

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-135277

(P2012-135277A)

(43) 公開日 平成24年7月19日(2012.7.19)

(51) Int.Cl.

C12C 5/02 (2006.01)

F1

C12C 5/02

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2010-290806 (P2010-290806)
(22) 出願日 平成22年12月27日 (2010.12.27)(71) 出願人 307027577
麒麟麦酒株式会社
東京都中央区新川二丁目10番1号
(74) 代理人 100117787
弁理士 勝沼 宏仁
(74) 代理人 100091487
弁理士 中村 行孝
(74) 代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
(74) 代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
(74) 代理人 100143971
弁理士 藤井 宏行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビール様飲料の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 微生物汚染のリスクが低いビール様飲料およびその製造方法の提供。

【解決手段】 本発明によれば、ビール様飲料の製造方法であって、酸の添加工程を含んでなり、かつ、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制された製造方法が提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビール様飲料の製造方法であって、酸の添加工程を含んでなり、かつ、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制された製造方法。

【請求項 2】

ビール様飲料がビール様発酵アルコール飲料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ペクチネイタス属菌がペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

製造された飲料中の酸の量が、飲料を下記分析条件：

< 高速液体クロマトグラフィ分析条件 >

カラム：C 18 オクタデシルカラム（粒径 5 μm × 内径 4.0 mm × カラム長 250 mm）

移動相組成：蒸留水 27.0% (v/v) ・メタノール 72.0% (v/v) ・リン酸 1.0% (v/v)

移動相流速：毎分 1 ml（流速一定）

検出波長：270 nm

HPLC 分析用試料中に含まれるフェニルカルコンの量：内部標準物質 フェニルカルコン 12 mg と、リン酸メタノール溶液（リン酸：メタノール = 40 ml : 400 ml）

440 ml との混合溶液の 1 ml 中に含まれるフェニルカルコンの量により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、フェニルカルコンのピーク面積に対する酸のピーク面積の比（酸内標比）が 0.081 超 1.00 未満となるように酸を添加する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

酸の添加工程が発酵前液のワールプールタンク（WPT）にホップを添加する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ペクチネイタス属菌の増殖を抑制する量の酸を含む、ビール様飲料。

【請求項 7】

ビール様飲料がビール様発酵アルコール飲料であり、

ペクチネイタス属菌がペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスであり、

製造された飲料中の酸の量が、飲料を請求項 4 に記載の分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が 0.081 超 1.00 未満となる量である、請求項 6 に記載の飲料。

【請求項 8】

ビール様飲料に酸を添加することを特徴とする、ペクチネイタス属菌の増殖抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酸を添加するビール様飲料およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物の中には、ビール中で生育することができるものが存在し、それらはビール混濁菌と呼ばれる。例えば、ペクチネイタス・フリシンジェンシスおよびペクチネイタス・セレピシフィラスもビール混濁菌であり、ビールを濁らせ、硫黄臭を発生し、ビール品質を著しく低下させる場合がある。

【0003】

10

20

30

40

50

ビールには爽快な苦味と香りを付与するためにホップが使用されるが、ホップ中の成分である 酸は、微生物の増殖を抑制できることも知られている。

【0004】

しかしながらこれまでに、この 酸が、ビール混濁菌、例えばペクチネイタス属菌に対して抗菌活性を有することについてはまったく知られておらず、また飲料中の 酸の含有量と、ペクチネイタス属菌との増殖関係も、まったく知られていなかった（例えば、特許文献1および特許文献2参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】W099/9842号公報

【特許文献2】特開平11-221064号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、微生物汚染のリスクが低いビール様飲料およびその製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、特定量の 酸が製造飲料に存在するようにビール様飲料を製造すると、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制されることを見出した。本発明はこの知見に基づくものである。

【0008】

すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) ビール様飲料の製造方法であって、 酸の添加工程を含んでなり、かつ、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制された製造方法。

(2) ビール様飲料がビール様発酵アルコール飲料である、(1)に記載の方法。

(3) ペクチネイタス属菌がペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスである、(1)または(2)に記載の方法。

(4) 製造された飲料中の 酸の量が、飲料を下記分析条件：

<高速液体クロマトグラフィ分析条件>

カラム：C18オクタデシルカラム（粒径5 μ m \times 内径4.0mm \times カラム長250mm）

移動相組成：蒸留水27.0% (v/v)・メタノール72.0% (v/v)・リン酸1.0% (v/v)

移動相流速：毎分1ml（流速一定）

検出波長：270nm

HPLC分析用試料中に含まれる フェニルカルコンの量：内部標準物質 フェニルカルコン12mgと、リン酸メタノール溶液（リン酸：メタノール=40ml：400ml）

440mlとの混合溶液の1ml中に含まれる フェニルカルコンの量

により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、フェニルカルコンのピーク面積に対する 酸のピーク面積の比（酸内標比）が0.081超1.00未満となるように酸を添加する、(1)～(3)のいずれか一項に記載の方法。

(5) 酸の添加工程が発酵前液のワールプールタンク（WPT）にホップを添加する工程を含む、(1)～(4)のいずれか一項に記載の方法。

(6) ペクチネイタス属菌の増殖を抑制する量の 酸を含む、ビール様飲料。

(7) ビール様飲料がビール様発酵アルコール飲料であり、

ペクチネイタス属菌がペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスであり、

製造された飲料中の 酸の量が、飲料を(4)に記載の分析条件により高速液体クロマ

10

20

30

40

50

トグラフィ分析に付した場合、酸内標比が0.081超1.00未満となる量である、(6)に記載の飲料。

(8)ビール様飲料に酸を添加することを特徴とする、ペクチネイタス属菌の増殖抑制方法。

【0009】

本発明の製造方法は、微生物汚染のリスクが低いビール様飲料を提供できる点で有利である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】 酸の高速液体クロマトグラフィ分析チャートを表す。

10

【発明の具体的説明】

【0011】

ビール様飲料の製造方法

本発明によれば、ビール様飲料の製造方法において、ペクチネイタス属菌の増殖を抑制する量の酸を添加することによりビール様飲料中のペクチネイタス属菌の増殖を抑制することが可能となる。すなわち、本発明によれば、ビール様飲料の製造方法であって、酸の添加工程を含んでなり、かつ、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制された製造方法が提供される。

【0012】

本発明において「ビール様飲料」とは、通常にビールを製造した場合、すなわち、酵母等による発酵に基づいてビールを製造した場合に得られるビール特有の味わい、香りを有する飲料をいい、例えば、ビール、発泡酒、リキュール等の発酵麦芽飲料や、完全無アルコール麦芽飲料等の非発酵麦芽飲料が挙げられる。また、ビール様飲料である限り、麦芽飲料に限定されるものではない。

20

【0013】

本発明の製造方法では、製造飲料においてペクチネイタス属菌の増殖が抑制されるように酸を添加することができる。ここで、酸とは、ホップに含まれる成分であり、具体的には図1の高速液体クロマトグラフィ分析チャート中に示された酸ピークに対応する成分を意味する。

【0014】

30

この酸の取得源は特に限定されるものではなく、市販のもの、合成して得られたもの、あるいは天然物から単離・精製されたものいずれを用いてもよい。酸は、例えばホップから調製することができる。また、酸は後熟ホップから調製してもよい。ホップや後熟ホップからの酸の調製方法は、特に限定されるものではないが、例えば、ホップや後熟ホップをエタノールに浸漬させた後、遠心し、遠心後の上清を酸抽出液としてもよい。ここで、後熟ホップとは、原料煮沸工程時に用いるホップを、収穫後、望ましくない酸化臭成分や樹脂様臭などの生成を有意に抑制、制限させた条件下において熟成させ、ホップに含まれる香気成分の生成のための酸化反応を有意に促進させて、ホップ中に含まれる香気成分を増加させたホップであり、具体的には、収穫後乾燥させたホップ毬花を、収穫後10~20の中低温下で、3ヶ月以上熟成したホップである。

40

【0015】

本発明の製造方法における酸の添加時期は、製造飲料にペクチネイタス属菌の増殖が抑制される程度の量の酸が含まれる限り、ビール様飲料の製造工程のいずれの時点で添加してもよい。

【0016】

本発明の製造方法における酸の添加態様は、製造飲料にペクチネイタス属菌の増殖が抑制される程度の量の酸が含まれる限り特に限定されるものではなく、酸を発酵前液や発酵液にそのまま添加しても、酸を含有するホップを発酵前液に添加してもよい。すなわち、酸やホップをビール様飲料の製造工程のいずれかの時点で添加し、ホップの場合にはホップに含まれる酸が抽出され、結果的にビール様飲料中に酸が存在する状態

50

としてもよい。

【0017】

本発明において「ペクチネイタス属菌の増殖が抑制される」とはペクチネイタス属菌を植菌したときに一定期間経過後に初期植菌濃度が減少するような場合を意味する。例えば、実施例に記載したように、 1.0×10^4 CFU/ml（初期植菌濃度）レベルのペクチネイタス属菌を植菌し、14日間30 で処置した後、生菌数を測定し、生菌数が初期植菌濃度を下回ったかどうかを指標に「ペクチネイタス属菌の増殖が抑制される」か否かを評価することができる。

【0018】

本発明の製造方法により製造される飲料が、例えば、発酵麦芽飲料である場合には、少なくとも水、麦芽、およびホップを含んでなる発酵前液を発酵させることにより製造することができる。すなわち、麦芽等の醸造原料から調製された麦汁（発酵前液）に発酵用ビール酵母を添加して発酵を行い、所望により発酵液を低温にて貯蔵した後、ろ過工程により酵母を除去することにより、本発明による発酵麦芽飲料を製造することができる。ここで、発酵前液の調製に当たっては、後述のようにペクチネイタス属菌の増殖がさらに抑制されるような量の 酸が発酵飲料に含まれるようにホップを添加してもよい。

10

【0019】

上記製造手順において麦汁の作製は常法に従って行うことができる。例えば、醸造原料と水の混合物を糖化し、濾過して、麦汁を得、その麦汁を煮沸し、煮沸した麦汁を冷却することにより麦汁を調製することができる。ホップは、麦汁を煮沸する前、麦汁を煮沸した後、あるいは麦汁を煮沸中に添加することができる。

20

【0020】

本発明の製造方法が発酵麦芽飲料の製造方法である場合には、ホップ、麦芽以外に、米、とうもろこし、こうりゃん、馬鈴薯、でんぷん、糖類（例えば、液糖）等の酒税法で定める副原料や、タンパク質分解物や酵母エキス等の窒素源、香料、色素、起泡・泡持ち向上剤、水質調整剤、発酵助成剤等のその他の添加物を醸造原料として使用することができる。また、未発芽の麦類（例えば、未発芽大麦（エキス化したものを含む）、未発芽小麦（エキス化したものを含む））を醸造原料として使用してもよい。得られた発酵麦芽飲料は、（i）減圧若しくは常圧で蒸留してアルコールおよび低沸点成分を除去するか、あるいは（ii）逆浸透（RO）膜にてアルコールおよび低分子成分を除去することによって、非アルコール発酵麦芽飲料とすることもできる。

30

【0021】

本発明の製造方法により製造される飲料が麦や麦芽を使用しないビール様発酵飲料である場合には、発酵麦芽飲料の製造手順に準じて、少なくとも水およびホップを含んでなる発酵前液を発酵させることにより製造することができる。発酵前液には、水、ホップの他に炭素源（例えば、液糖などの糖類）、窒素源（例えば、タンパク質分解物や酵母エキスなどのアミノ酸供給源）を添加することができ、必要に応じて、香料、色素、起泡・泡持ち向上剤、水質調整剤、発酵助成剤等のその他の添加物等を添加することができる。得られたビール様発酵飲料は、（i）減圧若しくは常圧で蒸留してアルコールおよび低沸点成分を除去するか、あるいは（ii）逆浸透（RO）膜にてアルコールおよび低分子成分を除去することによって、非アルコール・ビール様発酵飲料とすることもできる。ここで、発酵前液の調製に当たっては、後述のようにペクチネイタス属菌の増殖がさらに抑制されるような量の 酸が発酵飲料に含まれるようにホップを添加してもよい。

40

【0022】

本発明の好ましい態様によれば、 酸の添加工程が発酵前液の煮沸終了後にワールプールタンク（WPT）にホップを添加する工程を含む方法である。発酵前液の煮沸終了後にワールプールタンク（WPT）にホップを添加する工程は、煮沸終了直後にWPTにホップを添加してもよいし、煮沸終了後、所定の時間経過後、例えば煮沸終了後、1～60分経過後にWPTにホップを添加してもよい。 酸の添加工程がこのような工程を含むことにより、飲料中の 酸の量を増加させることができ、その結果として、ペクチネイタス属

50

菌の増殖をさらに抑制することが可能となる。

【0023】

本発明の好ましい態様によれば、添加するホップは後熟ホップであってもよいが、非後熟ホップであることが好ましい。

【0024】

本発明の好ましい態様によれば、ビール様飲料はビール様発酵アルコール飲料である。発酵アルコール飲料は、一般的にパス工程などの滅菌工程がないため、本発明の方法が特に有用である。ここで、発酵アルコール飲料とは酵母により発酵して得られた飲料を意味し、アルコールは発酵により得られても良いし、さらにアルコールを添加して作成しても良い。ビール様発酵アルコール飲料としては、例えば、ビール、発泡酒、雑酒、リキュール類、スピリッツ類、および低アルコール麦芽発酵飲料が挙げられる。

10

【0025】

本発明の方法により増殖が抑制されるペクチネイタス属菌は、本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、好ましくはペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスであり、より好ましくはペクチネイタス・フリシンジェンシスである。本発明の製造方法により製造された飲料はこれらの菌の増殖を抑制することができる。

【0026】

本発明の方法により製造されるビール様飲料中の 酸の含有量は、公知のいずれの方法により測定してもよいが、好ましくは高速液体クロマトグラフィ（HPLC）分析により測定することができる。

20

【0027】

ビール様飲料中の 酸の含有量を測定するための高速液体クロマトグラフィの分析条件としては、例えば、以下の条件を用いて行うことができるが、高速液体クロマトグラフィに使用されるカラムは逆相カラムであれば特に限定されないが、C18オクタデシルカラム（粒径5 μm × 内径4.0 mm × カラム長250 mm）が好ましい。C18オクタデシルカラムとしては、例えば、Nucleosil 100-5 C18（粒径5 μm × 内径4.0 mm × カラム長250 mm）（ジーエルサイエンス株式会社製）が挙げられる。

【0028】

< 高速液体クロマトグラフィ分析条件 >

30

カラム：C18オクタデシルカラム（粒径5 μm × 内径4.0 mm × カラム長250 mm）

移動相組成：蒸留水27.0% (v/v) ・ メタノール72.0% (v/v) ・ リン酸1.0% (v/v)

移動相流速：毎分1 ml（流速一定）

検出波長：270 nm

HPLC分析用試料中に含まれる フェニルカルコンの量：内部標準物質 フェニルカルコン12 mgと、リン酸メタノール溶液（リン酸：メタノール = 40 ml：400 ml）440 mlとの混合溶液の1 ml中に含まれる フェニルカルコンの量

HPLC分析用試料は、下記HPLC分析用試料調製条件に記載の方法により、調製された試料である。

40

【0029】

本発明では、上記高速液体クロマトグラフィ条件により分析を実施し、図1に表された酸のピーク面積の総和を、内部標準物質のピーク面積で除したピーク面積比（酸内標比）に基づいて、酸を添加することができる。酸内標比は、以下の式により表される：

$$\text{酸内標比} = (\text{酸のピーク面積}) / (\text{内部標準物質のピーク面積}) \cdots (I)$$

【0030】

高速液体クロマトグラフィ分析の際に用いられる内部標準物質は、特に限定されないが、フェニルカルコンを用いることが好ましい。HPLC分析用試料は、例えば、以下の

50

ように調製することができる。

< H P L C 分析用試料調製条件 >

酸を添加した試料 10 ml に、1 ml の 3 N 塩酸を加えた後、20 ml のイソオクタンを加え、振とう、静置する。この溶液は水溶層と、有機溶媒層との二層に分離し、有機溶媒層から 10 ml を採取する。採取した溶液を、窒素ガス噴霧下で完全に乾燥させ固体化する。これに内部標準物質 フェニルカルコン 12 mg と、リン酸メタノール溶液（リン酸：メタノール = 40 ml : 400 ml）440 ml との混合溶液を 1 ml 加え、溶解したものを H P L C 分析用試料とする。

【0031】

製造された飲料中の 酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合に、酸内標比が 0.081 超、好ましくは 0.093 以上となるように 酸を添加することができる。酸内標比を 0.081 超とすることによりペクチネイタス属菌の増殖を抑制することができ、酸内標比を 0.093 以上とすることによりペクチネイタス属菌の増殖を完全に抑制することができる。

10

【0032】

製造された飲料中の 酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合に、酸内標比が 1.00 未満、好ましくは 0.56 未満となるように 酸を添加することができる。酸内標比を 1.00 未満とすることにより、製造される飲料の鋭利な苦味を抑えることができ、好ましい飲料を提供することができる。

20

【0033】

製造された飲料中の 酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合に、酸内標比が 0.081 超 1.00 未満、好ましくは 0.081 超 0.56 未満、より好ましくは 0.093 以上 0.56 未満となるように 酸を添加することができる。酸内標比を 0.081 超 1.00 未満とすることにより、製造される飲料の鋭利な苦味を抑えることができ、またペクチネイタス属菌の増殖を抑制することができる。

【0034】

ビール様飲料

本発明の好ましい態様によれば、ペクチネイタス属菌の増殖を抑制する量の 酸を含むビール様飲料が提供される。

30

【0035】

本発明のより好ましい態様によれば、ビール様飲料はビール様発酵アルコール飲料である。また、本発明の別の好ましい態様によれば、ペクチネイタス属菌はペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスであり、さらに好ましい態様によれば、ペクチネイタス・フリシンジェンシスである。本発明のビール様飲料によれば、これらの菌の増殖を顕著に抑制することができる。

【0036】

本発明の別の好ましい態様によれば、ビール様飲料がビール様発酵アルコール飲料であり、ペクチネイタス属菌がペクチネイタス・フリシンジェンシスまたはペクチネイタス・セレピシフィラスであり、製造された飲料中の 酸の量が、上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が 0.081 超 1.00 未満となる量である飲料が提供される。

40

【0037】

また、本発明のさらに好ましい態様によれば、製造された飲料中の 酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が 0.081 超となる、好ましくは 0.093 以上となる量であるビール様飲料が提供される。酸内標比を 0.081 超とすることによりペクチネイタス属菌の増殖を抑制することができ、酸内標比を 0.093 以上とすることによりペクチネイタス属菌の増殖を完全に抑制することができる。

50

【0038】

また、本発明のさらに好ましい別の態様によれば、製造された飲料中の酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が1.00未満、好ましくは0.56未満となる量であるビール様飲料が提供される。酸内標比を1.00未満とすることにより、製造される飲料の鋭利な苦味を抑えることができ、好ましい飲料を提供することができる。

【0039】

また、本発明のさらに好ましい別の態様によれば、製造された飲料中の酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が0.081超1.00未満、好ましくは0.081超0.56未満、より好ましくは0.093以上0.56未満となる量であるビール様飲料が提供される。酸内標比を0.081超1.00未満とすることにより、製造される飲料の鋭利な苦味を抑えることができ、またペクチネイタス属菌の増殖を抑制することができる。

10

【0040】

本発明の好ましい態様によれば、ビール様飲料に酸を添加することを特徴とする、ペクチネイタス属菌の増殖抑制方法が提供される。

【0041】

本発明の別の好ましい態様によれば、ビール様発酵アルコール飲料に酸を添加することを特徴とする、ペクチネイタス属菌の増殖抑制方法が提供される。

20

【0042】

本発明の別の好ましい態様によれば、製造された飲料中の酸の量が、飲料を上記高速液体クロマトグラフィ分析条件により高速液体クロマトグラフィ分析に付した場合、酸内標比が0.081超1.00未満、好ましくは0.081超0.56未満、より好ましくは0.093以上0.56未満となる量である、ペクチネイタス属菌の増殖抑制方法が提供される。

【実施例】

【0043】

以下の例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0044】

植菌試験用 酸抽出液の調製

酸は、ペレットホップ(HPE Type 90)を、80%エタノールに24時間、4で浸漬させ、抽出した。浸漬後、6000rpm、15分間遠心分離し、その上清を酸抽出液とした。

30

【0045】

酸抽出液添加による植菌試験

市販品のビールにホップから抽出した上記酸抽出液を添加し、ペクチネイタス・フリシンジェンシス(入手先:ドイツ微生物寄託機関(Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM)) No. 20760)の増殖抑制効果を得る成分値の範囲を探索した。各抽出液の添加水準は、下記に示した表1の通りであった。

40

【0046】

さらに、 1.0×10^4 CFU/mlでペクチネイタス・フリシンジェンシスを植菌し、14日間30で培養後、生菌数を確認した。初期植菌濃度(1.0×10^4 CFU/ml)よりも、生菌数が減少していれば増殖抑制効果を有すると判断した。試験の結果を下記表1に示す。酸内標比が0.093の場合には、生菌数は0となり、完全にペクチネイタス・フリシンジェンシスの増殖を抑制したことが示された。

【0047】

【表 1】

表 1 : α 酸抽出液添加による植菌試験の結果

α 酸内標比	0.016 (α 酸未添加)	0.029	0.081	0.093
生菌数 (CFU/ml)	8.0×10^6	5.0×10^6	3.2×10^6	0

【0048】

HPLC分析のための試料の調製

酸抽出液を添加した各試料 10 ml に、1 ml の 3 N 塩酸を加えた後、20 ml のイソオクタンを加え、振とう、静置した。この溶液は水溶層と、有機溶媒層との二層に分離し、有機溶媒層から 10 ml を採取した。採取した溶液を、窒素ガス噴霧下で完全に乾燥させ固体化させた。これに内部標準物質 フェニルカルコン 12 mg と、リン酸メタノール溶液 (リン酸 : メタノール = 40 ml : 400 ml) 440 ml との混合溶液を 1 ml 加え、溶解したものを HPLC 分析用試料とした。

【0049】

HPLC分析による 酸内標比の算出

HPLC の分析条件は、以下の通りである。

< HPLC 分析条件 >

カラム : Nucleosil 100 - 5 C18 (粒径 $5 \mu\text{m}$ × 内径 4.0 mm × カラム長 250 mm) (ジーエルサイエンス株式会社製)

サンプル注入量 : 50 μl

移動相 A 組成 : 蒸留水 27.0 % (v/v) ・ メタノール 72.0 % (v/v) ・ リン酸 1.0 % (v/v)

移動相 B 組成 : メタノール 99.0 % (v/v) ・ リン酸 1.0 % (v/v)

移動相流速 : 1 ml / min . (流速一定)

検出波長 : 270 nm

HPLC 分析用試料中に含まれる フェニルカルコンの量 : 内部標準物質 フェニルカルコン 12 mg と、リン酸メタノール溶液 (リン酸 : メタノール = 40 ml : 400 ml) 440 ml との混合溶液の 1 ml 中に含まれる フェニルカルコンの量

HPLC 分析用試料は、上記 HPLC 分析用試料調製条件に記載の方法により、調製された試料である。

【0050】

グラジエントプログラム

【表 2】

表 2 : グラジエントプログラム

分	0-10	10-40	40-60
移動相 A (%)	100	A液・B液のグラジエント送液	0
移動相 B (%)	0		100

※ 10 分から 40 分の間に移動相 A と B のグラジエント送液を実施した。

【0051】

HPLC 用カラム (Nucleosil 100 - 5 C18 (粒径 $5 \mu\text{m}$ × 内径 4.0 mm × カラム長 250 mm)) を用いて、蒸留水 27 % (v/v)、メタノール 72 % (v/v)、およびリン酸 1 % (v/v) からなる移動相 A を、毎分 1 ml の一定流速で 270 nm の検出波長の高速液体クロマトグラフィ分析を行った場合において、図 1 の 酸のピーク面積の総和を「 酸」とし、内部標準物質 フェニルカルコンのピーク面積の総和を「内部標準物

質（フェニルカルコン）」と表記した（図1参照）。図1において、酸ピークのリテンションタイム（RT）は6.5～10.0分であった。酸ピークのRTは±0.5分の差は許容される。

【0052】

酸内標比は、上記式（I）に基づき算出した。各添加量での酸内標比は、上記表1に示す。

【0053】

試験醸造品での酸増量の検証

ホップの添加時期を下記表3のようにし、試験醸造品を作成した。総煮沸時間は70分とした。その結果、WPTでホップを添加することにより、ペクチネイタス・フリシンジェンシスの増殖抑制可能な範囲まで酸を増量できることが明らかとなった（表3参照）。

【0054】

【表 3】

表 3 : 試験醸造品と α 酸内標比

試験区	煮沸開始から添加までの時間(分)	ホップの添加				α 酸内標比
		5	55	65	70	
A	添加後の煮沸時間 (分)	65	15	5	0 (WPT 添加)	0.56
	添加量 (g/L)	0.08	0.25	0.25	0.20	
	煮沸開始から添加までの時間(分)	5	55	65	-	
B	添加後の煮沸時間(分)	65	15	5	-	0.03
	添加量 (g/L)	0.08	0.25	0.25	-	
	煮沸開始から添加までの時間(分)	5	55	65	-	

10

20

30

40

【 0 0 5 5 】

市販品の分析結果

市販品の α 酸の内標比を上記の HPLC 条件と同様の条件で測定し、 α 酸の内標比を算出した。その結果を下記表 4 に示した。測定した市販品の中には、 α 酸の内標比が 0.081 超のものは存在しなかった。

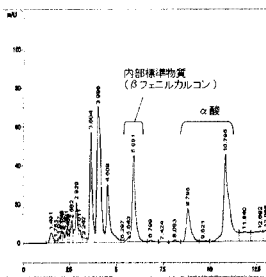
【表 4】

表 4：市販品の分析値

製品	α 酸内標比
市販品 1	0.07
市販品 2	0.04
市販品 3	0.05
市販品 4	0.00
市販品 5	0.00
市販品 6	0.02

10

【図 1】



フロントページの続き

- (72)発明者 村 上 敦 司
東京都中央区新川二丁目10番1号 麒麟麦酒株式会社内
- (72)発明者 川 崎 由美子
東京都中央区新川二丁目10番1号 麒麟麦酒株式会社内
- (72)発明者 太 田 麗 子
東京都中央区新川二丁目10番1号 麒麟麦酒株式会社内
- (72)発明者 高 橋 康 紘
東京都中央区新川二丁目10番1号 麒麟麦酒株式会社内