[0063] 表2に示す結果から、市販のノンアルコールビールテイスト飲料に、2'DAを加えてさらに40kDaタンパク質を加えることにより、ふくらみをより増強されることが分かる。

対比試料2の結果から、40kDaタンパク質を添加するだけでもふくらみを増強することができることが分かる。しかしながら、上記試料1における官能評価のコントロールからの増加値(0.09)と対比試料2における官能評価のコントロールからの増加値(0.01)の和で求められる、2'DAと40kDaタンパク質を併用したときに予測される相加効果(0.10)よりも、試料2における官能評価のコントロールからの増加値(0.15)が大きいことから、2'DAと40kDaタンパク質を併用することにより、予想できない相乗効果が発揮されているといえる。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明によれば、ノンアルコールビールテイスト飲料において、ふくらみが増強された飲料を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 2'-デオキシアデノシンの濃度が1 ppm以上であるノンアルコールビールテイスト飲料。
- [請求項2] 2'-デオキシアデノシンの濃度が1～10 ppmである請求項1に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。
- [請求項3] さらに、分子量35～50 kDaのタンパク質を含み、前記タンパク質の濃度が5 ppm以上である請求項1又は2に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。
- [請求項4] 前記タンパク質の濃度が30 ppm以下である請求項3に記載のノンアルコールビールテイスト飲料。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/024565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A23L2/00(2006.01) i, A23L2/52(2006.01) i
FI: A23L2/00B, A23L2/52

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)

Int.Cl. A23L2/00-2/84, C12C1/00-13/10, C12G3/00-3/08

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
FSTA/CAPplus/REGISTRY/AGRICOLA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN), Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SPEVACEK, A. R. et al., Beer metabolomics: molecular details of the brewing process and the differential effects of late and dry hopping on yeast purine metabolism., J. Inst. Brew., 2016, vol. 122, pp. 21-28, fig. 3B	1-4
A	WO 2019/130458 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 04 July 2019 (2019-07-04), claims, examples	1-4
A	NIU, C. et al., Malt derived proteins: effect of protein Z on beer foam stability., Food Biosci., 2018, vol. 25, pp. 21-27, fig. 4	1-4
A	JP 2016-123400 A (KIRIN CO., LTD.) 11 July 2016 (2016-07-11), claims, examples	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☒ See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 September 2021	Date of mailing of the international search report 14 September 2021
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/024565

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2020-103207 A (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 09 July 2020 (2020-07-09), claims, examples	1-4
P, A	JP 2020-103208 A (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 09 July 2020 (2020-07-09), claims, examples	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/024565

WO 2019/130458 A1 04 July 2019 (Family: none)

JP 2016-123400 A 11 July 2016 (Family: none)

JP 2020-103207 A 09 July 2020 (Family: none)

JP 2020-103208 A 09 July 2020 (Family: none)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A23L 2/00(2006.01)i; A23L 2/52(2006.01)i FI: A23L2/00 B; A23L2/52		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A23L2/00-2/84; C12C1/00-13/10; C12G3/00-3/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); FSTA/CaPlus/REGISTRY/AGRICOLA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN); Google		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	SPEVACEK A.R. et al., Beer metabolomics: molecular details of the brewing process and the differential effects of late and dry hopping on yeast purine metabolism., J. Inst. Brew., 2016, vol.122, pp.21-28 Figure 3B	1-4
A	W0 2019/130458 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 請求項、実施例	1-4
A	NIU C. et al., Malt derived proteins: effect of protein Z on beer foam stability., Food Biosci., 2018, vol.25, pp.21-27 Fig. 4	1-4
A	JP 2016-123400 A (キリン株式会社) 11.07.2016 (2016 - 07 - 11) 請求項、実施例	1-4
P, A	JP 2020-103207 A (サントリーホールディングス株式会社) 09.07.2020 (2020 - 07 - 09) 請求項、実施例	1-4
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.09.2021		国際調査報告の発送日 14.09.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 戸来 幸男 40 3964 電話番号 03-3581-1101 内線 3461

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	JP 2020-103208 A (サントリーホールディングス株式会社) 09.07.2020 (2020 - 07 - 09) 請求項、実施例	1-4

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/024565

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2019/130458	A1	04.07.2019	(ファミリーなし)	
JP	2016-123400	A	11.07.2016	(ファミリーなし)	
JP	2020-103207	A	09.07.2020	(ファミリーなし)	
JP	2020-103208	A	09.07.2020	(ファミリーなし)	