総 説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 74, No. 9, pp. 967~973, 2000]

抗酸化製造法の展開—ビール品質劣化の理論的解明からその応用まで—[†]

(2000 年度農芸化学技術賞受賞)

篠塚 健, 高塩仁愛, 金田弘孝, 山岸信久

(サッポロビール株式会社)

Key words: beer; radical reactions; radical scavengers; staling flavor; anti-oxidative mashing

はじめに

一般に、食品保存中の品質劣化としては、微生物汚染による劣化（腐敗）と食品成分の化学反応による品質変化がある。ビールにおいても例外ではなく、パッケージされたビールは、保存に伴い徐々に味や香りの変化、混濁物の出現、色の褐変が生じてしまう⁽¹⁾。これが「ビールはできたてのうまさが一番」といわれるゆえんであろう。ただし、現在のビール醸造においては、十分な微生物管理により微生物汚染による品質劣化は極めて少なく、もっぱら化学反応による品質変化が問題となる。醸造技術者は、これを「ビールの老化」と呼んで問題解決に力を注いできた。また、褐変、混濁は、長期間の保存や過度の空気混入に伴って現れる現象であり、近年では賞味期限の設定、工程改善などにより、市場において問題になることは少ない。したがって、ビールにとって最も大きな問題となる老化現象は香味の変化である。保存に伴い苦味の低下や甘い香味の増大により味のバランスが崩れるとともに、厚紙臭（カードボード臭）と呼ばれる特異な匂いが徐々に生成し、ビール本来の香味が損なわれてくる⁽²⁾（図1）。カードボード臭は、ビール香味の劣化の中でも最も重要な問題であり、*t*-2-ノネアルを中心とする閾値の極めて低い不飽和アルデヒド類が複雑に絡み合って形成していると推察されているが、最終結論には至っていない^(1, 3~5)。製造現場でのビールの老化、特

図1 ビール保存に伴う香味変化⁽²⁾

に香味の耐久性向上への取組みは貯酒工程、ろ過工程、充填工程を中心にビールへの酸素の接触を徹底的に防ぐ対策がほとんどであった。

近年では、製品ビール中の酸素量は1/10 ppmレベルにコントロールできるようになったにもかかわらず、保存に伴う品質劣化を完全には抑制できていない。したがって、消費者の鮮度志向に応えるためにも、より詳細なビール老化機構を解明し、それに基づくより効果的な老化防止方法の開発が待たれていた。

当社はビールの老化機構の解明に取組み、その成果を現場製造工程に応用して、ビール自体の抗酸化力を高める抗酸化製造法がビールの香味劣化防止に極めて有効なことを示して、全工場に本技術を導入した。以下、われわれが行った研究とその経過の概要について述べる。

1. ビール保存中の老化機構の解明

われわれは、ごく微量の酸素によって老化が進行す

[†] Development of "Sapporo's Anti-oxidative Beer Production System"—From Clarification of Beer Staling Mechanism to Its Application at Production Sites—Ken SHINOTSUKA, Masachika TAKASHIO, Hirotaka KANEDA, and Nobuhisa YAMAGISHI (Sapporo Breweries Ltd.)

図2 保存に伴うビールの品質劣化機構

ることに着目し、ラジカル反応の観点から老化機構の解明に着手した。スピントラップ剤を用いた ESR 実験より、ビール保存過程でフリーラジカルが生成することが明らかとなった^(6, 7)。また、ウミホタル・ルシフェリン類縁体を用いた化学発光実験により、ビール保存中の活性酸素生成が香味の劣化に大きな役割をもつことが明らかとなった⁽⁸⁾。そして、活性酸素生成に始まるフリーラジカル反応により、ビール苦味成分（イソフムロン類）やプロシアニジン類（カテキン、エピカテキン、プロシアニジン B3）などの分解、揮発性アルデヒド類の生成が確認された^(9~11)。以上の結果に基づき、ビール老化の主な反応として、活性酸素生成に始まるフリーラジカル反応を提案した（図 2）。製品ビール中にごく微量混入した酸素分子（ $^3\text{O}_2$ ）は、保存過程においてビール成分との反応により、活性酸素（ $\text{O}_2\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{OOH}$ 、 H_2O_2 ）を生成する。この $\text{O}_2\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{OOH}$ などは極めて高い反応性をもち、苦味成分、香気成分（アルコール類など）をはじめとするさまざまなビール中成分を直接、あるいは電子のやり取りにより間接的に酸化し、アルデヒド類（カードボード臭）の生成をもたらす。また、これら活性酸素はポリフェノール類も直接、間接的に酸化し、褐変化とともにフェノール・ラジカル（セミキノ・ラジカル）を生成し、タンパク質などとともにビール中金属類（Fe, Cu）と錯体形成（非ヘム鉄）をしながら重合を繰り返し、不溶化・混濁形成へと向かう。このようなラジカル反応は、ラジカル種が 1 分子たりとも生成すれば連鎖的に

次々に反応が進むため、ビール中の酸素量はごく微量でも存在すれば老化反応は進行することになる。従来ビールの劣化防止対策として、製品ビール中への酸素の混入を極力抑えてきたにもかかわらず、十分納得のいく効果がなかなか得られなかった原因はこのためと思われる。

また、われわれはビールが保存中にごく微弱な光を発していること（化学発光）を見いだした⁽¹²⁾。ビールの化学発光は、保存温度、保存期間の増大に伴って促進され、発光量と官能評価による香味劣化度とは良好な関係を示し、ビールの化学発光が老化と密接な関係をもつことが明らかになった⁽¹³⁾。そこで、化学発光機構を検討し、以下のような機構を提案した^(14~16)（図 2）。ビールの保存過程において、基底状態の酸素分子から生成する活性酸素によって開始されるフリーラジカル連鎖反応は、イソフムロン類、フェノール化合物などのビール中成分を酸化するが、この酸化分解過程で種々のエネルギー・リッチな励起化合物が生成する。イソフムロンの酸化分解においては、一重項酸素、励起カルボニルが、フェノール化合物の酸化分解においては、一重項酸素、励起フェノール酸化物（励起ヒドロキシ化合物）が生成する。これら励起化合物は不安定で、安定な基底状態に戻る際に過剰のエネルギーを光エネルギーとして放出する（発光）。つまり、ビール保存中のフリーラジカル反応によって、「ビールは光を発しながら老化する」といえる。

2. 仕込工程中の脂質酸化の研究

仕込工程中の原料由来不飽和脂肪酸の酸化もビール保存中のカードボード臭生成の原因となると報告されているが^(1,4)、その機構は明確にされていなかった。仕込工程中の脂質酸化機構としては、これまで麦芽中のリパーゼにより脂質からリノール酸、リノレイン酸などの不飽和脂肪酸が遊離した後、リポキシゲナーゼによる酵素的酸化や自動酸化によって脂肪酸ヒドロペルオキシドが生成する経路が考えられており⁽¹⁷⁾ (図3(A))、酵素的酸化、自動酸化のどちらが優位に起きているのかについては議論中であった。

われわれは、麦汁中脂質酸化生成物であるヒドロペルオキシドの HPLC-化学発光検出による分析法を開発し、ヒドロペルオキシドの挙動を追跡した^(18~21)。その結果、以下のような新たな脂質酸化機構を明らかにした (図3(B))。すなわち、製麦工程および糖化工程の初期段階で、大麦、麦芽中に存在するトリリノレインをはじめとする脂質中の不飽和脂肪酸がリポキシゲナーゼおよび自動酸化によって酸化されさまざまな脂質ヒドロペルオキシドを生成する。なお、リポキシゲナーゼによる酸化は自動酸化よりも優位に起こる。糖化工程の進行に伴う昇温によりリポキシゲナーゼは失活していくが、一方でリパーゼの作用により、脂質ヒドロペルオキシドからリノール酸ヒドロペルオキシドおよびリノレイン酸ヒドロペルオキシドなどの脂肪酸ヒドロペルオキシドが遊離する。また、われわれは脂肪酸ヒドロペルオキシド以降の反応についても、モノ、ジ、トリヒドロキシオクタデセン酸を生成する新たな酵素的反応経路を推察している⁽²²⁾。このうちジ、ト

リヒドロキシオクタデセン酸は最終ビールまで移行し、ビールを飲んだ際の渋味の残存感を増大させてキレを悪くするとともに、泡の安定性も悪くすることが確認された。以上のように、仕込工程中の麦芽由来の脂質分解酵素 (リポキシゲナーゼ、リパーゼなど) の挙動はビール品質にとって重要な役割を演じている。

3. 応用展開のための評価系構築

以上の理論によって、ビールの酸化による劣化抑制には最終工程での酸素混入防止策に加えて、ビール自体にフリーラジカル反応への耐性をつけることが有効であると期待された。すなわち麦芽、ホップなどの原料由来のポリフェノール類、発酵によって生成する硫化物などの還元性物質をラジカル捕捉剤として温存すれば香味安定性が増すことが可能となる。

そこで、醸造条件とビール香味安定性の関係を明らかにし、香味安定性を向上させる製造技術の構築を目指して全社的に研究を開始した。

前述のとおり、従来酸化がビールの香味安定性に良くないことは周知であったが、仕込に着目した工程改良が遅れていた理由の一つは、抗酸化的な条件での現場試験を評価する指標が不十分で信頼できる試験ができなかったためである。そのため、われわれは現場技術構築の調査に先立って工程管理指標として①主に還元力を迅速に測定する分析系、②老化香味を的確に評価するための官能評価系、および③老化に伴う物質挙動を追跡するための HPLC、GC-MS を用いた分析系を検討した。その結果、①に関しては、Chapon 法 (3価の鉄を還元する主としてポリフェノール由来の還元力を測定)⁽²³⁾、MEBAK 法 (2,6-ジニトロフェノール・インドフェノールの退色速度測定、主としてメイラー

図3 仕込工程中の脂質酸化機構

(A) 従来考えられてきた経路; (B) 当社が提案した経路

図4 保存ビール中のフルフラール濃度と香味老化度

ド反応生成物由来の還元力を測定)⁽²⁴⁾を現場測定に適した改変を施し, ②に関してはプロファイル法⁽²⁵⁾を中心として, また③に関しては老化に関する官能評価と関連の高いフルフラールと5-ヒドロキシメチル・フルフラール(5-HMF)を現場工程管理指標として選定した⁽²⁶⁾(図4)。

4. 抗酸化仕込法のパイロット設備などでの検証

本格的な現場技術への展開にあたって, 多方面から抗酸化的仕込条件のビール香味老化との関係解析を試みた。

前述のように, 麦芽, ホップなどの原料由来のポリフェノール類は, 一般に極めて酸化されやすく仕込工程中での酸化, 加熱で縮重合を起こすことは周知である。ラジカル捕捉剤として, これらの物質を温存するためにはこの酸化反応を抑制することが重要と思われる。この観点から, 仕込工程全般にわたって酸化を抑えることができれば, この目的に適うものと推論された。そこで, われわれは, このような仕込法を抗酸化仕込法と呼びその効果を検証することとした。

まず, 400 L のパイロット設備を用いて, 炭酸ガス環境下で極力酸素との接触を断った仕込試験を行い, 仕込時の抗酸化的条件の差が工程上の分析値の差としてどのように改変 Chapon 法などで評価できるかを調べた。その結果, 従来仕込法(非抗酸化仕込法)に比べ抗酸化仕込法は仕込工程の段階から還元力が高く, その差は冷麦汁から発酵, 貯酒, さらにろ過後のビールにまで保持された^(27, 28)(図5)。また, 抗酸化仕込法で製造したビールは, 明らかに保存中のフルフラ

図5 醸造工程中の還元力の消長

図6 抗酸化仕込法によるビール中フルフラール増加速度抑制効果

ール, 5-HMF の増加が抑制されている⁽²⁶⁾, さらに保存後の官能評価でも抗酸化仕込法によるビールの老化抑制が認められた⁽²⁵⁾(図6)。

以上の実験結果から, 仕込における酸化抑制はビール中のポリフェノールなどの還元性物質(抗酸化物質)を増加させ, ラジカル反応を抑制してビールの香味耐久性を向上させることが確認された^(28~30)。

以上で検証されたように, 現場仕込において極力抗酸化的な仕込条件を構築する必要がある。従来の仕込では, 設備および工程操作にこのような配慮は徹底していなかったもので, 基本的な工程操作から見直しを行った。

最初に仕込での攪拌強度の影響を調査した⁽²⁸⁾。仕込工程の攪拌強度は, マイシェ(もろみ)の酸化条件に大きく関与すると考えられる。そこで, 実験室の醸造設備を用いて仕込槽攪拌速度を変更した仕込を行った

図7 攪拌数の冷麦汁還元力に及ぼす影響

図8 脱酸素水仕込によるビールの還元力および香味老化抑制効果例 (37℃ 1週間保存後評価)

ところ、各還元力指標は攪拌速度に影響され、マイシェ、麦汁は極めて酸化されやすく、仕込槽の攪拌制御が仕込での酸化防止において重要であることが示された (図7)。

次に脱酸素水仕込法を検討した⁽³¹⁾。仕込用水が持ち込む酸素の影響を、400 L スケールのパイロット設備を用い、仕込用水に脱酸素水を使用した仕込試験で調査した。その結果、麦汁、ビールの還元力指標、官能評価による香味耐久性評価とも対照に比べ明らかに向上した (図8)。

5. 全工場への展開 (還元力指標による工程最適化)

以上の試験結果を基に、先に確定した工程管理指標を用いて、工場現場への技術の展開を図った。まず、仕込設備が異なる3工場での還元力の消長を調査し、それを前述パイロット設備での抗酸化的仕込の場合と比較した。その結果、還元力において工場間で若干の差異が認められたが、それらの差よりもパイロット設備との差が大きく、工場の現状には抗酸化的な観点からなお改善の余地があることが示された (図9)。そこで、全社的に工場の仕込を中心に、各設備および工程の抗酸化的な最適条件への改善を実施した。

多くの試験の結果、抗酸化的に改善の必要性が認められた設備および工程は、仕込工程においては麦芽の粉碎設備 (湿式、連続式、乾式)、原料の投入方法、仕込攪拌機の形状、攪拌強度、マイシェ (もろみ) や麦

図9 工場仕込工程の還元力による比較 (改善前)

汁の容器・設備間の移送方法、配管形状、取り付け位置などであった。詳細は避けるが、工場によっては粉碎機を湿式より抗酸化的な乾式に設備変更し、攪拌は可能な限り緩やかな制御とし、もろみや麦汁の容器間移送は、従来容器の上から空気をまきこみながら移送していたのを底-底間で静かに行うなどの改善を実施した⁽³²⁾。また、脱酸素水仕込も可能とした。

6. 抗酸化製造法による香味耐久性の向上効果

ある工場の改善実施前後の効果例を図10に示す。この例では、20℃保存で、従来法が1カ月で達した老化レベルに、抗酸化製造法では約1.6カ月後に達している。約20日間の鮮度維持期間の延長が得られている。また、麦芽使用比率の少ない発泡酒でも同様の香味耐久性向上効果が認められた。さらに抗酸化製造法は、保存に伴う香味の安定性を向上させるととも

図10 工場改善によるビール香味老化抑制効果例

に、新鮮なビールにおいても、香味などの品質向上に寄与している⁽³³⁾ (図11)。

7. 製品輸送上の改善策

当社は、製品を工場から消費者に配達するまでの輸送中の問題にも取り組んだ。真夏における輸送試験により、直射日光による日光臭を避けるための有蓋トラックでは、場所によっては罐内ビール液度が45℃まで上昇する場合があることが判明した。われわれは製品の温度履歴が香味老化に及ぼす影響を調査し、いったん高温にさらされた製品は、高温を履歴しない製品に比べ、その後の通常の保存状態において香味老化速度が加速されることを明らかとした (図12)。この結果に基づき、車内温度を一定に保つ振動吸収板付きの定温輸送トラックを開発したほか、非有蓋車には特別な断熱シートを開発導入して輸送中の品質劣化を極

図12 夏場定温輸送によるビール香味老化抑制効果例

力抑制する施策を全国的に実施して効果を上げている。

おわりに

以上のように、当社はビールの品質劣化機構解明の研究から抗酸化製造法を開発して、従来の対策に加えて仕込設備と工程操作を最適化し、主として原料のもつ自然力を活かして自然食品としてのビールの品質を向上させることができた。貯酒以降の工程での酸素接触のさらなる減少は可能としても、コスト的に多大の負荷が必要なため、現状がほぼ限界に近いと思われる。このことから、工程の川上に溯ってビール自体に香味耐久力をつける抗酸化製造法の意義は大きいといえよう。ビールの香味安定性の観点から発酵工程の関与も重要で、研究を進めているが今回の報告からは

(B)	従来製造	抗酸化製造
THOD含量(mg/l)	8.7	> 6.2
渋味強度	++	++
渋味残存性	++	> + *
キレ	+	< +++ **
濃醇さ	++	++
泡安定性 (FCT値)	128	< 138

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

図11 抗酸化製造による発泡酒の品質向上
(A) 30℃ 1 カ月保存に伴う香味の老化; (B) 新鮮段階での香味、泡安定性

省いた。ビールの老化に関しては未だ不明な点もあり、より新鮮なビールを消費者に届けるために、今後ともさらに研究を進めていきたい。

本研究のうち基礎理論の研究を行うに当たり、終始多大なるご指導ご鞭撻をいただいた名古屋大学の川岸舜朗名誉教授および大澤俊彦教授、また東京大学の山崎素直教授、大久保 明助教授、山形テクノポリス財団生物ラジカル研究所の大矢博昭副所長、北海道大学の棟方正信教授をはじめ多くの先生方に深謝申し上げます。

なお、本研究開発は、当社醸造技術研究所の荒木茂樹、古庄重樹、木村達二、小林直之、前羽英雄、中江教行、中村義幸、清水千賀子ほかの研究者ならびに多くの工場技術者の協力によって達成されたことを付記させていただきます。

- (1) M. Kamimura and H. Kaneda: Shelf-life of beer. In *Shelf Life Studies of Foods and Beverages*, ed. by G. Charalambous, Elsevier, New York, 1993, pp. 821-889.
- (2) C. E. Dalglish: Eur. Brew. Conv., Proc. 16th Congr., Amsterdam, pp. 623-659 (1977).
- (3) N. Hashimoto: *Tech. Rep. of Kirin*, **31**, 19-32 (1988).
- (4) M. Kamimura and H. Kaneda: Off-flavors in beer. In *Off-Flavors in Foods and Beverages*, ed. by G. Charalambous, Elsevier, New York, 1992, pp. 433-472.
- (5) L. Narziss: *J. Inst. Brew.*, **92**, 346-353 (1986).
- (6) H. Kaneda, Y. Kano, T. Osawa, N. Ramarathnam, S. Kawakishi, and K. Kamada: *J. Food Sci.*, **53**, 884-888 (1988).
- (7) H. Kaneda, Y. Kano, T. Osawa, S. Kawakishi, and K. Kamada: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **47**, 49-53 (1989).
- (8) H. Kaneda, Y. Kano, T. Osawa, S. Kawakishi, and S. Koshino: Eur. Brew. Conv., Proc. 23rd Congr., Lisbon, pp. 433-440 (1991).
- (9) H. Kaneda, Y. Kano, M. Kamimura, T. Osawa, and S. Kawakishi: *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1363-1367 (1990).
- (10) H. Kaneda, Y. Kano, T. Osawa, S. Kawakishi, and M. Kamimura: *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1909-1912 (1990).
- (11) H. Kaneda, Y. Kano, S. Koshino, and H. Ohya-Nishiguchi: *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2102-2107 (1992).
- (12) H. Kaneda, Y. Kano, M. Kamimura, T. Osawa, and S. Kawakishi: *J. Food Sci.*, **55**, 881-882 (1990).
- (13) H. Kaneda, Y. Kano, M. Kamimura, T. Osawa, and S. Kawakishi: *J. Food Sci.*, **55**, 1361-1364 (1990).
- (14) H. Kaneda, Y. Kano, T. Osawa, S. Kawakishi, and M. Kamimura: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2165-2166 (1990).
- (15) H. Kaneda, Y. Kano, M. Kamimura, T. Osawa, S. Kawakishi, and S. Koshino: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 70-75 (1994).
- (16) H. Kaneda, N. Kobayashi, Y. Tsuchiya, M. Mune-kata, and S. Koshino: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 163-168 (1994).
- (17) 吉田重厚: 醸造協会誌, **87**, 341-346 (1992).
- (18) N. Kobayashi, H. Kaneda, Y. Kano, and S. Koshino: *J. Inst. Brew.*, **99**, 143-146 (1993).
- (19) N. Kobayashi, H. Kaneda, Eur. Brew. Conv., Proc. 24th Congr., Oslo, pp. 405-412 (1993).
- (20) N. Kobayashi, H. Kaneda, Y. Kano, and S. Koshino: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 371-375 (1993).
- (21) N. Kobayashi, H. Kaneda, Y. Kano, and S. Koshino: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 141-145 (1994).
- (22) 金田弘孝, 小林直之, 篠塚 健: バイオサイエンスとインダストリー, **57**, 33-34 (1999).
- (23) L. Chapon: *J. Inst. Brew.*, **99**, 49-56 (1993).
- (24) 2.16 Reduktionvermoegen Brautechnische Analysenmethoden, In *Band II, Methodensammlung der Mitteleuropaeischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK)*, ed. by F. Drawert, Selbstverlag der MEBAK (Freising), 1987, pp. 96-98.
- (25) S. Furusho, N. Kobayashi, M. Nakae, M. Takashio, T. Tamaki, and K. Shinotsuka: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, **36**, 163-166 (1999).
- (26) C. Shimizu, Y. Nakamura, K. Miyai, M. Takashio, and K. Shinotsuka: Am. Soc. Brew. Chem. Ann. Meeting, Boston, June 23, 1998; *ASBC Newsletter*, **58**(2), 18 (1998).
- (27) M. Takashio, T. Kimura, S. Araki, S. Furusho, H. Kaneda, N. Kobayashi, H. Maeba, K. Miyai, N. Nakae, Y. Nakamura, C. Shimizu, T. Tamaki, and K. Shinotsuka: Am. Soc. Brew. Chem. Ann. Meeting, Boston, June 23, 1998; *ASBC Newsletter*, **58**(2), 18 (1998).
- (28) T. Kimura, S. Araki, Y. Nakamura, C. Shimizu, M. Takashio, and K. Shinotsuka: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, **37**, 73-78 (2000).
- (29) 荒木茂樹: 醸造協会誌, **94**, 95-101 (1999).
- (30) S. Araki, T. Kimura, C. Shimizu, S. Furusho, M. Takashio, and K. Shinotsuka: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57**, 34-37 (1999).
- (31) 木村, 荒木, 清水, 古庄, 高塩, 篠塚: 日本農芸化学会 2000 年度大会 (東京) 講演要旨集, **3E144a**, p. 278 (2000).
- (32) K. Maeda: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, **36**, 55-59 (1999).
- (33) N. Kobayashi, H. Kaneda, H. Kuroda, J. Watari, T. Kurihara, and K. Shinotsuka: *J. Biosci. Bioeng.*, in press.