

麦芽リパーゼ活性阻害によるビール泡持ち安定性の向上

藤野舜一・石川雄章・花牟礼研一・杉田佑輔

日本醸造協会誌（醸協）第118巻第8号 567～578頁別刷（2023）

日 本 醸 造 学 会

麦芽リパーゼ活性阻害によるビール泡持ち安定性の向上

藤野舜一*・石川雄章・花牟礼研一・杉田佑輔
(東京バイオテクノロジー専門学校)

令和4年9月13日受付／令和5年1月20日受理

Improvement of beer foam stability via the inhibition of malt lipase activity

Shunichi FUJINO*, Takeaki ISHIKAWA, Ken-ichi HANAMURE, Yusuke SUGITA

(Tokyo College of Biotechnology)

Received 13 September 2022 ; accepted 20 January 2023

White foam is one of the characteristics of beer quality. Here we investigated a method of improving the foam stability focusing on malt lipase. The various properties of the malt lipase were first studied : the optimum temperatures were 40°C and 60°C and the optimum pH was at 5. Next, chemicals including some food additives were tested as to their inhibitory effect against the malt lipase. As a result, cetilistat, which is a pancreatic lipase inhibitor, and tea catechin products (POLYPHENON, SUNPHENON) were found to exhibit marked effects. When these inhibitors were added to the brewing water in the mashing process, malt lipase activity was suppressed and the contents of free higher fatty acids including linoleic acid in the wort significantly decreased. The contents of free fatty acids also decreased in young beer and bottled beer. The head retention time of both ale type and pilsner type beers increased about 10 % with the addition of POLYPHENON to the brewing water in the mashing process as compared to that of beer without the addition.

Key words : ビール (beer), 泡 (foam), 麦芽リパーゼ (malt lipase), セチリスタット (cetilistat), 茶カテキン (tea catechin)

緒言

ビールの品質特徴の一つとして白い泡があげられる。この泡は炭酸ガスの他に、疎水性蛋白質、イソフムロン、等で形成されていることが報告されている^{1,2,3)}。この白い泡は他の飲料にはないビールのみが有する大きな特徴であり、ビールの重要な外観品質である。

従って、ビール、及びノンアルコールビールも含めて、泡持ち向上に関する特許や泡持ち阻害物質に関する研究が多く報告されている。

例えば、泡持ち向上に関する特許文献としては、直鎖状グルカンの添加⁴⁾、難消化性デキストリンの添加⁵⁾、

コラーゲンペプチドの添加^{6,7)}、一定の分子量の蛋白質を特定量含有させる方法⁸⁾、総ポリフェノールを300ppm以上添加する方法⁹⁾、等が報告されている。

また、ビール中に含まれる泡持ち阻害物質に関する研究としては、炭素数18個のトリヒドロキシオクタデセン酸 (THOD) やジヒドロキシオクタデセン酸 (DHOD) が他の遊離脂肪酸よりも強い阻害作用を示すことが報告^{2,10,11)}されている。そして、これらのヒドロキシ脂肪酸は糖化工程でのリパーゼによる脂質分解 (遊離脂肪酸の生成)¹²⁾、及び、これに続くリノール酸 (C18:2) の麦芽リポキシゲナーゼによるヒドロペルオキシド生成を経て、麦汁中に生成されること

*: sfujino@tbz.t-com.ne.jp

が報告^{13,14,15)}されている。

また、麦芽脂質のリパーゼによる分解に先立って、リポキシゲナーゼが脂質に作用し脂質ペルオキシドが生成されたのち、リパーゼが作用して脂肪酸ヒドロペルオキシドが生成されることも報告¹⁶⁾されている。

ところで前記した THOD はビールの保存により生成されるカードボード臭の主原因物質であるトランス-2-ノネナールの前駆物質でもある¹⁷⁾。

従って、THOD や DHOD の生成抑制はビール品質向上に大きく寄与することから、麦芽リポキシゲナーゼが注目され、リポキシゲナーゼ欠損大麦育種の開発、及び当該大麦を使用したビール醸造技術が報告^{15,18,19)}されてきた

しかしながら、上記のリポキシゲナーゼ欠損大麦株はビール会社ではまだ限定的な使用状況である。そこで広く普遍的に THOD や DHOD の生成を抑制できる技術として、麦芽リパーゼに着目した。即ち、このリパーゼ活性を抑制できれば遊離脂肪酸が減少し、その結果 THOD や DHOD の生成を抑制でき、ビールの泡持ち向上が期待でき、更にはトランス-2-ノネナールの低減にもつながると考えられた。

本研究においては、リパーゼ阻害剤を使用して麦芽リパーゼ活性を抑制し THOD や DHOD の前駆体であるリノール酸を含む遊離脂肪酸全体量を低減させ、ビールの泡持ち向上を図ることを目的とした。

実験材料ならびに実験方法

1. 実験材料

(1) ビール醸造原料

① エールタイプ用

アドバンストブルーイング(株)のエールタイプ用ビールキット (A03-F10) を使用した。同キットは麦芽、ホップ、アイリッシュモス、および乾燥酵母を含有している。

② ピルスナータイプ用

原料麦芽はサントリーモルティング(株)の国産麦芽(粉碎品)を使用した。ホップ、及び乾燥酵母は何れもアドバンストブルーイング(株)の「ハラタウミッテルフリーエホップ/ペレット」、及び「FERMENTIS ラガーイースト W-34/70」を使用した。

(2) 微生物リパーゼ

天野エンザイム(株)のリパーゼ AY「アマノ」30SD

(*Candida cylindracea* 由来)を使用した。

(3) リパーゼ活性阻害剤

腭リパーゼ阻害剤セチリスタット (東京化成工業)を使用した。他に、腭リパーゼ活性阻害が報告^{20,21)}されている3種の食品素材を試験に供した。

①クロロゲン酸 富士フィルム和光純薬(株)製品を使用した。

②茶カテキン 三井農林(株)「ポリフェノン 70S」(以下「ポリフェノン」と略)、及び太陽化学(株)「サンフェノン 90LB-OP」(以下「サンフェノン」と略)を使用した。

2. 実験方法

(1) リパーゼ活性測定方法

オリーブ油を基質とする測定法を²²⁾を参考にして測定した。

① 基質乳液の調製

PVA117 (クラレポバル株式会社製) 18.5g, PVA 205 (同社) 1.5 g を温水で溶解し、全量を 1000 mL としたものを PVA 液とした。この PVA 液 75 mL とオリーブ油 (関東化学株式会社) 22.9g の混合物をポリトロン (キネマチカ社) を用い、10℃以下で 10~15 分間ホモジナイズし、基質乳液とした。この基質乳液は冷蔵保存し、使用時に再度ホモジナイズした。

② 酵素活性測定法

基質乳液 5mL と、0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) 4mL を混合し、この混合液を 50℃で 5 分間予備加熱した。予備加熱後、酵素剤 1mL を加え 50℃、20 分反応させ、アセトン：エタノール混合液 (1:1) 20mL を添加して反応を停止した。反応終了液にフェノールフタレイン溶液 5 滴を加え 0.05M NaOH で中和滴定した。ブランクは酵素剤無しで反応を行い、反応終了後中和滴定前に酵素剤を加えた。

また麦芽粉末をそのまま酵素剤として使用した場合には pH メーターを使用して中和滴定した。

なお、麦芽リパーゼの至適 pH 検討時には 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) の代わりに 0.1M マッキルベイン緩衝液を使用した。

③ 麦芽からのリパーゼ抽出法

ビールキットの麦芽を電動コーヒーミル (株式会社カリタ、ダイアル 9) で粉碎した。一定量の粉碎麦芽を 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) または純水 20mL に加え 5 分間混合した。混合液を 10℃、1,500rpm で 20

分間遠心分離し、上清液を麦芽リパーゼ抽出液とした。

(2) ビール試験醸造方法

① エールタイプビール

ビールキットを使用し、8L規模で以下に示す方法で醸造した。仕込水（水道水）4.7Lに粉碎麦芽1.887gを添加し40℃に加温した。40℃で20分間保持（蛋白休止）した後、66℃～68℃で90分間保持（糖化休止）した。糖化休止後、品温を76℃に上昇させ10分間保持した（酵素失活）。この醪をざるでろ過して1番麦汁とビール粕に分離し、ざる内のビール粕に更に76℃の湯1Lを2回かけて2番、3番麦汁を回収した。1番～3番麦汁をまとめて20Lの円筒型ステンレス製鍋に入れ、水を加えて12Lとして開放系で加熱煮沸した。煮沸開始30分後、一番ホップ8.6g、75分後に2番ホップ7.4g、及び麦汁の透明化のためのアイリッシュモス7.25gを添加した。更に、煮沸開始90分後に火を止めて3番ホップ3.8gを添加し、15分間静置した。約10Lとなった加熱麦汁にミネラルウォーターを加えてBrix12に調整した。冷却後、上澄み液を8L容の梅酒瓶に回収し、この麦汁に活性化した酵母懸濁液（乾燥酵母8g/水200mL）を添加し、5分間の攪拌により麦汁通気した。30分静置後、同様にして麦汁通気後、20℃で1週間発酵させて若ビールを調製した。

調製した若ビールは、圧力タンク（ユニコントロール社製）に移し替えて4℃で1週間後発酵させた。この後発酵ビールを1.2μのメンブレンフィルターを通して加圧タンク（Zahm & Nagel社製パイロットプラント シリーズ9000）に移し替えた。加圧タンクを4℃で1晩以上静置後、タンク内のビールをハンドフィルターを使用して500mL瓶に充填し、ただちに打栓した。

② ビルスナータイプビール

エールタイプビールと同様の工程で試験醸造した。但し蛋白休止温度は50℃に変更し、乾燥酵母は麦汁8Lに対して8gを復水後添加した。また、1番ホップ、2番ホップ、3番ホップの添加量は、それぞれ17g、4g、4gで行った。主発酵温度は12℃に変更した。

(3) 麦汁及びビール中の遊離脂肪酸分析方法

K. D. Vriesの方法²³⁾に準じて以下の通り脂肪酸濃縮物を調製した。即ち、麦汁、または脱気したビール150mLを試料とし、麦汁にはアルコール濃度5%に

なるように99%エタノールを添加した。各試料に内部標準物質（内標）1mL、濃塩酸2mL、NaCl 12.9gを添加し、攪拌・溶解した。内標には安息香酸エチル溶液（100μL/100mLヘキサン）を使用した。上記の処理した試料を分液ロート内でクロロホルム：メタノール混合液（3：1）300mLと1分間振とう混合した。75分静置後、下層のみをナス型フラスコに回収し、35～50℃でロータリーエバポレーターで濃縮し脂質濃縮物とした。この脂質濃縮物を「脂肪酸メチル化キット」（ナカライテスク株式会社）のA液、及びC液を使用してメチルエステル化し、遊離脂肪酸含量をGC-MS分析により測定した。

GC-MS分析条件は以下の通りである。

- 使用GC：GC-System 7890A (Agilent Technologies)
- 使用MS：5975C inert MSD (Agilent Technologies)
- 使用カラム：DB-WAX AB002（高極性カラム）
- 昇温プログラム：60℃（4分保持）→ [5℃/分で昇温] 200℃→ [2.5℃/分で昇温] 250℃（3分保持）
- インジェクション：250℃
- イオン化方法：電子衝撃法
- イオンモニター方法：トータルイオンモニタリング
- 検出器：230℃
- 注入量：1μL

GC-MS分析では同一バイアル瓶を2回測定し、各成分についてトータルイオンクロマトグラムのピーク面積の平均値を求めた。なお、2回測定して1回のみ検出された場合には、片方のみの数値を採用した。脂肪酸含量は前記のピーク面積、及び内標のピーク面積を1とした時の相対比で表した。

(4) アルコール濃度測定法

理研計器(株)製の「アルコメイト」(AL-2型)を使用して測定した。

(5) 瓶詰めビールのガス圧測定法

Zahm & Nagel社製「エアテスター」(シリーズ7000)を使用して測定した。

(6) 苦味価測定法

BCOJビール分析法²⁴⁾で測定した。

(7) 瓶詰めビールの泡持ち時間測定方法

光透過法、またはNIBEM法²⁵⁾で測定した。光透過法はAsanoらの方法¹⁾に準じて測定した。即ち、Fig. 1に示す光透過装置を使用し、1晩以上静置し品温を6℃前後にした瓶詰め品を、開栓後直ちに一定の

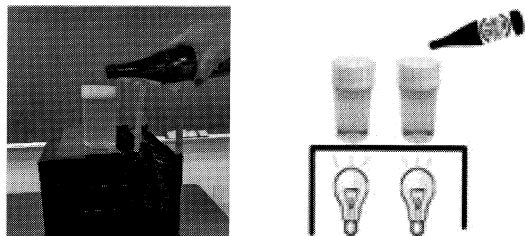


Fig. 1 The light transmission apparatus

高さでグラスに注いだ。泡がグラスの最上面に達した時を泡持ち時間の測定開始時とし、グラスの下方より照らす電球の光が、ビールの液面から見えた時を泡持ち時間の終点とした。

測定は1瓶1回のみとし、4~6瓶を使用し、最大値、最小値を除いた測定値の平均値を求めた。

結果

1. 麦芽リパーゼ諸性質の検討

麦芽（ビールキット用）を使用して、先ずリパーゼ活性測定条件を検討した。即ち、リン酸緩衝液 20mL に Fig. 2 に示す種々量の粉碎麦芽を添加してリパーゼ抽出液を調製した。同図に示すように、麦芽添加量の増大に伴い酵素活性の上昇が観察された。この結果から、緩衝液 20mL に対して粉碎麦芽 15g を添加して得られた抽出液を酵素剤として使用することにした。そこで、リパーゼ抽出液（麦芽 15g からの抽出液）



Fig. 2 Influence of malt concentration on the malt lipase activity

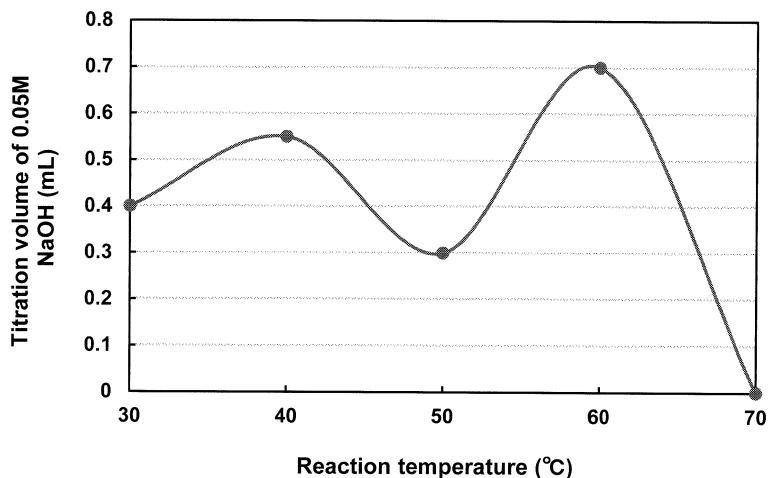


Fig. 3 Influence of reaction temperature on the malt lipase activity

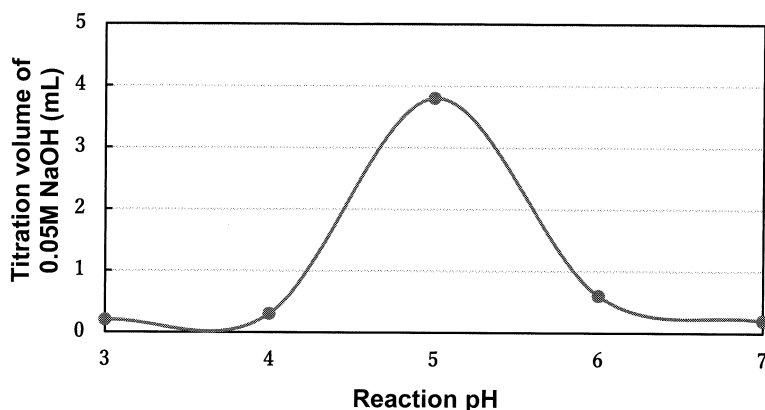


Fig. 4 Influence of reaction pH on the malt lipase activity

Table 1 Conditions of the lipase activity inhibition test with cetilistat

Origin of lipase	Concentration of enzyme	Volume of enzyme soln. (mL)	Volume of buffer soln. (mL)	Reaction temp.(°C)	Reaction pH	Addition amount of cetilistat soln. (mL)
microbe	50mg/50mL	1	3	50	7	1
malt	(extract from 15g malt)	4	0	50	7	1

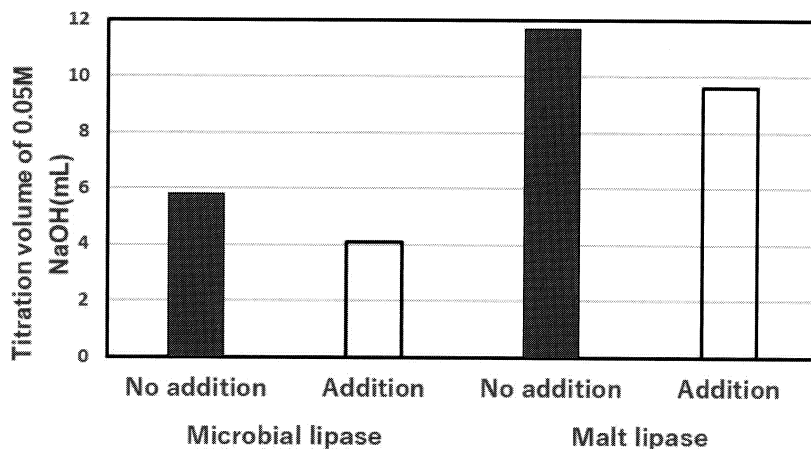


Fig. 5 Influence of cetilistat addition on the lipase activities

Each measurement was made without any blank under the conditions shown in Table 1.

を使用し、至適温度を調べた。Fig. 3に示すように麦芽リパーゼは40℃付近と60℃付近に至適温度を有し、60℃のほうがより強い活性を示した。

続いて麦芽の水抽出液（麦芽 15g/水 20mL）を使用して至適 pH を調べた。なお、反応温度は50℃で

行った。Fig. 4に示すように麦芽リパーゼの至適 pH は5.0付近であった。

2. 腭リパーゼ阻害剤セチリスタットのリパーゼ活性阻害試験

腭リパーゼ阻害剤として市販されているセチリスタ

Table 2 The content of free fatty acids in the wort (ale type)

Components identified	No addition		Addition of cetilistat	
	Peak area of TIC	Relative value to I.S.	Peak area of TIC	Relative value to I.S.
I.S.	1,016,277	1	612,086	1
Caproic acid (C6 : 0)	49,721	0.049	19,970	0.031
Caprylic acid (C8 : 0)	15,881	0.016	N.D.	
Capric acid (C10 : 0)	34,840	0.034	N.D.	
Lauric acid (C12 : 0)	N.D.		14,810	0.024
Palmitic acid (C16 : 0)	760,324	0.748	445,841	0.693
Oleic acid (C18 : 1)	65,043	0.064	118,354	0.193
Linoleic acid (C18 : 2)	227,444	0.224	N.D.	
		(100%)		(0%)
Sum of relative values		1.135		0.942
		(100%)		(83%)

TIC = Total Ion Chromatogram, I.S. = Internal Standard, N.D. = Not Detected

The values in parentheses indicate the relative % to the sample with no addition.

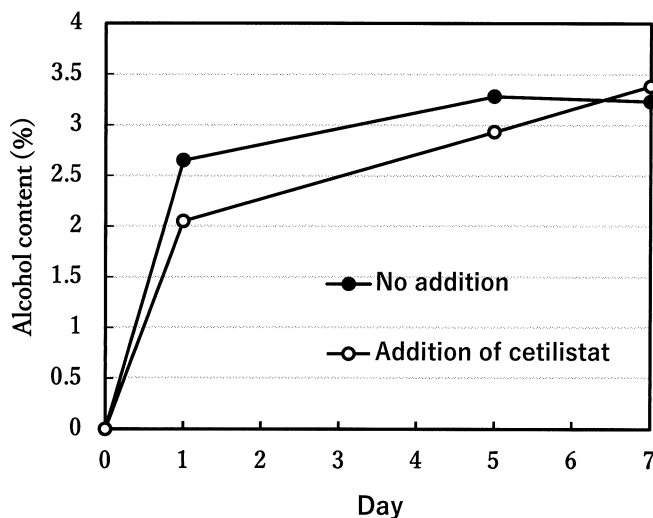


Fig. 6 Time course of the fermentation (ale type beer)

ットを使用して微生物リパーゼ、及び麦芽リパーゼに対する活性阻害効果を Table 1 に示す条件下で調べた。なお、セチリスタットは水不溶性なので、70℃のジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略）10 mL に 40 mg 溶解させて使用した。

Fig. 5 に示すように、微生物リパーゼ、麦芽リパーゼいずれもセチリスタット添加により活性が阻害された。

3. セチリスタットを使用したビールの試験醸造

セチリスタットによる麦芽リパーゼ活性阻害が検証できたので、仕込時に同阻害剤を使用してのビール醸

造試験を行った。

1L 規模の予備試験醸造で、仕込み時にセチリスタット溶液を添加することにより麦汁、若ビールの遊離脂肪酸含量、及びリノール酸含量の低減が確認できたので、8L 規模での試験醸造を行った。即ち、仕込水 4.7L にセチリスタット溶液 130mL (400mg/DMSO 100 mL) を添加し、無添加品を対照として試験醸造した。

麦汁の遊離脂肪酸含量を Table 2 に示した。セチリスタット溶液添加品では、遊離脂肪酸総量は 83% に減少した。また、リノール酸は無添加品では検出され

Table 3 The content of free fatty acids in the young beer (ale type)

Components identified	No addition		Addition of cetilistat	
	Peak area of TIC	Relative value to I.S.	Peak area of TIC	Relative value to I.S.
I.S.	811,488	1	997,222	1
Caproic acid (C6 : 0)	123,219	0.152	107,012	0.107
Caprylic acid (C8 : 0)	360,051	0.444	218,631	0.219
Capric acid (C10 : 0)	21,315	0.026	409	0.000
Palmitic acid (C16 : 0)	183,847	0.220	195,207	0.196
Sum of relative values		0.842 (100%)		0.523 (62%)

TIC = Total Ion Chromatogram, I.S. = Internal Standard, N.D. = Not Detected
The values in parentheses indicate the relative % to the sample with no addition.

Table 4 The content of free fatty acids in the bottled beer (ale type)

Components identified	No addition		Addition of cetilistat	
	Peak area of TIC	Relative value to I.S.	Peak area of TIC	Relative value to I.S.
I.S.	1,100,080	1	983,860	1
Caproic acid (C6 : 0)	136,976	0.125	107,132	0.109
Caprylic acid (C8 : 0)	431,884	0.393	327,694	0.333
Capric acid (C10 : 0)	30,142	0.027	5,796	0.006
Palmitic acid (C16 : 0)	317,278	0.288	128,824	0.131
Sum of relative values		0.833 (100%)		0.579 (69%)

TIC = Total Ion Chromatogram, I.S. = Internal Standard, N.D. = Not Detected
The values in parentheses indicate the relative % to the sample with no addition.

Table 5 Gaseous pressure of the bottled beer (ale type)

Sample	Gaseous pressure (kg/cm ² , 20°C)
No addition	3.0, 3.4
Addition of cetilistat	3.2, 2.5

たのに対し、セチリスタット溶液添加品では全く検出されなかった。

両麦汁の発酵経過を Fig. 6 に示したが、セチリスタット溶液添加品では、発酵がやや緩慢であった。

若ビール、後発酵後の瓶詰めビールの遊離脂肪酸含量を各々 Table 3, 4 に示した。何れもセチリスタット溶液添加品は無添加品に比べて脂肪酸含量の有意な減少が認められた。また、セチリスタット無添加品、添加品何れも、若ビールと後発酵後の瓶詰めビールでは遊離脂肪酸含量に大きな差は認められなかった。

瓶詰品のガス圧測定をしたところ、Table 5 に示す

通り、無添加品の方がガス圧はやや高かったが、両者間で大きな差は見られなかった。

続いて、瓶詰品の泡持ち時間を光透過法で測定をした。Table 6 に示す通り、変動係数は大きかったがセチリスタット溶液添加品は、無添加品に比べ有意に泡持ち時間が増加し、泡持ち安定性が向上した。

4. リパーゼ阻害活性を有する食品素材の探索

隣りパーゼ阻害剤セチリスタットの使用により、麦芽リパーゼ活性が阻害され、麦汁中のリノール酸を含む高級脂肪酸含量が減少し、その結果ビールの泡持ちが向上できることが明らかとなった。そこで、ビール醸造に使用可能な阻害活性を有する食品素材の探索を行った。

探索にあたり、麦芽リパーゼ活性を測定したところ、ビールキットのロット変更により、麦芽抽出液はほとんど活性を示さなかった。そこで、麦芽を粉碎した粉末品をそのまま酵素剤として使用する方法を検討した。

Table 6 Head retention time of the bottled beer (ale type)

Sample	Head retention time (sec.)					Standard dev.	Coefficient of variation (%)
	1	2	3	4	Ave. (relative %)		
No addition	30	42	36	53	40 (100)	9.8	24.4
Addition of cetilistat	98	128	146	93	116 (289)	25.1	21.6

The retention times excluding the maximum value and the minimum value are shown.

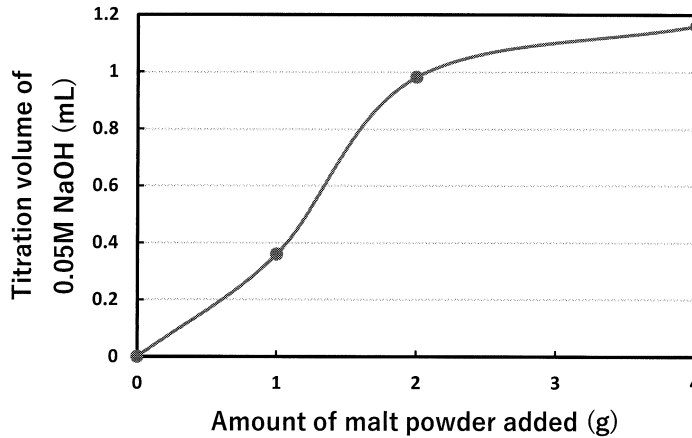


Fig. 7 Influence of the amount of added malt powder on the lipase activity

Fig. 7に示すように、活性測定用反応液 (pH5.0) への麦芽粉末品の添加量に比例してリパーゼ活性の増大が観察された。なお、反応時間は60分に変更して行った。この結果から、酵素活性測定液への麦芽粉末品添加量は2gと設定した。

麦芽粉末品をリパーゼ剤として使用する上記の設定条件下で、各種食品素材の活性阻害作用の有無を調べた。

①クロロゲン酸

クロロゲン酸 (10mg/mL 濃度水溶液) の阻害活性の有無を調べたが、阻害活性は認められなかった。

②茶カテキン

酵素反応液にカテキン水溶液 (4mg/mL) を加えて麦芽リパーゼに対する阻害活性を調べた。Fig. 8に示すように、カテキン溶液添加量に比例して2種のカテキン製品はリパーゼ活性の阻害を示した。この結果から、阻害活性のより強かった「ポリフェノン」を以下のビールの試験醸造に使用することとした。

5. 「ポリフェノン」を使用したビールの試験醸造

(1) エールタイプビール

1L 規模での予備試験で、仕込み時に「ポリフェノン」を添加することにより麦汁中の遊離脂肪酸含量の低減が確認できたので、8L 規模での試験醸造を行った。即ち、仕込水 4.7L に「ポリフェノン」1,080mg を溶解したのち、麦芽 1,887g を添加して同様に麦汁を調製した。Table 7に示すように、「ポリフェノン」添加により麦汁中の遊離脂肪酸含量、及びリノール酸含量は何れも約半減した。

この両麦汁を使用して発酵試験を行った。Fig. 9に示すように、「ポリフェノン」添加麦汁は無添加麦汁とほぼ同様の発酵経過を示した。

得られた若ビールを後発酵後、瓶詰めして成分分析を行った。Table 8に示すように、両者間で大きな差は認められなかった。また香味に関しても同様に大きな差は認められなかった。

瓶詰め品の泡持ち時間を光透過法で測定したところ、Table 9に示すように、「ポリフェノン」添加ビールでは無添加品に比べて約 10% 泡持ち時間が向上した。

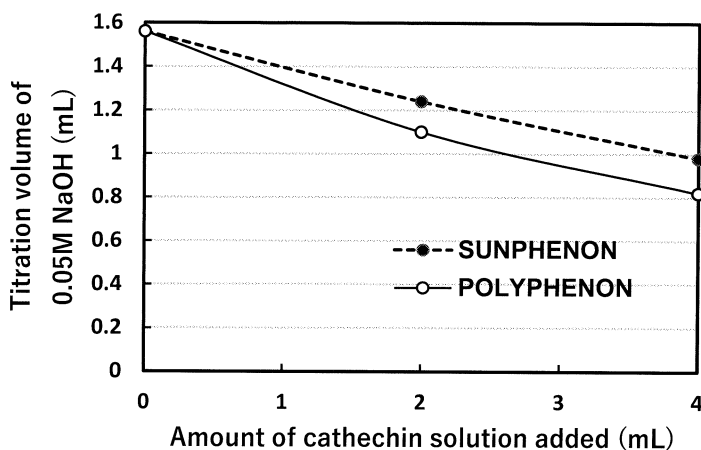


Fig. 8 Influence of the amount of added catechin solutions on the lipase activity

Table 7 The content of free fatty acids in the wort (ale type)

Components identified	No addition		Addition of POLYPHENON	
	Peak area of TIC	Relative value to I.S.	Peak area of TIC	Relative value to I.S.
I.S.	26,306,806	1	29,976,833	1
Palmitic acid (C16 : 0)	7,663,383	0.291	4,737,829	0.158
Linoleic acid (C18 : 2)	6,994,910	0.266	3,548,655	0.118
		(100%)		(44%)
Sum of relative values		0.557		0.276
		(100%)		(50%)

TIC = Total Ion Chromatogram, I.S. = Internal Standard, N.D. = Not Detected
 The values in parentheses indicate the relative % to the sample with no addition.

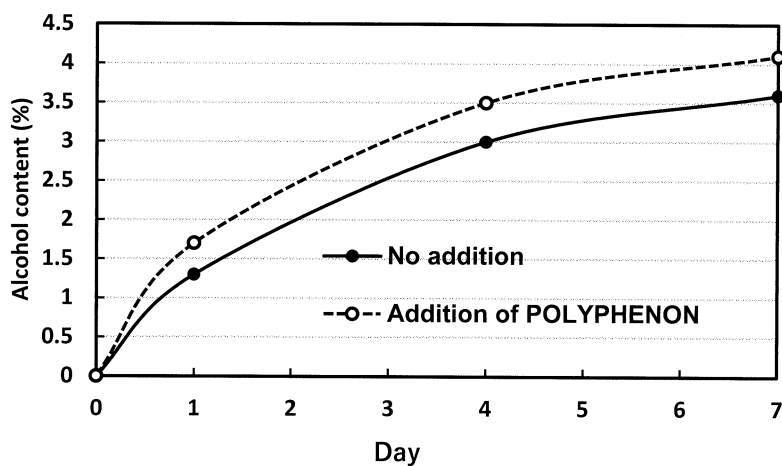


Fig. 9 Time course of the fermentation (ale type beer)

Table 8 Analysis results of the bottled beer (ale type)

Analyzed items	Addition of POLYPHENON	
	No addition	
Alcohol content (%)	3.6	4.1
Bitter unit	30	28
Gaseous pressure (kg/cm ² , 20°C)	2.0, 2.2	2.2, 2.7

(2) ピルスナータイプビール

「ポリフェノン」添加によりエールタイプビールでの泡持ち時間の増加が確認できたので、続いてピルスナータイプビールで8L規模での醸造・泡持ち試験を行った。エールタイプビールで実施した場合とほぼ同様に、麦芽1.9kgに対して仕込水6Lに「ポリフェノン」1,080mgを添加して試験醸造を行った。無添加品とほぼ同様の発酵経過を示したが、NIBEM法で測定

した瓶詰め品の泡持ち時間に両者間で差が見られなかった。エールタイプ用麦芽と異なる麦芽を使用したためと考え、「ポリフェノン」添加量を5倍量、および10倍量に増加して試験を行った。即ち、「ポリフェノン」5g、または10gを溶解した仕込水6Lに粉碎麦芽1.9kgをそれぞれ添加し、無添加品を対照としてビール醸造した。Fig. 10に示すように、「ポリフェノン」10倍量添加品は5倍量添加品と比べると発酵がやや緩慢であった。

上記の若ビールを後発酵後、瓶詰めを行い分析に供した。Table 10に示すように、「ポリフェノン」5倍量添加品では泡持ち増強効果は認められなかったが、10倍量添加品ではエールタイプビールの場合と同様に、泡持ち時間が約10%増加した。

考 察

麦芽リパーゼの至適温度を調べた結果、40℃と60

Table 9 Head retention time of the bottled beer (ale type)

Sample	Head retention time (sec.)					Standard dev.	Coefficient of variation (%)
	1	2	3	4	Average (Relative %)		
No addition	157	174			166 (100)	12.0	7.3
Addition of POLYPHENON	173	198	186	166	181 (109)	14.2	7.8

The retention times excluding the maximum value and the minimum value are shown.

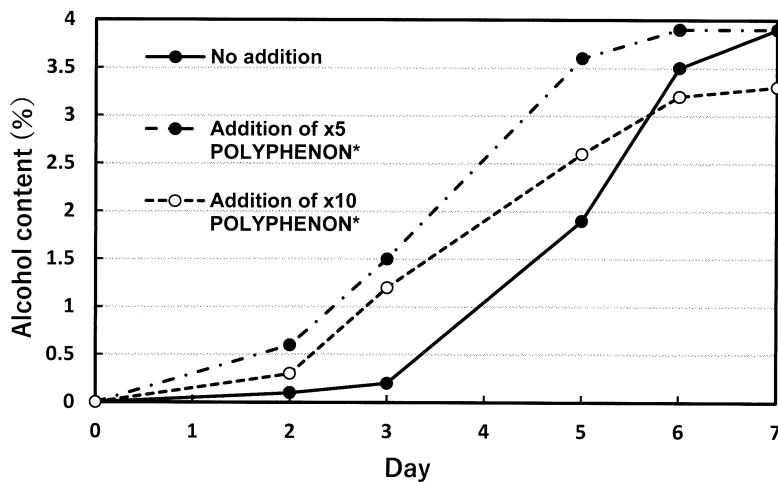


Fig. 10 Time course of the fermentation (pilsner type beer)

*: Relative amount compared to that used for the ale type beer

Table 10 Analysis results of the bottled beer (pilsner type)

Analyzed item	No addition	Addition of POLYPHENON	
		x5 the amount*	x10 the amount*
Alcohol content (%)	3.9	3.9	3.3
Bitter unit	21.4	23.4	17.0
Gaseous pressure (kg/cm ² , 20°C)	2.2	1.8	2.2
Head retention time (NIBEM method, sec)	249 (100%)**	139 (56%)**	280 (112%)**

* : Relative amount compared to that used for the ale type beer

** : The values in parentheses indicate the relative % to the sample with no addition.

℃に至適温度を有するという結果が得られた。この結果は P. Schwarz ら²⁶⁾の醗のリパーゼ活性は 57℃付近で最大を示し、67℃以上で急激に減少するという報告と良く一致する結果であった。

麦芽リパーゼ活性測定に当たって、麦芽の水抽出液を使用した場合と麦芽粉末品を使用した場合があった。前記した P. Schwartz ら²⁶⁾は麦芽リパーゼは膜結合型であり、水不溶性であると報告している。従って、水抽出が可能であった麦芽は「溶け」の進んだ麦芽であった可能性がある。

今回使用した腓リパーゼ阻害剤セチリスタットは、腓リパーゼのみならず、微生物リパーゼ、及び麦芽リパーゼも阻害することが新たに見出された。また、茶カテキンが麦芽リパーゼ活性を阻害することも新発見である。

ピルスナータイプビールの場合、「ポリフェノン」添加量をエールタイプビールの 10 倍量にした時に泡持ち時間の向上が観察された。添加量が増加した原因としては、使用した麦芽のリパーゼ活性がエールタイプビール用麦芽の活性よりも強かったことが考えられるが、この点についてはさらに確認する必要がある。なお、「ポリフェノン」5 倍量添加品では逆に泡持ち時間が低下したが、等量添加品では無添加品と泡持ち時間に差が無かったことから、量的な点から添加効果が現れなかったと推察している。

カテキンは茶抽出物であり、また麦芽 1.9kg に対する添加量は最大で 10g であることから、新酒税法でビールとして認可される副原料（添加量 5% 以下）に該当するものであり、実用性の高い副原料素材と考えられた。

また光透過法での泡持ち時間測定値の変動係数が大きかったが、市販の同一ロット品オールモルトビール 5 検体、及び発泡酒 4 検体の同法による測定値の変動係数はそれぞれ 2.5%、1.4%（データ未記載）であったことから、この主原因としてはハンドフィルターを使用しての瓶詰め充填によるガス圧のバラツキと考えている。

THOD の前駆体であるリノール酸含量の低減も確認されたが、THOD はカードボード臭の前駆物質であるので、カテキン添加による劣化臭低減効果についても今後さらに検討する必要がある。

要 約

麦芽リパーゼの諸性質を調べた結果、至適温度は 40℃と 60℃であり、至適 pH は 5 であった。

ビール仕込時に腓リパーゼ阻害剤セチリスタット、又は茶カテキン製品を添加することにより麦芽リパーゼ活性が阻害され、麦汁中のリノール酸を含む遊離脂肪酸含量が有意に減少し、また若ビール、及び後発酵後の瓶詰めビールでも遊離脂肪酸含量が減少した。

茶カテキン製品「ポリフェノン」を使用した場合、エールタイプビール、ピルスナータイプビール、何れも泡持ち時間を約 10% 向上させることが出来た。

謝 辞

NIBEM 法による瓶詰めビールの泡持ち時間測定にご協力をいただいたキリンホールディングス(株)飲料未来研究所に御礼申し上げます。

付 記

当論文は当校醸造発酵コースの下記の3年生が卒業研究の一部として実施した結果を、纏めたものである。ここに担当学生の名を記し、その努力に謝意を表する次第である。

2016年度：佐藤孝秀，石塚詳大，室井克也，石塚成記，大塚祥平

2017年度：内田祥平，池田 匠，塚本裕太，渡邊康太

2018年度：小糸 連，秋山 輝，竹内 遼，黒田勇斗

2019年度：村上征希，小林俊太郎，本目慈英，引間玄 越

2020年度：我妻 隼，飯田達揮，大浦颯人，嶋貫 秀

文 献

- 1) K. Asano and N. Hashimoto : *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd.*, No. 19, 9-16 (1976)
- 2) 鈴木渉 : 醸協, **91** (1), 8-14 (1996)
- 3) 蛸井潔 : 醸協, **111** (4), 185-203 (2016)
- 4) 特開 2015-223163, 起泡・泡持ち向上剤
- 5) 特開 2016-52327, ビールテイスト飲料及びその製造方法
- 6) 特開 2019-118283, ビールテイスト飲料
- 7) 特開 2020-103209, ノンアルコールビールテイスト飲料
- 8) 特開 2019-62836, 発泡性飲料及び発泡性飲料の泡持ち特性を向上させる方法
- 9) 特開 2020-10661, 発泡性ビールテイスト飲料及び発泡性ビールテイスト飲料の製造方法
- 10) 藪内精三 : 醸協, **75**, 273 (1980)
- 11) N. Kobayashi, S. Segawa, S. Umemoto, H. Kuroda, H. Kaneda, Y. Mitani, J. Watari and M. Takashio : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **60**, 37-41 (2002)
- 12) L. Narziss : *J. Inst. Brew.*, **92**, 346-353 (1986)
- 13) 小林直之, 金田弘拳, 越野昌平 : 醸協, **89**, 686-690 (1994)
- 14) M. Shrutz and W. Back : *Monatsch. Brau.*, 6-10 (2005)
- 15) 蛸井潔 : 醸協, **110**, 478-488 (2015)
- 16) N. Kobayashi, H. Kaneda, Y. Kano and S. Koshino : *J. Ferm. Bioeng.*, **76** (5), 371-375 (1993)
- 17) 安井哲二 : 醸協, **96** (2), 94-99 (2001)
- 18) N. Hirota, H. Kuroda, K. Takoi, T. Kaneko, H. Kaneda, I. Yoshida, M. Takashio, K. Ito and K. Takeda : *MBAA TQ.*, **43**, 131-135 (2006)
- 19) 中村剛 : 科学と生物, **54**, 212-215 (2016)
- 20) 北浦佳奈, 岩井和也, 福永泰司, 木村良太郎, 中桐理 : 第23回国際コーヒー科学会議講演要旨集, P61 (2010)
- 21) 卯川裕一, 堤坂裕子 : 生物工程, **93** (10), 634-636 (2015)
- 22) 小崎道夫, 柳田藤治編, 「酵素利用ハンドブック」(地人書館, 東京), 230 (1985)
- 23) K. D. Vries, : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **48**, 13-17 (1990)
- 24) ビール酒造組合, 改定BCOJビール分析法(日本醸造協会, 東京), 8.15 (2013)
- 25) ビール酒造組合, 改定BCOJビール分析法(日本醸造協会, 東京), 8.29 (2013)
- 26) P. Schwarz, P. Stanley and S. Solberg : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **60**, 107-109 (2002)