

(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
2025年1月9日(09.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/009480 A1

(51) 国際特許分類:
A23L 2/00 (2006.01) C12C 7/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023580

(22) 国際出願日: 2024年6月28日(28.06.2024)

(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 2023-109981 2023年7月4日(04.07.2023) JP

(71) 出願人: アサヒグループホールディングス株式会社(ASAHI GROUP HOLDINGS, LTD.) [JP/JP]; 〒1308602 東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 前田 聡史(MAEDA Satoshi); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP). 三好 美穂(MIYOSHI Miho); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP). 池田 由香(IKEDA Yuka); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP). ▲高▼橋 朋子(TAKAHASHI Tomoko); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーア

ンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP). 指原 浩一(SASHIHARA Koichi); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP). 楠 慧三(KUSUNOKI Keizo); 〒1308602 東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号 アサヒグループホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 叢 嘉▲こう▼(CONG Jiaheng); 〒1308602 東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号 アサヒグループホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 神田 智正(KANDA Tomomasa); 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番地21 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FERMENTED MALT LIQUID

(54) 発明の名称: 麦芽発酵液の製造方法

(57) Abstract: Provided are: a method for producing a fermented malt liquid having a low ethanol concentration and a much less unpleasant odor originating from wort; and a fermented malt beverage produced from the fermented malt liquid obtained by the production method. The present invention pertains to: a method for producing a fermented malt beverage, the method comprising a step for inoculating, with yeast, a fermentation raw material liquid containing a saccharified product of malt and fermenting the same to prepare a fermented malt liquid, wherein the yeast is RAG⁻ phenotype Kluyveromyces lactis, and the ethanol concentration per Brix 5.0 mass% of the fermented malt liquid is less than 0.05 v/v%; and a method for producing a fermented malt beverage, wherein a fermented malt liquid is produced by the method for producing a fermented liquid, and thereafter, a fermented malt beverage is produced using the obtained fermented malt liquid as a raw material.

(57) 要約: 本発明は、エタノール濃度が低く、かつ麦汁由来の不快臭が十分に少ない麦芽発酵液の製造方法、及び当該製造方法で得られた麦芽発酵液から麦芽発酵飲料を提供する。本発明は、麦芽の糖化物を含む発酵原料液に酵母を接種して発酵させて、麦芽発酵液を調製する工程を有し、前記酵母が、RAG⁻表現型クルイベロミセス・ラクチスであり、前記麦芽発酵液が、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%未満である、麦芽発酵液の製造方法、及び、前記の麦芽発酵液の製造方法により麦芽発酵液を製造した後、得られた麦芽発酵液を原料として、麦芽発酵飲料を製造する、麦芽発酵飲料の製造方法である。

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

明 細 書

発明の名称： 麦芽発酵液の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、麦芽の糖化物を発酵原料とし、エタノール濃度が低く、かつ麦汁臭が抑えられた発酵液の製造方法、及び当該製造方法により製造された発酵液を原料として含む飲料の製造方法に関する。

本願は、2023年7月4日に、日本に出願された特願2023-109981号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、アルコール飲料では、消費者の嗜好の多様化にともない、多種多様の商品が上市されている。例えば、より飲み易いことから、アルコール濃度が比較的低いアルコール飲料の需要も高まっている。一方で、発酵アルコール飲料の場合には、発酵によって、エタノールに加えて様々な香気成分が酵母により産生され、飲料の香味に寄与している。

[0003] 発酵アルコール飲料において、発酵の際に産生される各種の香気成分は、発酵に使用される酵母の種類に依存する。例えば、ビールやワインの醸造で最も広く利用されている酵母は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) であるが、近年、サッカロミセス属以外の酵母を使用することにより、従来のビール等とは異なる香味のビール等を製造することも行われている。

[0004] 例えば、ピキア・クルイベリ (*Pichia kluyveri*) 等のピキア (*Pichia*) 属の酵母を用いて麦汁を好気条件下で発酵させることにより、酢酸イソアミル (IAAT) や酢酸エチルの含有量の多いビールを製造する方法が知られている (特許文献1)。また、麦汁とホエーの混合物に、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) とクルイベロミセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*) を接種させて発酵させることにより、アルコール濃度1容量%未満の発酵飲料を製造する方法が知られている (特許文献2)。さらに、低アルコールビールの製造には、エタノール産生能が低いサッカロマイコー

デス・ルドウィギイ (*Saccharomyces ludwigii*) が、ノンアルコールビール製造用酵母として使用されてきた（非特許文献1）。

- [0005] 一方で、酵母のエタノール産生量が低い変異体も幾つか報告されている。例えば、クルイベロミセス・ラクチスにおいては、呼吸が阻害されると増殖できなくなる表現型（RAG-表現型）を持つ変異株は、YPD培地上で、野生株よりもエタノール産生量が低いことが報告されている（非特許文献2）。また、クルイベロミセス・ラクチスの野生株に変異処理を行い、呼吸阻害剤であるアンチマイシンAを含有させた培地における生育不良を指標として、RAG-表現型を持つ変異株を選抜できることも報告されている（非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2014／202564号

特許文献2：特開昭60－094077号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Bellut, et al., Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2019, DOI: 10.1080/03610470.2019.1569452

非特許文献2：Wesolowski-Louvel, et al., Molecular and General Genetics, 1992, vol.233(1-2), p.89-96.

非特許文献3：Wesolowski-Louvel, et al., Yeast, 1992, vol.8, p.711-719

.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 発酵アルコール飲料の製造において、エタノール濃度を低く抑えるために発酵度を抑えると、香気成分の含有量も低下したり、発酵不良により麦汁由来の不快臭が残存する場合もある。

本発明は、エタノール濃度が低く、かつ発酵不良により残存した麦汁臭が

少ない麦芽発酵液の製造方法、当該製造方法により製造された麦芽発酵液を用いて麦芽発酵飲料を製造する方法、及び当該製造方法により製造された麦芽発酵飲料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] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、麦芽の糖化物を含む発酵原料液の発酵を、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて行うことにより、発酵は十分に行われるが、エタノール産生が非常に抑えられ、エタノール濃度が十分に低く、かつ麦汁由来の不快臭も少ない麦芽発酵液が製造できることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法、麦芽発酵飲料の製造方法、及び麦芽発酵飲料は、下記の通りである。

[1] 麦芽の糖化物を含む発酵原料液に酵母を接種して発酵させて、麦芽発酵液を調製する工程を有し、

前記酵母が、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスであり、

前記麦芽発酵液が、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05v/v%未満である、麦芽発酵液の製造方法。

[2] 前記麦芽発酵液が、Brix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3.0ppb以下である、前記[1]の麦芽発酵液の製造方法。

[3] 前記麦芽発酵液のメチオナル濃度が、前記発酵原料液のメチオナル濃度の15質量%以下である、前記[1]又は[2]の麦芽発酵液の製造方法。

[4] 発酵終了時の前記麦芽発酵液の菌濃度が、 $3.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上である、前記[1]～[3]のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

[5] 発酵開始時の前記麦芽発酵液の菌濃度が、 $2.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 以上である、前記[1]～[4]のいずれかの製造方法。

[6] 前記発酵を、酸素付与条件下で行い、

前記酸素付与条件が、18℃常圧において、純水の溶存酸素濃度を6.0

p p mから8. 0 p p mに上昇させるために要する時間が0時間超5時間以下である条件である前記〔1〕～〔5〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

〔7〕 前記発酵を、酸素付与のない条件下で行う、前記〔1〕～〔5〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

〔8〕 前記発酵を、1℃以上で行う、前記〔1〕～〔7〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

〔9〕 前記発酵を、4時間以上行う、前記〔1〕～〔8〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

〔10〕 前記発酵を、24時間以上行う、前記〔1〕～〔8〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法。

〔11〕 前記〔1〕～〔10〕のいずれかの麦芽発酵液の製造方法により麦芽発酵液を製造した後、得られた麦芽発酵液を原料として、麦芽発酵飲料を製造する、麦芽発酵飲料の製造方法。

〔12〕 前記麦芽発酵液を希釈する工程を有する、前記〔11〕の麦芽発酵飲料の製造方法。

〔13〕 原麦汁エキ스가3～7質量%である麦芽発酵飲料を製造する、前記〔11〕又は〔12〕の麦芽発酵飲料の製造方法。

〔14〕 前記麦芽発酵飲料がビール様発泡性飲料である、前記〔11〕～〔13〕のいずれかの麦芽発酵飲料の製造方法。

〔15〕 B r i x 5. 0質量%あたりのエタノール濃度が0. 05 v / v %未満であり、B r i x 5. 0質量%あたりのメチオナル濃度が3. 0 p p b以下である、麦芽発酵飲料。

〔16〕 ビール様発泡性飲料である、前記〔15〕の麦芽発酵飲料。

発明の効果

〔0011〕 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法では、エタノール産生能が非常に低く、麦汁由来の不快臭は十分に除去できるR A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて発酵させる。このため、本発明に係る麦芽発酵液の製造方法

により、エタノール濃度が低く、かつ麦汁由来の不愉快臭が十分に少ない麦芽発酵液を提供できる。また、当該麦芽発酵液を用いることで、エタノール濃度が低く、かつ麦汁臭が抑えられた麦芽発酵飲料を提供できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]参考例1において、18℃常圧で、各酸素付与条件下でインキュベートした純水の溶存酸素濃度を経時的に測定した結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明及び本願明細書において、「 $X_1 \sim X_2$ （は、 $X_1 < X_2$ を満たす実数である）」は、「 X_1 以上 X_2 以下」の数値範囲を意味する。

本発明及び本願明細書において、「ppb」及び「ppm」は、それぞれ、「質量ppb」及び「質量ppm」を意味する。

[0014] 本発明及び本願明細書において、「RAG⁻ (Resistance to Antimycin A on Glucose⁻) 表現型」とは、グルコース存在下の呼吸阻害剤感受性の形質、すなわち、グルコース及び呼吸阻害剤の存在下では増殖阻害を受ける形質を有することを意味する。当該呼吸阻害剤としては、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化反応のいずれかの反応を阻害する作用を有する物質であれば、特に限定されるものではない。例えば、アンチマイシンA (CAS RN : 1397-94-0)、ロテノン (CAS RN : 83-79-4)、テノイルトリフルオロアセトン (CAS RN : 326-91-0) 等の電子伝達阻害剤や、オリゴマイシンA (CAS RN : 579-13-5) 等のATP合成酵素阻害剤等が挙げられる。

[0015] 本発明及び本願明細書において、「RAG⁻表現型クルイベロミセス・ラクチス」とは、クルイベロミセス・ラクチスのうち、呼吸阻害剤感受性株、すなわち、呼吸阻害剤存在下では正常な増殖が阻害される株を意味する。野生型のクルイベロミセス・ラクチスは、グルコース存在下では、呼吸阻害剤存在下でも問題なく増殖できるが、一部の変異株は、RAG⁻表現型である。クルイベロミセス・ラクチスがRAG⁻表現型か否かの識別は、例えば、炭素源としてグルコースを含有する培養培地と、グルコースに加えて呼吸阻害剤を

含有させた呼吸阻害剤含有培養培地とで培養することにより実施できる。グルコースを含有する培養培地では増殖でき、呼吸阻害剤含有培養培地では増殖できないクワイベロミセス・ラクチスが、RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスであると識別される。

[0016] 本発明において用いられるRAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスとしては、グルコース存在下で呼吸阻害剤感受性を有していれば、その遺伝子型は特に限定されるものではない。RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスとしては、例えば、クワイベロミセス・ラクチスのうち、グルコーストランスポータータンパク質であるRAG1をコードするRAG1遺伝子の機能欠損変異体が挙げられる。また、RAG⁻表現型ではないクワイベロミセス・ラクチスに対して、例えば、EMS (Ethyl Methanesulfonate) 等を用いた薬剤処理、又は紫外線照射処理等の変異処理を施し、得られた変異体から、呼吸阻害剤含有培養培地では培養できず、呼吸阻害剤不含培養培地では培養可能な変異体を選抜することによっても、RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスを得られる。その他、RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスは、例えば、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)、National Collection of Yeast Cultures (NCYC) 等の菌株保存機関や販売元から入手可能なクワイベロミセス・ラクチスの株の中から、呼吸阻害剤感受性株を適宜選択して用いることができる。本発明において、発酵原料液に接種するRAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスは、1種類であってもよく、2種類以上であってもよい。また、本発明の効果を損なわない限度において、発酵原料液には、RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスとその他の酵母を併用して接種してもよい。

[0017] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法は、麦芽の糖化物を含む発酵原料液に、酵母を接種して発酵させて、麦芽発酵液を調製する工程を有する方法であり、当該酵母として、RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスを用いることを特徴とする。RAG⁻表現型クワイベロミセス・ラクチスは、発酵による香気成分の産生能力は十分であるが、発酵によるエタノール産生能力は低い

。このため、発酵原料液を R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスで発酵させることにより、発酵により様々な香気成分が含まれているが、エタノール濃度は十分に抑えられた麦芽発酵液を製造することができる。

[0018] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法により、B r i x 5. 0 質量%あたりのエタノール濃度が 0. 0 5 v / v %未満の麦芽発酵液を製造できる。本発明により製造される麦芽発酵液の B r i x 5. 0 質量%あたりのエタノール濃度としては、0. 0 5 v / v %未満であれば特に限定されるものではないが、0. 0 2 5 v / v %以下であることが好ましく、0. 0 1 0 v / v %以下であることがより好ましく、0. 0 0 8 v / v %以下であることがさらに好ましく、0. 0 0 5 v / v %以下であることがよりさらに好ましい。本発明により製造される麦芽発酵液の B r i x 5. 0 質量%あたりのエタノール濃度の下限値は、特に限定されるものではなく、例えば、0. 0 0 1 v / v %以上とすることができ、0. 0 0 2 v / v %以上であってもよい。また、本発明により製造される麦芽発酵液の B r i x 5. 0 質量%あたりメチオナール濃度としては、3. 0 p p b 以下であれば特に限定されるものではないが、1. 0 p p b 以下であることが好ましい。本発明により製造される麦芽発酵液の B r i x 5. 0 質量%あたりのメチオナール濃度の下限値は、特に限定されるものではなく、例えば、0. 1 0 p p b 以上とすることができ、0. 2 0 p p b 以上であってもよい。

[0019] 本発明及び本願明細書において、麦芽発酵液や飲料のエタノール濃度は、例えば、A D H (alcohol dehydrogenase) 及び A I D H (aldehyde dehydrogenase) を用いて生成された N A D H (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) 量を分光法により計測する酵素法、多機能バイオセンサ B F - 5 (王子計測機器製) を用いた酵素法、蒸留-密度(比重)法、ガスクロマトグラフ(GC : Gas Chromatography)分析法、酸化法(酸化還元滴定法)等により測定することができる。

[0020] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法においては、R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いた発酵により、麦芽発酵液のエタノール産生を抑え

られるだけではなく、麦汁由来の不快臭の残存も抑制できる。例えば、麦汁に由来する不快臭の一つに、メチオナルがある。本発明に係る麦芽発酵液の製造方法においては、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%未満であり、かつBrix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3.0ppb以下の麦芽発酵液を製造できる。メチオナルは、麦汁臭の原因香気成分であり、発酵が進むにつれて低減する。Brix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3.0ppb以下であることは、発酵が進み、麦汁臭が十分に低減されていることを意味する。すなわち、本発明により、エタノール濃度とメチオナル濃度の両方が十分に低減された麦芽発酵液が製造できる。

[0021] 本発明及び本願明細書において、麦芽発酵液や飲料のメチオナル濃度は、例えば、GC（ガスクロマトグラフ）分析やGC-MS分析（ガスクロマトグラフ質量分析）、固相マイクロ抽出（SPME）-GC-MS/MS分析（ガスクロマトグラフトリプル4重極質量分析）により得られたクロマトグラフのピーク面積から求めることができる。ピーク面積からの定量方法は、特に限定されるものではないが、例えば、面積百分率法、内部標準法、標準添加法、及び絶対検量線法が挙げられる。具体的には、下記実施例に記載の方法により求めることができる。

[0022] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法においては、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いた発酵により、麦芽発酵液のメチオナル濃度を、発酵原料液のメチオナル濃度よりも十分に低減させることもできる。本発明においては、麦芽発酵液のメチオナル濃度は、発酵原料液のメチオナル濃度の好ましくは15質量%以下、より好ましくは10質量%以下、さらに好ましくは5質量%以下にまで低減させることもできる。すなわち、本発明に係る麦芽発酵液の製造方法により、低エタノールであるが、メチオナル濃度も低く、麦汁臭が抑えられた嗜好性の高い麦芽発酵液が得られる。

[0023] 本発明において、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して発酵させる発酵原料液は、麦芽の糖化物を含むものであり、RAG-表現型クル

イベロミセス・ラクチスが資化可能な炭素源又は窒素源を含むものであれば、特に限定されるものではない。例えば、麦芽の糖化物のみからなるものであってもよく、麦芽の糖化物以外の炭素源又は窒素源を含むものであってもよい。

[0024] 本発明及び本願明細書において、「麦芽の糖化物」とは、麦芽中の糖類を、各種酵素で糖化处理したものである。糖化处理に使用する酵素は、麦芽に本来含まれている酵素であってもよく、麦芽以外に由来する酵素であってもよい。例えば、麦芽又はその粉碎物に水を加えて、50～60℃で保持することにより、麦芽由来のアミラーゼによって糖化物が得られる。この際に、麦芽以外に由来する糖化酵素をさらに添加してもよく、タンパク質分解酵素等の糖化酵素以外の酵素を併用してもよい。

[0025] 本発明において、麦芽の糖化物としては、例えば、麦汁や麦芽エキスをを用いることができる。麦芽エキスは、麦汁を濃縮したものであり、麦芽糖を主成分とする。麦芽エキスは、そのまま炭酸水でわって飲料としたり、飲食品の原材料として使用されている。麦汁の濃縮は、常法により行うことができる。麦汁中の成分への影響が抑えられるため、減圧濃縮が好ましいが、加熱して溶媒を除去して濃縮することもできる。

[0026] 麦汁は、麦芽と原料水とを含む混合物を調製して加温し、麦芽の澱粉質を糖化させて調製する。麦芽は、粉碎処理して得られる麦芽粉碎物として用いることが好ましい。麦芽の粉碎処理は、常法により行うことができる。麦芽粉碎物は、粉碎処理の前後において通常なされる処理を施したものであってもよい。当該処理としては、例えば、除根等が挙げられる。

[0027] 麦芽と原料水を含む混合物には、麦芽以外の発酵原料を含んでいてもよい。当該発酵原料は、穀物原料であってもよく、糖質原料であってもよい。麦芽以外の穀物原料としては、例えば、大麦や小麦等の麦類、米、トウモロコシ、大豆等の豆類、イモ類等が挙げられる。穀物原料は、穀物粉碎物、穀物シロップ、穀物エキス等として用いることもできる。穀物粉碎物としては、コーンスターチ、コーングリッツ等のように、粉碎処理の前後において通常

なされる処理を施したものであってもよい。当該通常なされる処理としては、例えば、タンパク質・穀皮・胚芽の除去、脱水等が挙げられる。糖質原料としては、例えば、液糖等の糖類が挙げられる。

[0028] 麦汁は、このまま発酵原料液として用いてもよいが、酵母を接種させる前に、煮沸処理を行うことが好ましい。当該煮沸処理により、殺菌でき、より安全に発酵を行うことができる。煮沸処理を行う場合、煮沸処理前に、濾過等により不溶性の固形分を除去しておくことが好ましい。当該濾過処理は、特に限定されるものではなく、珪藻土濾過、フィルター濾過等の飲食品の製造工程で一般的に行われている固液分離処理の中から適宜選択して用いることができる。また、この糖液の濾液に替わりに、麦芽エキスを温水を加えたものを用い、これを煮沸してもよい。煮沸方法及びその条件は、適宜決定することができる。

[0029] 煮沸処理前又は煮沸処理中に、香草等を適宜添加することにより、所望の香味を有する麦芽発酵液を製造することができる。特にホップは、煮沸処理前又は煮沸処理中に添加することが好ましい。ホップの存在下で煮沸処理することにより、ホップの風味・香気成分を効率よく煮出することができる。ホップの添加量、添加態様（例えば数回に分けて添加するなど）及び煮沸条件は、適宜決定することができる。

[0030] 煮沸された麦汁は、酵母を接種させる前に、沈殿により生じたタンパク質等の粕を除去することが好ましい。粕の除去は、いずれの固液分離処理で行ってもよいが、一般的には、ワールプールと呼ばれる槽を用いて沈殿物を除去する。この際の煮汁の温度は、15℃以上であればよく、一般的には50～80℃程度で行われる。粕を除去した後の清澄な麦汁（濾液）は、プレートクーラー等により適切な発酵温度まで冷却する。この粕を除去した後の麦汁が、発酵原料液となる。

[0031] 本発明において、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種する発酵原料液のBrixは、4%～20%であるものが好ましく、8%～18%であるものがより好ましく、12%～16%であるものがさらに好ましい。

また、本発明において、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種する発酵原料液のpHは、3.0～6.0が好ましく、3.5～5.5がより好ましい。

[0032] なお、本発明及び本願明細書において、発酵原料液のBrix値は、屈折計（RX-5000α、アタゴ社製）等の測定装置を用いて、常法により測定することができる。

[0033] 冷却した発酵原料液にRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して、発酵を行う。冷却した発酵原料液は、そのまま発酵に供してもよく、所望のエキス濃度に調整した後に発酵に供してもよい。発酵原料液に添加するRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスの量は、特に限定されるものではない。麦汁臭の十分な除去の点から、発酵原料液に接種させるRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスの量は、発酵開始時の前記麦芽発酵液の菌濃度が $2.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 以上となる量であることが好ましく、 $2.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ となる量であることがより好ましい。

[0034] RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスの発酵終了時の到達菌数が多くなりすぎると、産生されるエタノール量が多くなりすぎるおそれがある。一方で、発酵終了時の到達菌数が少なすぎると、発酵が不十分となりやすく、メチオナル等の麦汁由来の不快臭を十分に低減させることが困難な場合がある。目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液が得られやすい点から、発酵終了時における麦芽発酵液の菌濃度は、 $3.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上であることが好ましく、 $3.0 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ であることがより好ましい。

[0035] 本発明に係る麦芽発酵液の製造方法において、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して行う発酵の条件は、特に限定されるものではない。発酵温度としては、1℃以上であればよく、例えば、一般的に酵母が生存可能な温度域である1～35℃であることが好ましく、1～28℃であることがより好ましく、1～25℃であることがさらに好ましく、1～20℃で

あることがよりさらに好ましい。また、発酵開始から発酵終了時まで、一定の温度で発酵させてもよく、発酵温度を適宜変動させてもよい。発酵時間は、発酵温度と所望の製品品質等を考慮して適宜決定することができるが、メチオナル等の麦汁由来の不快臭の十分な低減が期待できることから、4時間以上が好ましい。なかでも、発酵時間としては、4～168時間が好ましく、4～96時間がより好ましく4～72時間がさらに好ましい。また、発酵液中のRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスが目的の菌濃度に達した時点を、発酵終了時とすることもできる。

[0036] RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスによる発酵では、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスが増殖期にあってもよく、ほとんど増殖しない状態で発酵させてもよい。例えば、1℃ではRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスはごくわずかしかな増殖しないが、発酵原料液に十分量のRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種させることにより、目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液が得られる。一方で、発酵原料液への接種量が少ない場合でも、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスが増殖する環境下で発酵させることにより、目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液が得られる。

[0037] RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを十分に増殖させるためには、完全嫌氣的環境下よりも、嫌氣的環境下で発酵させることが好ましい。ここで「嫌氣的環境下」とは、完全な嫌氣的条件ではなく、一定の酸素付与条件を維持しているが、供給酸素量が菌体増殖に伴う酸素消費量を下回り、結果的に液中の溶存酸素濃度がゼロとなる条件である。また、「完全嫌氣的環境下」とは、新たに酸素供給がない環境下、すなわち、「酸素付与のない条件下」を意味する。完全嫌氣的環境は、発酵タンクへ供給する気体を、窒素ガスや二酸化炭素ガス等の酸素を含有していないガスで行うことにより達成できる。

[0038] 例えば、発酵原料液への植菌数が 3×10^6 cells/mL未満とする場合には、一定の酸素付与条件で嫌氣的環境を維持して発酵させることにより

、発酵終了時には $3.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上、好ましくは $3.0 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ にまでRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを増殖させることができ、目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液が得られる。一方で、発酵原料液への植菌数が $3 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上の場合には、嫌気的環境下で発酵させてもよく、完全嫌気的環境下で発酵させた場合でも、発酵時間を調整することで目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液を得ることができる。例えば、発酵原料液へのRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスの植菌数が $3 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上であり、 $1 \sim 35^\circ\text{C}$ 、好ましくは $1 \sim 28^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $8 \sim 28^\circ\text{C}$ 、さらに好ましくは $12 \sim 24^\circ\text{C}$ で、24時間以上発酵させることにより、完全嫌気的環境下で発酵させた場合でも、目的の低エタノール濃度かつ低不快臭の麦芽発酵液を得ることができる。

[0039] RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを嫌気的環境下で発酵させる場合には、酸素濃度が適切な範囲内に調節できるよう、 18°C 常圧において純水の溶存酸素濃度を6 ppmから8 ppmに上昇させるために要する時間が0時間超5時間以下、例えば、15分間以上5時間以下となるような酸素付与条件で行うことが好ましい。当該酸素付与条件下での発酵は、発酵液に直接酸素を混入させるのではなく、空気のような酸素を含有する気体が充填された発酵タンク内で発酵液を攪拌しながら発酵させることにより実施できる。具体的には、発酵タンクで発酵を行う場合には、発酵タンク内の空寸に空気を供給している状態で発酵液を攪拌したり、発酵タンクに 0.026 MPa で加圧して、 1 kL 発酵液あたりに空気を 10 NL/h で供給することにより、前記酸素付与条件を達成できる。また、実験室レベルの低容量の発酵容器内で発酵を行う場合には、例えば、ポンプで発酵液を攪拌したり、 500 mL 容三角フラスコに 400 mL の麦汁をいれ、振盪培養器を用いて 60 rpm で攪拌したり、 500 mL 容のジャーファーメンターに 400 mL の麦汁をいれ、排気口に $0.2 \mu\text{m}$ 口径フィルターを取り付けた状態で積極的な空気供給はせず、攪拌羽を 50 rpm で回転させて攪拌することによっ

て、前記酸素付与条件を達成できる。その他、気液接触面の広い発酵容器で静置することによっても、前記酸素付与条件を達成できる。

[0040] 本発明において得られた麦芽発酵液は、そのまま飲食品の原料とすることができる。当該麦芽発酵液を原料として製造される飲食品は、特に限定されるものではない。本発明において得られた麦芽発酵液を原料として製造される飲食品としては、飲料が好ましく、麦芽発酵飲料がより好ましく、麦芽発酵ビール様発泡性飲料がさらに好ましい。

[0041] なお、本発明及び本願明細書において、「麦芽発酵飲料」とは、麦芽又はその加工品を原料として用い、酵母による発酵工程を経て製造される飲料を意味する。麦芽発酵飲料としては、アルコール飲料であってもよく、エタノール濃度が1.0 v/v %未満であるいわゆるノンアルコール飲料又はローアルコール飲料であってもよい。本発明において得られた麦芽発酵液を原料として製造される麦芽発酵飲料としては、エタノール濃度が、0.05 v/v %未満、好ましくは0.025 v/v %以下、より好ましくは0.01 v/v %以下、さらに好ましくは0.008 v/v %以下、よりさらに好ましくは0.005 v/v %以下であることが好ましい。

[0042] 麦芽発酵飲料としては、例えば、ビール様発泡性飲料が挙げられる。本発明及び本願明細書において、「ビール様発泡性飲料」とは、ビールと同等の又はそれと似た風味・味覚及びテクスチャーを有し、ビールらしさ（香味上ビールを想起させる呈味）を有する発泡性飲料を意味する。麦芽発酵ビール様発泡性飲料としては、具体的には、ビール、麦芽を原料とする発泡酒等が挙げられる。その他、麦芽発酵液を、エタノール含有蒸留液と混和して得られたリキュール類であってもよい。エタノール含有蒸留液とは、蒸留操作により得られたエタノールを含有する溶液であり、例えば、原料用アルコール（エタノール）であってもよく、ウィスキー、ブランデー、ウォッカ、ラム、テキーラ、ジン、焼酎等の蒸留酒（スピリッツ）等を用いることができる。

[0043] 例えば、得られた麦芽発酵液を固液分離処理することにより、酵母等を除

去して、麦芽発酵飲料を得ることができる。当該固液分離処理は、酵母等を除去可能な方法であればよく、例えば、遠心分離処理、珪藻土濾過処理、平均孔径が0.4～0.5 μm 程度のフィルターによるフィルター濾過処理等が挙げられ、これらの処理を組み合わせてもよい。また、得られた麦芽発酵液にホップ、ホップエキス、香料等を添加し、発酵麦芽飲料の香味を調整してもよい。香味の調整は、固液分離処理前に行ってもよく、固液分離処理後に行ってもよい。また、固液分離処理後の麦芽発酵液を、0℃程度の低温条件下で貯蔵して熟成させてもよい。麦芽発酵飲料を製造するために、さらに、例えば、pH調整処理や加熱処理等を常法に従って行ってもよい。

[0044] 得られた麦芽発酵液を、適宜希釈することにより、エキス濃度等が所望の範囲内である麦芽発酵飲料を製造することもできる。希釈に用いられる溶液は、特に限定されるものではないが、例えば、水又は炭酸水等が挙げられる。希釈倍率は特に限定されるものではなく、例えば、2～10倍に希釈することができ、2～6倍希釈がより好ましく、2～4倍希釈がさらに好ましい。また、原麦汁エキス濃度が所望の範囲内、例えば3～7質量%になるように希釈して、麦芽発酵飲料を製造することもできる。麦芽発酵液を希釈する工程は、発酵工程終了後に行ってもよく、酵母等を除去した後に行ってもよく、熟成後の麦芽発酵液に対して行ってもよい。

[0045] 麦芽発酵液や麦芽発酵飲料の原麦汁エキス濃度は、日本醸造協会が発行している分析法で規定されている方法（「BCO」ビール分析法（2013改訂版）（ビール酒造組合同国際技術委員会(分析委員会)編集）」の「8.5 エキス関係測定法」）に従って測定することができる。具体的には、アルコール濃度と真正エキス濃度から測定することができる。

[0046] 麦芽発酵液や麦芽発酵飲料の真正エキス濃度は、「BCO」ビール分析法（2013改訂版）（ビール酒造組合同国際技術委員会(分析委員会)編集）」の「8.4.3 アルコライザー法」に規定されている方法に従って測定することができる。

[0047] 本発明において得られた麦芽発酵液を原料として得られる麦芽発酵飲料の

エタノール濃度は、特に限定されるものではない。本発明において得られた麦芽発酵液を原料とすることにより、エタノール濃度が低く、麦汁臭が抑えられた麦芽発酵飲料を製造できる。当該麦芽発酵飲料としては、例えば、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%以下である麦芽発酵飲料が好ましく、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%以下かつメチオナル濃度が3.0 ppb以下である麦芽発酵ビール様発泡性飲料がより好ましく、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.01 v/v%以下かつメチオナル濃度が3.0 ppb以下である麦芽発酵ビール様発泡性飲料がさらに好ましく、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.01 v/v%以下かつメチオナル濃度が1.0 ppb以下である麦芽発酵ビール様発泡性飲料がよりさらに好ましい。

実施例

[0048] 次に実施例及び参考例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例等に限定されるものではない。

[0049] <エタノール濃度測定>

以降の実験において、特に記載のない限り、麦芽発酵液又は飲料中のエタノール濃度は、下記の方法により測定した。

蒸留水を用いてエタノール濃度が0.5～2.0 v/v%になるようにサンプルを希釈した溶液を、多機能バイオセンサ（BF-5、王子機器計測社製）により測定した。得られた測定値に希釈倍率を乗じた値を、サンプル中のエタノール濃度（v/v%）とした。

[0050] なお、当該多機能バイオセンサは、アルコールオキシダーゼによる酸化によって生じた過酸化水素（ H_2O_2 ）を電気化学的に検出する装置であり、メタノールとエタノールの合計濃度が測定できる。酵母はメタノールを生合成しないことなどから、麦芽発酵液には、メタノールは、誤差範囲といえる程度の微量しか含まれていない。このため、当該多機能バイオセンサによる測定値は、麦芽発酵液サンプルのエタノール量の測定値である。

[0051] エタノール濃度が0.5 v/v %未満のサンプルの場合には、この多機能バイオセンサを使用して、アルコール濃度が0.01~0.04 v/v %となるようにサンプルを希釈した溶液に対して、アジ化ナトリウム非含有の緩衝液（SL04-0015、王子機器計測社製）を用いた高感度測定法により、エタノール濃度の測定を行った。

[0052] <メチオナールの分析>

以降の実験において、特に記載のない限り、発酵原料液、麦芽発酵液、又は飲料のメチオナールの濃度は、GC-MS分析法により定量した。分析に使用したMRMトランジションを表1に示す。

[0053] [表1]

	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (V)
定量イオン	299	85	15
確認イオン	102	47	25

[0054] 具体的には、固相マイクロ抽出（SPME）-GC-MS/MSにより、以下の要領で測定した。10 mLのヘキサン洗浄水が入ったバイアルに、6 g/Lに調製したo-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine·HCl（PFBOA）を100 µL入れ、これを誘導体化試薬とした。SPMEファイバー（PDMS/DVB: 65 µm、1 cm、57327-U 24 gauge Stable Flex、SPELCO社製）を、PFBOA溶液が入ったバイアルのヘッドスペースに、50℃で10分間、露出させた。続いて、10 gの試料と、5 mg/Lになるようエタノールに溶解したMethionald3が50 µL入ったバイアルのヘッドスペースに、PFBOAを捕集したSPMEファイバーを50℃で60分間露出させた。誘導体化したメチオナールは、以下のGC-MS/MS条件で分析した。

[0055] <GC-MS/MS条件>

装置：多機能オートサンプラMPS2システム（Gerstel社製）が搭載されたGC-MS/MS（7890A/7000C Agilent社製）

)

カラム：HP-5MS UI 30m×0.25mm×0.25μm (Agilent社製)

キャリアガス：ヘリウム

流量：1mL/分

昇温条件：80℃（5分間）→15℃/分→150℃→5℃/分→220℃→50℃/分→300℃（5分間）

注入法：スプリットレス

パージフロー：50mL/分、1分間

注入口温度：250℃

圧力：9.3825psi

トランスファーライン：320℃

イオン化：電子イオン化法（70eV）

イオン源温度：250℃

四重極温度：150℃

Heクエンチガス流量：2.25mL/分

N2コリジョンガス流量：1.5mL/分

MRMトランジション：（表1参照）

[0056] <Brix測定>

以降の実験において、特に記載のない限り、発酵原料液、麦芽発酵液、又は飲料のBrixは、デジタル屈折計（RX-5000α、アタゴ社製）を用いて測定した。

[0057] <pH測定>

以降の実験において、特に記載のない限り、発酵原料液、麦芽発酵液、又は飲料のpHは、pH計測機（LAQUAtwin-pH-33、Horiba社製）により測定した。

[0058] <麦汁A及びDの調製>

麦汁A及びDは、200Lスケールの仕込設備を用いて製造した。まず、

仕込槽に、発酵原料となる粉碎麦芽及びデンプン質副原料を40kgと原料水を160Lとを投入した。次いで、当該仕込槽内の混合物を常法に従って加温して糖化させた後、得られた糖化液を濾過した。得られた濾液にホップを添加した後、煮沸した。煮沸後の濾液を沈降槽に移して沈殿物を分離除去した後、pHをリン酸で調整し、冷却して麦汁A及びDを得た。得られた麦汁A及びDの分析値は、表2の通りであった。

[0059] [表2]

	麦汁A	麦汁D
Brix	12.0 %	9.0 %
フルクトース	0.32 %	0.30 %
グルコース	1.02 %	1.57 %
全糖濃度	11.9 %	8.8 %
pH	3.92	4.39

[0060] <麦汁B及びCの調製>

表3に記載の市販の麦芽エキスを水で希釈、混合し、それぞれ表3に記載のBrix及びpHの麦汁B又は麦汁Cとした。

[0061] [表3]

麦汁	製造メーカー	麦芽エキス名称	麦芽エキスのBrix(%)	pH
B	Coopers	MALT extract (Non diastatic)	81.8	5.21
C	Brew Maker	Maltax 10	80-82	5.2-6.0

[0062] [参考例1]

18℃、大気圧で、純水を下記の酸素付与条件でインキュベートし、溶存酸素濃度を測定した。

[0063] 酸素付与条件1：500mL容の三角フラスコに400mLの純水をいれ、振盪培養器で60rpmで攪拌する。

酸素付与条件2：500mL容のジャーファーメンターに400mLの純水をいれ、排気口に0.2μm口径フィルターを取り付けた状態で積極的な空気供給はせず、攪拌羽を50rpmで回転させて攪拌する。

酸素付与条件3：200L容の発酵タンクに100Lの純水を入れ、て0.026MPaで加圧して、100L純水あたり空気を0.67NL/分で供

給する。

酸素付与条件4：500 mL容のジャーファーメンターに400 mLの純水をいれ、排気口に0.2 μ m口径フィルターを取り付けて窒素ガスを吹き込む状態で、攪拌羽を50 rpmで回転させて攪拌する（完全嫌氣的条件）。

[0064] 各条件で溶存酸素濃度を経時的に測定した結果を図1に示す。この結果、酸素付与条件1～3では、18℃常圧において、純水の溶存酸素濃度を6.0 ppmから8.0 ppmに上昇させるために要する時間は、0時間超5時間以下であった。一方で、酸素付与条件4では、酸素供給がないため、当該純水の溶存酸素濃度は0 ppmに保持されていた。

[0065] [実施例1]

様々な酵母を用いて麦汁をフラスコ内で発酵させ、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。

[0066] <酵母>

クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株、クルイベロミセス・ラクチスNBRC1267株、クルイベロミセス・ラクチスNBRC1090TS株、リポマイセス・スターキー (*Lipomyces starkeyi*) NBRC10381TS株、リポマイセス・リポファ (*Lipomyces lipofer*) NBRC1288TS株、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) NBRC717株、ロドトルラ・グルンティス (*Rhodotorula glutinis*) NBRC1125TS株、サッカロマイコーデス・ルドウィギイNBRC798TS株、及びトルラスポラ・デルブリュッキ (*Torulaspora delbrueckii*) NBRC955TS株を用いた。株名の末尾に「TS」とある株は、タイプストレイン株である。

使用した3株のクルイベロミセス・ラクチスのうち、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株はRAG⁻表現型であり、クルイベロミセス・ラクチスNBRC1267株、クルイベロミセス・ラクチスNBRC1090TS株はRAG⁻表現型を持たず、呼吸阻害剤存在下でも増殖可能である。

[0067] <400 mLスケール試験>

発酵原料液として、麦汁Aを用いた。まず、Brix 5質量%となるよう水で希釈した麦汁で一晩前培養した各酵母を、1度水で洗浄した後、500 mL容の三角フラスコに入れた麦汁（Brix 12.0%）各400 mLに、酵母の初発菌数が麦汁1 mLあたり 1.0×10^6 個となるよう添加した。次いで、酵母を接種した麦汁を、インキュベーターの回転数を60 rpm、18℃常圧にて振盪培養を行い、3日間発酵させた。その後、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。

[0068] なお、500 mL容の三角フラスコに純水400 mLを入れて、18℃常圧において、インキュベーターの回転数を60 rpmで攪拌しながらインキュベートした場合、当該純水の溶存酸素濃度が6.0 ppmから8.0 ppmに上昇するのに要する時間は135分間であった。

[0069] 発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度の定量結果を表4に示す。表中、「KL」はクルイベロミセス・ラクチス、「LS」はリポマイセス・スターキー、「LL」はリポマイセス・リポファ、「YL」はヤロウィア・リポリティカ、「RG」はロドトルラ・グルンティス、「SL」はサッカロマイコーデス・ルドウィギイ、及び「TB」はトルラスポラ・デルブリュッキをそれぞれ示す。また、「到達菌数（cells/mL）」は発酵終了時の発酵液の菌濃度を、「エタノール（%ABV）」は発酵終了時の発酵液のエタノール濃度（v/v%）を、「エタノール/Brix 5%相当（%ABV）」は発酵終了時の発酵液のBrix 5.0質量%あたりのエタノール濃度（v/v%）を、「メチオナル（ppb）」は発酵終了時の発酵液のメチオナル濃度（ppb）を、「メチオナル/Brix 5%相当（ppb）」は発酵終了時の発酵液のBrix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度（ppb）を、それぞれ示す。ただし、「植菌無し」欄では、「メチオナル濃度（ppb）」は発酵原料液（植菌前の麦汁）のメチオナル濃度（ppb）を、「メチオナル/Brix 5%相当（ppb）」は発酵原料液のBrix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度（ppb）を、それぞれ示す。また、「メチオナル低減率（%）」は、発酵原料液からのメチ

オナール濃度の低減率（ $100\% - \left[\text{発酵終了時の発酵液の Brix} 5.0 \text{ 質量\%あたりのメチオナール濃度 (ppb)} \right] / \left[\text{発酵原料液の Brix} 5.0 \text{ 質量\%あたりのメチオナール濃度 (ppb)} \right] \times 100\%$ ）を示す。

[0070] [表4]

菌種	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール /Brix5%相当 (%ABV)	メチオナール (ppb)	メチオナール /Brix5%相当 (ppb)	メチオナール低減 率(%)
植菌なし	—	—	—	32.85	13.69	—
KLNBRC648	1.29.E+07	0.009	0.004	2.34	0.98	92.87
KLNBRC1267	8.88.E+07	0.420	0.175	2.30	0.96	92.99
KLNBRC1090TS	4.39.E+07	0.250	0.104	2.96	1.23	90.98
LSNBRC10381TS	1.70.E+06	0.001	0.000	23.51	9.80	28.42
LLNBRC1288TS	3.50.E+06	0.002	0.001	5.58	2.33	83.01
YL NBRC717	1.25.E+07	0.021	0.009	16.74	6.97	49.04
RG NBRC1125TS	2.32.E+06	0.003	0.001	7.4	3.09	77.43
SL NBRC798TS	1.83.E+07	0.780	0.325	1.25	0.52	96.20
TD NBRC955TS	1.02.E+08	0.600	0.250	1.44	0.60	95.62

[0071] 表4に示すように、いずれの酵母でも、ノンアルコールビールの製造に商業利用されているサッカロマイコーデス・ルドウィギイと同様にエタノール濃度の低い発酵液が得られたが、特に、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株、リポマイセス・スターキーNBRC10381TS株、リポマイセス・リポファNBRC1288TS株、ヤロウィア・リポリティカNBRC717株、ロドトルラ・グルンティスNBRC1125TS株は、Brix 5.0%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%未満と非常に低かった。これらのうち、特に、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株、及びリポマイセス・リポファNBRC1288TS株で発酵させた発酵液では、メチオナール低減率が80%以上であり、発酵も十分に行われていた。

[0072] 3株のクルイベロミセス・ラクチスで発酵させた発酵液は、いずれもメチオナール低減率が90%以上であり、発酵は十分になされていたが、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度（v/v%）を0.05 v/v%以下にまで低減できたのは、Rag-表現型であるクルイベロミセス・ラクチスNBRC648株のみであった。

[0073] <官能評価>

官能評価は、各発酵液を2.56倍希釈した液（発酵麦芽ビール様発泡性飲料）を評価試料として、熟練のパネリスト5名により、1点から7点のSD法(semantic differential method) (Frey, The SAGE Encyclopedia of Educational Research, Measurement, and Evaluation, "Semantic Differential Scaling", 2018, p. 1504-1507)を用いて行った。評価項目は、(a) 麦汁臭の強さ、及び(b) おいしさとした。(a) については香りで、(b) については味で評価を行った。評価試料はそれぞれ20mLとし、評価する順番はパネリストによって異なるようランダム化した。

[0074] (a) については、1点に水、7点に麦汁Aを標品として使用して評価した。

(b) については、麦汁Aをコントロール（3点）として、採点を行った。

[0075] [表5]

酵母	(a) 麦汁臭の強さ		(b) おいしさ		
	評点平均値	p 値	評点平均値	p 値	フリーコメント
水	1.0				—
麦汁	7.0		3.0		—
KL NBRC648	2.3	0.7	5.2	0.2	マイルド、すっきり、酸味
KL NBRC1267	2.7	0.3	4.5	0.1	マイルド、ジアセチル、エステル
KL NBRC1090TS	3.7	0.1	4.2	0.0	ジアセチル、甘味、やや麦汁臭
LS NBRC10381TS	4.7	0.0	4.2	0.0	麦汁臭、甘味、麦
LL NBRC1288TS	4.0	0.0	4.0	0.0	麦汁臭、甘味、苦味、エステル
YL NBRC717	3.2	0.0	3.5	0.0	薬品臭、やや麦汁臭、水っぽい
RG NBRC1125TS	2.7	0.3	4.7	0.0	やや麦汁臭、甘味、すっきり
SL NBRC798TS	2.2	1.0	5.8	1.0	ビールらしい、エステル、ボディ感
TD NBRC955TS	2.3	0.7	5.7	0.8	ビールらしい、エステル、すっきり

[0076] 官能評価の評価結果を表5に示す。発酵原料液のBrix 5.0質量%あ

たりのメチオナル濃度 (ppb) が低かったクルイベロミセス・ラクチス NBRC 648 株、クルイベロミセス・ラクチス NBRC 1267 株、クルイベロミセス・ラクチス NBRC 1090 TS 株、リポマイセス・リポファ NBRC 1288 TS 株、及びロドトルラ・グルンティス NBRC 1125 TS 株の発酵液の希釈液は、麦汁臭が弱く、おいしさの評価も高かった。特に、クルイベロミセス・ラクチス NBRC 648 株で発酵させた発酵液の希釈液は、サッカロマイコーデス・ルドウィギイで発酵させた発酵液の希釈液と同様に、おいしさの評点が5以上と高く、かつ、Brix 5.0 質量%あたりのエタノール濃度が0.004 v/v%と非常に低く、マイルドですっきりとした飲みやすいビール様発泡性飲料であった。

[0077] [実施例2]

様々なRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて麦汁をフラスコ内で発酵させ、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。

[0078] <酵母>

RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスとしては、クルイベロミセス・ラクチス NBRC 648 株及び／又は NBRC 1267 株から育種した、表6に記載の株を用いた。表中、「KL」は「*Kluyveromyces lactis*」の略である。

[0079] <KL No. 86の取得>

麦汁90mLを100mL容三角フラスコに入れ、NBRC 648 株（前培養菌体）を 2×10^6 cells/mL植菌し、18℃で60rpmロータリーにて2日間の培養を5回繰り返した。得られた菌体をYM寒天培地に塗抹し、アネロパック・微好気（三菱ガス化学社製）とともに密閉容器に入れ、25℃で5日間培養した。寒天培地上に生じたコロニーのうち、生育が早いコロニーを選抜した。

[0080] <KL P13及びKL P15の取得>

純水にKL NBRC 648を 1×10^8 cells/mLになるように懸

濁し、懸濁液を得た。パラフルオロフェニルアラニン含有寒天培地（0.6% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids、2% Glucose、1.0 mg/mL パラフルオロフェニルアラニン、2% agar）に懸濁液100 μ Lを植菌し、25℃で4日間培養した。寒天培地上に生じたコロニーのうち、香気成分（ β フェネチルアルコール）の産生量が多い株を選抜した。

[0081] <KL 648 $\times$ 1267-2C、KL 648 $\times$ 1267-4A、KL 648 $\times$ 1267-5Bの取得>

NBRC648株とRAG⁻表現型を持たないKL NBRC1267株を接合して得られた胞子のうち、RAG⁻表現型をもつ株を選抜した。

[0082] <KL 1267-R6、KL 1267-R33の取得>

KL NBRC1267株を0.3%エチルメタンスルホン酸で30℃、60分間処理し、生菌率が38%になるようにした。処理した菌体を100個程度のコロニーが生えるようにYPD寒天培地に植菌し、アンチマイシンA含有寒天培地（0.5% Yeast extract、1% peptone、5% Glucose、5 μ M アンチマイシンA、2% agar）にレプリカプレーティングを行った。YPD寒天培地では生育可能で、アンチマイシンA含有寒天培地では生育できない株を選抜した。

[0083] [表6]

株名	育種方法
KL NBRC648	
KL No. 86	NBRC648 株由来半嫌氣的条件耐性株
KL P13	NBRC648 株由来パラフルオロフェニルアラニン耐性株
KL P15	NBRC648 株由来パラフルオロフェニルアラニン耐性株
KL 648 $\times$ 1267-2C	NBRC648 株と RAG ⁻ 表現型を持たない KL NBRC1267 株を接合して得られた RAG ⁻ 表現型を持つ交配育種株
KL 648 $\times$ 1267-4A	NBRC648 株と RAG ⁻ 表現型を持たない KL NBRC1267 株を接合して得られた RAG ⁻ 表現型を持つ交配育種株
KL 648 $\times$ 1267-5B	NBRC648 株と RAG ⁻ 表現型を持たない KL NBRC1267 株を接合して得られた RAG ⁻ 表現型を持つ交配育種株
KL 1267-R6	KL NBRC1267 株に、生菌率 38%になるまで EMS 変異原処理を行い、5 μ M アンチマイシン A 含有培地で生育できない株をレプリカプレート法で選抜して得られた、RAG ⁻ 表現型を獲得した株
KL 1267-R33	KL NBRC1267 株に、生菌率 38%になるまで EMS 変異原処理を行い、5 μ M アンチマイシン A 含有培地で生育できない株をレプリカプレート法で選抜して得られた、RAG ⁻ 表現型を獲得した株

[0084] <400 mLスケール試験>

実施例1と同様にして、前培養した酵母を初発菌数が麦汁1 mLあたり 1.0×10^6 個となるよう麦汁に接種し、18℃常圧にて3日間振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表7に示す。

[0085] [表7]

菌種	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール/Brix5% 相当 (%ABV)	メチオナル (ppb)	メチオナル/Brix5%相 当 (ppb)	メチオナル低減 率 (%)
植菌なし	—	—	—	32.85	13.69	—
KLNBRC648	9.76E+06	0.003	0.001	1.8	0.77	94.38
KL No. 86	1.38E+07	0.007	0.003	1.6	0.66	95.21
KL P13	7.07E+06	0.004	0.002	1.5	0.62	95.49
KL P15	7.52E+06	0.004	0.002	1.7	0.70	94.89
KL 648×1267-2C	1.33E+07	0.002	0.001	1.7	0.69	94.96
KL 648×1267-4A	1.99E+07	0.003	0.001	1.6	0.65	95.26
KL 648×1267-5B	1.46E+07	0.002	0.001	1.4	0.60	95.59
KL 1267-R6	2.02E+07	0.039	0.016	2.8	1.18	91.41
KL 1267-R33	2.86E+07	0.003	0.001	1.5	0.62	95.45

[0086] 全ての育種株から得られた発酵液は、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v %未満であり、麦汁Aと比較して、メチオナル濃度が85質量%以上低減されており、さらに、Brix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3 ppb以下であった。これらの結果から、RAG-表現型を有するクルイベロミセス・ラクチスであれば、低アルコール濃度かつ低メチオナル濃度の麦芽発酵液が調製できることが確認された。

[0087] [実施例3]

組成やBrixが異なる麦汁を発酵原料液としてRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて発酵させ、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスとして、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株を用いた。

[0088] (1)

麦汁Aに代えて、表8に記載のBrixの麦汁を用いた以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を初発菌数が麦汁1 mLあたり 1.0×10^6

個となるよう麦汁に接種し、18℃常圧にて3日間振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナール濃度を定量した。その結果を表8に示す。

[0089] [表8]

菌種	麦汁 (Brix)	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール/Brix 5%相当 (%ABV)	メチオナール (ppb)	メチオナール/Brix 5% 相当 (ppb)	メチオナール 低減率 (%)
植菌なし	麦汁B	—	—	—	197.0	82.09	—
NBRC648	(12.0%)	3.63E+07	0.011	0.005	7.0	2.91	96.45
植菌なし	麦汁C	—	—	—	167.7	69.87	—
NBRC648	(12.0%)	2.63E+07	0.006	0.003	5.9	2.48	96.46

[0090] 麦汁Bと麦汁Cのいずれを用いた場合でも、麦汁Aを用いた場合と同様に、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v %未満であり、酵母接種前の麦汁と比較して、メチオナール濃度が85質量%以上低減されており、さらに、Brix 5.0質量%あたりのメチオナール濃度が3 ppb以下の麦芽発酵液が調製できた。

[0091] (2)

麦汁Aに代えて、麦汁Bを表9に記載のBrixに調製した麦汁を用いた以外は、前記(1)と同様にして、前培養した酵母を麦汁に酵母菌数が麦汁1 mLあたり 1.0×10^6 個となるよう接種し、18℃常圧にて3日間振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナール濃度を定量した。その結果を表9に示す。

[0092] [表9]

菌種	麦汁Bの Brix	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール/Brix 5%相当 (%ABV)	メチオナール (ppb)	メチオナール/Brix 5% 相当 (ppb)	メチオナール 低減率 (%)
植菌なし	12.0%	—	—	—	197.0	69.87	—
NBRC648	4.0%	2.63E+07	0.01	0.013	1.5	1.91	95.3
NBRC648	8.0%	3.27E+07	0.012	0.008	4.1	2.57	97.3
NBRC648	12.0%	3.63E+07	0.011	0.005	7.0	2.91	97.2
NBRC648	16.0%	4.40E+07	0.012	0.004	9.0	2.82	98.0
NBRC648	20.0%	4.06E+07	0.014	0.004	10.8	2.70	98.2

[0093] 発酵原料液のBrix値にかかわらず、得られた麦芽発酵液は、Brix

5. 0質量%あたりのエタノール濃度が0. 05 v / v %未満であり、酵母接種前の麦汁と比較して、メチオナル濃度が85質量%以上低減されており、さらに、B r i x 5. 0質量%あたりのメチオナル濃度が3 p p b以下であった。

[0094] [実施例4]

発酵原料液に接種させるR A G⁻表現型クルイベロミセス・ラクチスの菌数や到達菌数を変えて、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。R A G⁻表現型クルイベロミセス・ラクチスとして、クルイベロミセス・ラクチスN B R C 6 4 8株を用い、発酵原料液として麦汁Aを使用した。

[0095] 培養時間、培養スケール、及び初発菌数を表10に記載の通りとした以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を、初発菌数が麦汁1 mLあたり 1.0×10^6 個となるように、三角フラスコに入れた麦汁に接種し、インキュベーターの回転数を60 r p m、18℃常圧にて振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表10に示す。

[0096] 表中、「培養スケール」のうち、「160 / 200 mL」及び「160 / 500 mL」は、それぞれ、200 mL容の三角フラスコ又は500 mL容の三角フラスコに、160 mLの麦汁を入れ、当該麦汁に酵母を接種させたことを示す。

なお、500 mL容の三角フラスコに純水160 mLを入れて、18℃常圧において、インキュベーターの回転数を60 r p mで攪拌しながらインキュベートした場合、当該純水の溶存酸素濃度が6. 0 p p mから8. 0 p p mに上昇するのに要する時間は1時間であった。また、200 mL容の三角フラスコに純水160 mLを入れて、18℃常圧において、インキュベーターの回転数を60 r p mで攪拌しながらインキュベートした場合、当該純水の溶存酸素濃度が6. 0 p p mから8. 0 p p mに上昇するのに要する時間は160分間であった。

[0097] [表10]

培養時間 (日)	培養スケール	初発菌数 (cells/mL)	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール /Brix 5% 相当 (%ABV)	メチオナル (ppb)	メチオナル /Brix 5% 相当 (ppb)	メチオナル 低減率 (%)
0		—	—	—	—	32.85	13.69	—
1	160/200mL	2.00E+04	7.44E+05	0.001	0.000	31.8	13.23	3.30
2	160/200mL	2.00E+04	2.31E+06	0.001	0.000	15.2	6.33	53.73
3	160/200mL	2.00E+04	5.55E+06	0.002	0.001	2.4	0.98	92.81
1	160/200mL	2.00E+05	3.65E+06	0.002	0.001	1.9	0.78	94.29
2	160/200mL	2.00E+05	9.68E+06	0.002	0.001	1.7	0.70	94.86
3	160/200mL	2.00E+05	1.25E+07	0.002	0.001	1.6	0.67	95.09
3	160/200mL	1.00E+06	1.57E+07	0.006	0.003	1.30	0.54	96.04
3	160/200mL	5.00E+06	1.68E+07	0.015	0.006	1.56	0.65	95.25
3	160/200mL	2.00E+07	2.90E+07	0.010	0.004	1.5	0.61	95.52
4	160/200mL	2.00E+07	5.46E+07	0.010	0.004	1.1	0.45	96.69
5	160/200mL	2.00E+07	6.53E+07	0.010	0.004	1.4	0.56	95.89
6	160/200mL	2.00E+07	9.11E+07	0.013	0.005	1.3	0.55	95.98
4	160/500mL	2.00E+07	1.06E+08	0.044	0.018	1.02	0.43	96.88
5	160/500mL	2.00E+07	9.23E+07	0.070	0.029	0.96	0.40	97.07
6	160/500mL	2.00E+07	1.29E+08	0.096	0.040	0.94	0.39	97.13
7	160/500mL	2.00E+07	1.45E+08	0.125	0.052	1.02	0.43	96.88
8	160/500mL	2.00E+07	1.62E+08	0.150	0.063	0.89	0.37	97.29

[0098] 表10中、培養時間が0日間の欄が、酵母を植菌する前の発酵原料液（麦汁）の測定結果を示す。表10に示すように、到達菌数が 3.0×10^6 cells/mL未満であった発酵液では、メチオナルの低減率が60%以下であり、発酵が不十分であった。一方で、到達菌数が 1.4×10^8 cells/mL超であった発酵液では、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%超であり、エタノール産生量が多かった。到達菌数が $3.0 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^8$ cells/mLであった発酵液では、初発菌数や発酵日数にかかわらず、いずれもBrix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05 v/v%以下、かつメチオナル低減率90%以上であり、低アルコールかつ低メチオナルの良好な麦芽発酵液が得られた。

[0099] [実施例5]

発酵原料液にRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して発酵時間を変えて、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスとして、クルイベ

ロミセス・ラクチスNBRC648株を用い、発酵原料液として麦汁Aを使用した。

[0100] 200mL容の三角フラスコに160mLの麦汁を入れて、培養日数及び初発菌数を表11に記載の通りとした以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を、初発菌数が麦汁1mLあたり 1.0×10^6 個となるように三角フラスコに入れた麦汁に接種し、インキュベーターの回転数を60rpm、18℃常圧にて振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表11に示す。

[0101] [表11]

培養時間（時間）	初発菌数 (cells/mL)	到達菌数 (cells/mL)	エタノール(%ABV)	エタノール/Brix 5%相当(%ABV)	メチオナル (ppb)	メチオナル/Brix 5%相当(ppb)	メチオナル低減率(%)
0	—	—	—	—	32.85	13.69	—
1	3.00E+06	6.38.E+06	0.006	0.003	9.50	3.96	71.08
4	3.00E+06	6.96.E+06	0.009	0.004	4.37	1.82	86.70
6.5	3.00E+06	7.02.E+06	0.015	0.006	2.90	1.21	91.17
24	3.00E+06	8.37E+06	0.012	0.005	1.40	0.58	95.74
72	3.00E+06	1.69E+07	0.013	0.005	1.40	0.58	95.74

[0102] 表11中、培養時間が0時間の欄が、酵母を植菌する前の発酵原料液（麦汁）の測定結果を示す。表11に示すように、培養時間が長くなるほど、メチオナル低減率は高くなっていた。酵母と麦汁の接触時間が4時間以上の場合に、Brix5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05v/v%未満であり、かつ、麦汁（発酵原料液）と比較して、メチオナルが85質量%以上低減されており、かつBrix5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3ppb以下である麦芽発酵液が得られた。

[0103] [実施例6]

発酵原料液にRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して発酵させる際の酸素付与条件を変えて、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチ

スとして、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株を用い、発酵原料液として麦汁Aを使用した。

[0104] (1) 酸素付与条件2（参考例1）での発酵

500mL容のジャーファーマンターに400mLの麦汁をいれ、酵母を初発菌数が麦汁1mLあたり 2.0×10^5 個となるように接種させた後、排気口に0.2 μ m口径フィルターを取り付けて積極的な空気供給はしないが空気の出入りは可能にしてある状態で、攪拌羽を50rpmで回転させて攪拌して、18℃常圧で1日間発酵させた以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を麦汁に接種し、発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表12に示す。

[0105] (2) 酸素付与条件4（参考例1）での発酵

500mL容のジャーファーマンターに400mLの麦汁をいれ、酵母を初発菌数が麦汁1mLあたり 2.0×10^5 個となるように接種させた後、排気口に0.2 μ m口径フィルターを取り付けて窒素ガスを吹き込む状態で、攪拌羽を50rpmで回転させて攪拌して、18℃常圧で1日間発酵させた以外は、前記(1)と同様にして、前培養した酵母を麦汁に接種し、発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表12に示す。

[0106] [表12]

菌種	酸素付与条件	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール/Brix 5%相当 (%ABV)	メチオナル (ppb)	メチオナル/Brix 5%相当 (ppb)	メチオナル 低減率 (%)
植菌なし	—	—	—	—	32.85	13.69	—
NBRC648	2	1.02E+07	0.003	0.001	2.3	0.69	93.0
NBRC648	4	1.89E+06	0.002	0.001	22.9	9.54	30.3

[0107] 表12中、「酸素付与条件」が「2」の欄は、積極的な空気供給はしないが空気の出入りは可能にしてある状態（参考例1の酸素付与条件2）で発酵させた場合の結果であり、「4」の欄は、窒素ガスを吹き込む状態（参考例

1の酸素付与条件4)で発酵させた場合の結果である。嫌気的環境である酸素付与条件2での発酵では、B r i x 5. 0質量%あたりのエタノール濃度が0. 05 v / v %未満であり、かつ、麦汁（発酵原料液）と比較して、メチオナルが85質量%以上低減されており、かつB r i x 5. 0質量%あたりのメチオナル濃度が3 p p b以下である麦芽発酵液が得られた。一方で、完全嫌気的環境である酸素付与条件4での発酵では、メチオナル低減率が30%程度しかなく、発酵が不十分であった。

[0108] 次いで、初発菌数を表13に記載の量とした以外は、前記(2)と同様にして、酸素付与条件4で発酵を行った。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表13に示す。

[0109] [表13]

酸素付与条件4（完全嫌気的環境）							
菌種	初発菌数 (cells/mL)	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール /Brix 5%相当 (%ABV)	メチオナル (ppb)	メチオナル /Brix 5%相当 (ppb)	メチオナル低減 率(%)
植菌なし	—	—	—	—	32.85	13.6	—
NBRC648	1.00E+06	2.30E+06	0.002	0.001	15.0	6.26	54.26
NBRC648	3.00E+06	4.92E+06	0.000	0.000	2.9	1.21	91.14
NBRC648	1.00E+07	1.45E+07	0.000	0.000	1.6	0.65	95.23

[0110] 表13に示すように、植菌数（初発菌数）が 3×10^6 cells / mLを上回る場合には、完全嫌気的環境での発酵であっても、到達菌数が 3×10^6 cells / mLを上回り、B r i x 5. 0質量%あたりのエタノール濃度が0. 05 v / v %未満であり、かつ、麦汁（発酵原料液）と比較して、メチオナルが85質量%以上低減されており、かつB r i x 5. 0質量%あたりのメチオナル濃度が3 p p b以下である麦芽発酵液が得られた。これらの結果から、発酵中に酵母の増殖が抑えられている完全嫌気的環境であっても、初発菌数が十分に多い場合には、目的の低アルコール濃度かつ低メチオナル濃度の麦芽発酵液が得られることがわかった。

[0111] [実施例7]

発酵原料液にRAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスを接種して発酵させる際の発酵温度を変えて、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。発酵原料液として麦汁Aを使用した。

[0112] RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスとして、クルイベロミセス・ラクチスNBRC648株を用い、200mL容の三角フラスコに160mLの麦汁を入れて、発酵温度及び初発菌数を表14に記載の通りとした以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を麦汁に接種し、インキュベーターの回転数を60rpm、18℃常圧にて振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表14に示す。

[0113] [表14]

菌種	発酵温度(℃)	初発菌数(cells/mL)	到達菌数(cells/mL)	エタノール(%ABV)	エタノール/Brix 5%相当(%ABV)	メチオナル(ppb)	メチオナル/Brix 5%相当(ppb)	メチオナル低減率(%)
植菌なし		—	—	—	—	32.85	13.69	—
NBRC648	1	1.00E+06	1.00E+06	0.004	0.002	29.3	12.21	10.80
NBRC648	5	1.00E+06	1.81E+06	0.004	0.002	11.3	4.71	65.60
NBRC648	10	1.00E+06	6.99E+06	0.002	0.001	1.9	0.79	94.22
NBRC648	15	1.00E+06	2.62E+07	0.003	0.001	1.6	0.67	95.13
NBRC648	18	1.00E+06	2.94E+07	0.005	0.002	1.8	0.75	94.52
NBRC648	22	1.00E+06	6.36E+07	0.011	0.005	1.2	0.52	96.22
NBRC648	1	5.00E+06	5.18E+06	0.002	0.001	2.5	1.06	92.29
NBRC648	5	5.00E+06	6.70E+06	0.002	0.001	2.7	1.13	91.78

[0114] 表14に示すように、発酵温度が低く、発酵期間中に酵母はほとんど増殖しない場合であっても、到達菌数が 3×10^6 cells/mLを上回る場合には、メチオナル低減率を90%以上とすることができ、Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05v/v%未満であり、かつBrix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05v/v%未満である麦芽発酵液が調製できた。

[0115] [実施例8]

発酵温度1℃として、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を調べた。発酵原料液として麦汁Aを使用した。酵母として

は、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスであるクルイベロミセス・ラクチスNBRC648株及びクルイベロミセス・ラクチスR33株と、サッカロマイコーデス・ルドウィギイNBRC798TS株とを用いた。

[0116] 300mL容の三角フラスコに240mLの麦汁を入れて、発酵温度、酵母の菌種、及び初発菌数を表15に記載の通りとした以外は、実施例1と同様にして、前培養した酵母を麦汁に接種し、インキュベーターの回転数を60rpm、18℃常圧にて振盪培養を行って発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナル濃度を定量した。その結果を表15に示す。

[0117] また、得られた各発酵液を2.56倍希釈した液（発酵麦芽ビール様発泡性飲料）を調製し、熟練のパネリスト5名により、その呈味を評価した。結果を表16に示す。

[0118] [表15]

菌種	発酵温度(℃)	初発菌数(cells/mL)	到達菌数(cells/mL)	エタノール(%ABV)	エタノール/Brix 5%相当(%ABV)	メチオナル(ppb)	メチオナル/Brix 5%相当(ppb)	メチオナル低減率(%)
植菌なし	—	—	—	—	—	32.85	13.69	—
KL NBRC648	1	5.0.E+06	9.1.E+06	0.005	0.00	4.05	1.69	87.66
KL R33	1	5.0.E+06	6.7.E+06	0.004	0.00	3.18	1.32	90.32
SL NBRC798TS	1	5.0.E+06	6.9.E+06	0.145	0.06	1.56	0.65	95.26

[0119] [表16]

菌種	麦芽発酵液の希釈液の官能コメント
KL NBRC648	マイルド、すっきり、軽快
KL R33	マイルド、すっきり、軽快、穀物
SL NBRC798TS	華やか、酸味、マイルド、すっきり

[0120] 表15に示すように、いずれの酵母を用いて得られた発酵液でも、メチオナル低減率は85%以上であり、十分に発酵されていた。特に、RAG-表現型クルイベロミセス・ラクチスであるクルイベロミセス・ラクチスNBRC648株及びクルイベロミセス・ラクチスR33株を用いて得られた発酵液では、エタノール産生量も低く、サッカロマイコーデス・ルドウィギイN

B R C 7 9 8 T S株を用いて得られた発酵液と比較して、マイルドだが、すっきりして軽快であり、飲みやすいという特徴を有していた（表 1 6）。

[0121] [実施例 9]

パイロットスケールで R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて発酵させ、得られた発酵液の菌濃度、エタノール濃度、及びメチオナール濃度を調べた。発酵原料液として麦汁 D を使用した。酵母としては、R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスであるクルイベロミセス・ラクチス N B R C 6 4 8 株及びクルイベロミセス・ラクチス R 8 6 株を用いた。

[0122] <発酵タンク発酵>

2 0 0 L 容の発酵タンクに、麦汁 D (B r i x 9 . 0 %) 1 0 0 L を入れ、当該発酵タンクに、初発菌数が表 1 7 に記載の量となるように酵母を添加した。次いで、発酵タンクを 0 . 0 2 6 M P a で加圧して、1 0 0 L 発酵液あたりに空気を 0 . 6 7 N L / 分で供給した条件（参考例 1 における酸素付与条件 3）下で、1 8 ° C、3 日間発酵させた。得られた発酵液の菌濃度（到達菌数）、エタノール濃度、及びメチオナール濃度を定量した。その結果を表 1 7 に示す。

[0123] [表 17]

菌種	初発菌数 (cells/mL)	到達菌数 (cells/mL)	エタノール (%ABV)	エタノール /Brix 5%相当 (%ABV)	メチオナール (ppb)	メチオナール /Brix 5%相当 (ppb)	メチオナール 低減率 (%)
植菌なし	—	—	—	—	12.63	5.26	—
KL NBRC648	2.61.E+06	2.62E+07	0.024	0.014	0.45	0.25	96.41
KL R86	2.73.E+06	4.00E+07	0.081	0.046	0.45	0.25	96.46

[0124] 表 1 7 に示すように、パイロットスケールであっても、R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスを用いて適切な酸素付与条件下で発酵させることにより、B r i x 5 . 0 質量%あたりのエタノール濃度が 0 . 0 5 v / v % 未満であり、かつ、麦汁（発酵原料液）と比較して、メチオナールが 8 5 質量%以上低減されており、かつ B r i x 5 . 0 質量%あたりのメチオナール濃度が 3 p p b 以下である麦芽発酵液が得られることが確認された。

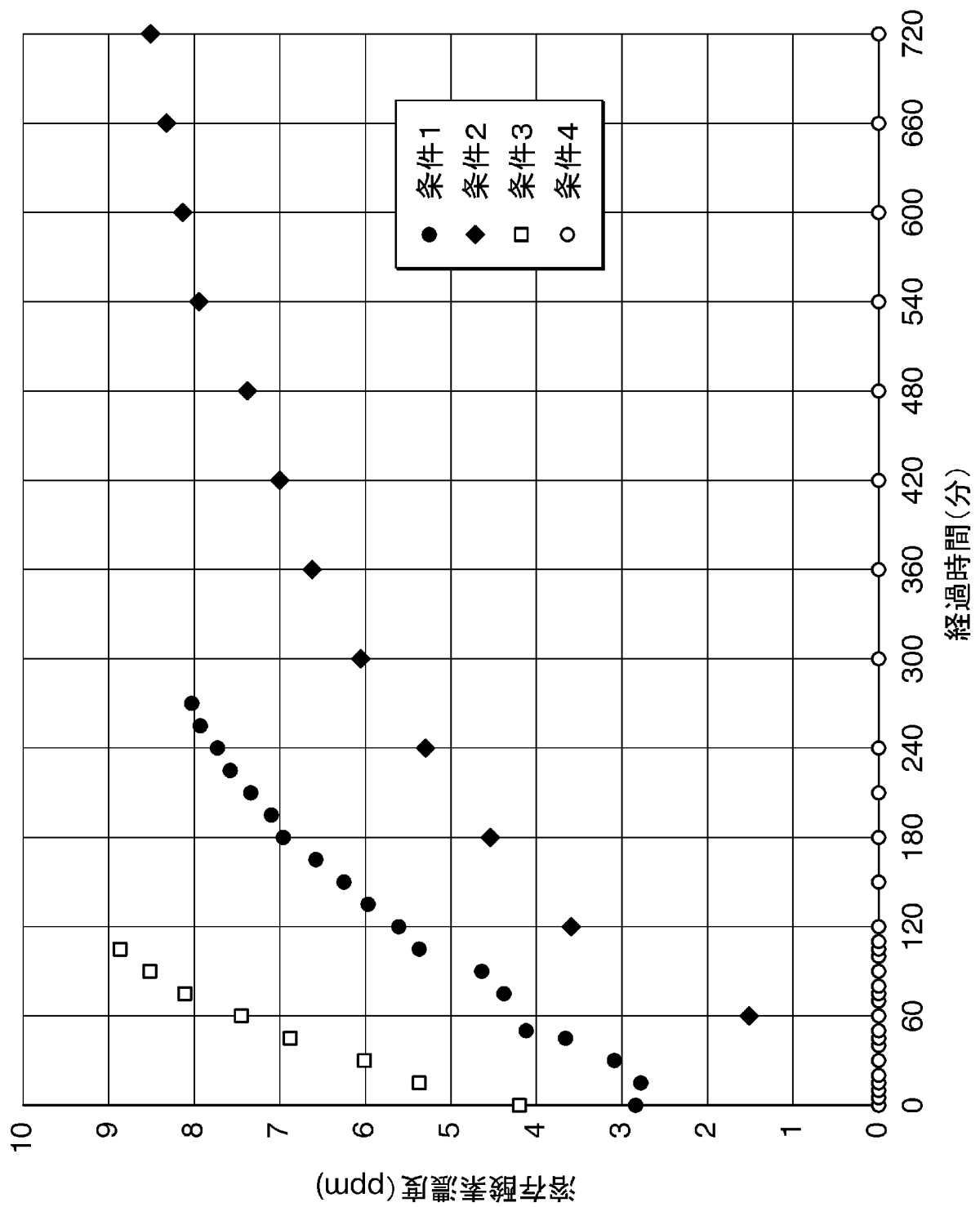
請求の範囲

- [請求項1] 麦芽の糖化物を含む発酵原料液に酵母を接種して発酵させて、麦芽発酵液を調製する工程を有し、
前記酵母が、R A G-表現型クルイベロミセス・ラクチスであり、
前記麦芽発酵液が、B r i x 5. 0 質量%あたりのエタノール濃度が0. 0 5 v / v %未満である、麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項2] 前記麦芽発酵液が、B r i x 5. 0 質量%あたりのメチオナル濃度が3. 0 p p b 以下である、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項3] 前記麦芽発酵液のメチオナル濃度が、前記発酵原料液のメチオナル濃度の1 5 質量%以下である、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項4] 発酵終了時の前記麦芽発酵液の菌濃度が、 $3. 0 \times 10^6$ c e l l s / m L 以上である、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項5] 発酵開始時の前記麦芽発酵液の菌濃度が、 $2. 0 \times 10^4$ c e l l s / m L 以上である、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項6] 前記発酵を、酸素付与条件下で行い、
前記酸素付与条件が、1 8℃常圧において、純水の溶存酸素濃度を6. 0 p p m から8. 0 p p m に上昇させるために要する時間が0 時間超5 時間以下である条件である、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項7] 前記発酵を、酸素付与のない条件下で行う、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項8] 前記発酵を、1℃以上で行う、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項9] 前記発酵を、4 時間以上行う、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。
- [請求項10] 前記発酵を、2 4 時間以上行う、請求項1 に記載の麦芽発酵液の製造方法。

造方法。

- [請求項11] 請求項1～10のいずれか一項に記載の麦芽発酵液の製造方法により麦芽発酵液を製造した後、得られた麦芽発酵液を原料として、麦芽発酵飲料を製造する、麦芽発酵飲料の製造方法。
- [請求項12] 前記麦芽発酵液を希釈する工程を有する、請求項11に記載の麦芽発酵飲料の製造方法。
- [請求項13] 原麦汁エキ스가3～7質量%である麦芽発酵飲料を製造する、請求項11に記載の麦芽発酵飲料の製造方法。
- [請求項14] 前記麦芽発酵飲料がビール様発泡性飲料である、請求項11に記載の麦芽発酵飲料の製造方法。
- [請求項15] Brix 5.0質量%あたりのエタノール濃度が0.05v/v%未満であり、Brix 5.0質量%あたりのメチオナル濃度が3.0ppb以下である、麦芽発酵飲料。
- [請求項16] ビール様発泡性飲料である、請求項15に記載の麦芽発酵飲料。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A23L 2/00</i> (2006.01)i; <i>C12C 7/00</i> (2006.01)i FI: A23L2/00 H; A23L2/00 B; A23L2/00 Z; C12C7/00 Z 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) A23L2/00; C12C7/00 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2022-508429 A (HEINEKEN SUPPLY CHAIN B.V.) 19 January 2022 (2022-01-19) paragraph [0019], example 3	15-16
Y	US 5384135 A (BRASSERIE DU CARDINAL FRIBOURG S.A.) 24 January 1995 (1995-01-24) column 1, lines 8-10, example 3	15-16
A	JP 60-94077 A (KAGOME KABUSHIKI KAISHA) 27 May 1985 (1985-05-27)	1-16
A	WESOŁOWSKI-LOUVEL, M. et al. Glucose transport in the yeast <i>Kluyveromyces lactis</i> . I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. <i>Mol Gen Genet.</i> 233(1-2), 1992, DOI: 10.1007/BF00587565, abstract	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent 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 “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 September 2024		Date of mailing of the international search report 17 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023580

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2022-508429	A	19 January 2022	US 2021/0189306 A1 paragraphs [0032]-[0038], example 3 WO 2020/055233 A1 EP 3850077 A1 BE 1026567 A NL 2023524 A CN 112689667 A CA 3111765 A AU 2018441183 A BR 112021004155 A CL 2021000590 A MX 2021002637 A ZA 202100767 B	
US	5384135	A	24 January 1995	EP 560712 A1 CH 683843 A	
JP	60-94077	A	27 May 1985	(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; C12C 7/00(2006.01)i

FI: A23L2/00 H; A23L2/00 B; A23L2/00 Z; C12C7/00 Z

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; C12C7/00

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 - 2024年

日本国実用新案登録公報1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報1994 - 2024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); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
Y	JP 2022-508429 A (ハイネケン・サプライ・チェーン・ピー. プイ.) 19.01.2022 (2022 - 01 - 19) 段落0019, 実施例 3	15-16
Y	US 5384135 A (BRASSERIE DU CARDINAL FRIBOURG S.A.) 24.01.1995 (1995 - 01 - 24) 第1欄第8-10行、EXAMPLE 3	15-16
A	JP 60-94077 A (カゴメ株式会社) 27.05.1985 (1985 - 05 - 27)	1-16
A	WESOLOWSKI-LOUVEL M. et al., Glucose transport in the yeast Kluyveromyces lactis. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene, Mol Gen Genet, 233(1-2), 1992, DOI: 10.1007/BF00587565, Abstract	1-16

☐ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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

03.09.2024

国際調査報告の発送日

17.09.2024

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）

高山 敏充 40 4153

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

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/JP2024/023580

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2022-508429	A	19.01.2022	US	2021/0189306	A1	
				[0032]-[0038], Example 3			
				WO	2020/055233	A1	
				EP	3850077	A1	
				BE	1026567	A	
				NL	2023524	A	
				CN	112689667	A	
				CA	3111765	A	
				AU	2018441183	A	
				BR	112021004155	A	
				CL	2021000590	A	
				MX	2021002637	A	
				ZA	202100767	B	

US	5384135	A	24.01.1995	EP	560712	A1	
				CH	683843	A	

JP	60-94077	A	27.05.1985	(ファミリーなし)			
