

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5256562号
(P5256562)

(45) 発行日 平成25年8月7日 (2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年5月2日 (2013.5.2)

(51) Int.Cl.
C 1 2 C 11/00 (2006.01)F I
C 1 2 C 11/04

請求項の数 11 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2009-518823 (P2009-518823)	(73) 特許権者	503220392
(86) (22) 出願日	平成19年6月22日 (2007.6.22)		ディーエスエム アイビー アセツ ビー・ブイ・
(65) 公表番号	特表2009-542238 (P2009-542238A)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(43) 公表日	平成21年12月3日 (2009.12.3)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/056259	(74) 代理人	100094318
(87) 国際公開番号	W02007/101888		弁理士 山田 行一
(87) 国際公開日	平成19年9月13日 (2007.9.13)	(74) 代理人	100123995
審査請求日	平成22年5月28日 (2010.5.28)		弁理士 野田 雅一
(31) 優先権主張番号	06117178.1	(74) 代理人	100128381
(32) 優先日	平成18年7月13日 (2006.7.13)		弁理士 清水 義憲
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100126653
(31) 優先権主張番号	60/903,539		弁理士 木元 克輔
(32) 優先日	平成19年2月27日 (2007.2.27)	(74) 代理人	100139000
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 城戸 博兒

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良醸造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から単離されたプロリン特異性プロテアーゼの存在下にビールを製造することを含むビール醸造プロセスの加速方法であって、
プロリン特異性プロテアーゼを使用しない同等のプロセスと比べてラガーリング期間が短縮される方法。

【請求項 2】

アスペルギルス・ニガーから単離されたプロリン特異性プロテアーゼの存在下に麦汁を発酵させた後、熟成段階および安定化段階を行うことを含むビールの製造方法であって、
安定化段階の持続期間が 5 日未満である方法。

【請求項 3】

安定化段階の期間が、ろ過および / またはパッケージングのための最終温度にまでビールを冷却するのに必要な時間まで短縮される請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

安定化段階が、ビールをパッケージングするのに適した温度で行われる請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

発酵中にアルファアセトラクテートデカルボキシラーゼもまた存在する請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ラガーリング期間が 8 日間未満である請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

P V P P が使用される請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

クロスフローメンブレンフィルターが使用されるろ過工程を含む請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

プロリン特異性プロテアーゼが、酸性 pH が最適なプロリン特異性プロテアーゼである請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法により得られるビール。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のビールを含むビン、缶またはケグ。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、ビールの醸造方法に関する。特に、本発明は、プロリン特異性プロテアーゼを含む加速させたビールの醸造方法に関する。

20

【0002】

[発明の背景]

従来のビール製造方法では、モルトから抽出した麦汁にビール酵母を加え、8 ~ 15 の最高温度（低温発酵と高温発酵のどちらを使用するかによって異なる）で約 7 日間発酵させる。この発酵は、また、一次発酵としても知られている。発酵が完了し、発酵可能な糖の大部分がアルコールに変わると、酵母が沈殿する。ラガービールの場合、酵母は発酵液の底に集まり、他のビールでは発酵液の表面に集まる。この一次発酵で得られる「グリーン」ビールは、幾分か非沈殿酵母や、比較的高濃度の望ましくないフレーバー成分、特に、ジアセチルおよびアセチルアルデヒドなどのジケトンに依然含有している。

30

【0003】

これら後者の望ましくないフレーバー成分を味の悪い化合物に変えることは、その後のビール熟成段階の重要な一面である。特に、バター様の異臭を放つ化合物であるジアセチルを味の悪いアセトインへと還元するプロセスは、時間を要するものの、極めて重要である。従来のビール製造方法では、この熟成段階を約 1 週間行っている。ビール醸造の次の段階、いわゆる安定化段階では、ビールを、タンパク質 - ポリフェノール凝集体の形成が促進されるように保ち、その後、沈殿した凝集体を除去する。これらのタンパク質 - ポリフェノール凝集体は、モルトからのポリフェノールと、プロリンに富むいわゆるヘイズ活性を有するタンパク質とからなる。これらの凝集体の凝集とその後の沈殿は、安定化段階で、ビールを、約 7 ~ 10 日間、0 またはさらに - 2 にまで冷やすことによって促進される。ナルチス (Narziss) (ナルチス, エル (Narziss, L.) 1990 フェメンテーション (Ferment.) 3, p. 54 - 62) は、後者の低温安定化期間は必須であるとしている。沈殿物を除去した後、通常、非沈殿ポリフェノールおよび/またはヘイズ活性タンパク質を、パッケージ後の製品に「冷却混濁」が生成するのを防止するために除去する。そのためには、残留している非沈殿ポリフェノールはポリビニルポリピロリドン (PVP) に吸収させることによって除去することができ、かつ/または、残留しているヘイズ活性タンパク質はシリカゲルに吸収させることによって除去することができる。この後、ポリフェノールおよび/またはヘイズ活性タンパク質をそれぞれ吸収した PVP および/またはシリカゲルは、珪藻土ろ過によって、残留酵母と共に除去することができる。

40

50

【 0 0 0 4 】

上記した従来のビール製造方法は、全体で約 20 日を要する。得られた製品は完全に透明かつ安定であるので、商業的な保存期間に目に見える変化は生じない。

【 0 0 0 5 】

醸造所の柔軟性を増大させ、かつ資本コストを節約するために、長年にわたって醸造プロセスにおける発酵、熟成および安定化の各段階を最短化する研究が数多く行われてきた（ナルチス，エル（Narziss, L.）1990 ファーメンテーション（Ferment.）3, p. 54 - 62）。例えば、「加圧発酵」法では、発酵および熟成の各温度を、通常、約 14 ~ 18 の温度に上昇させることによって、発酵および熟成の速度が速められる。このアプローチでは、発酵および熟成は 7 日間で完了する。全製造プロセス、すなわち、安定化も含むプロセスは、2 週間を少し超えるところまで、かなり短縮される。しかしながら、得られるビールは、わずかに酵母の味がし、全体としてフレーバー評価はあまり良くない。

10

【 0 0 0 6 】

よく行われる代替法、いわゆる「低温発酵 - 高温熟成」法では、従来の低温発酵法に従うため、優れた味のビールが得られる。求められた製造時間の短縮は、熟成段階の温度を 18 ~ 22 に上昇させることによって行われる。その結果、2 ~ 3 日の期間内にフレッシュビールの未熟な味が克服される。ビールの安定化は、従来の方法で行われる。品質の良いビールが得られるが、この方法はエネルギーコストが比較的高い。

【 0 0 0 7 】

20

ビールの熟成を促進するさらに別のアプローチでは、酵母を除くためにグリーンビールの徹底した遠心分離を行い、その後、高濃度の固定化酵母を含むバイオリアクターに通す。90 への嫌氣的加熱工程と組み合わせると、全てのジアセチルが 1 ~ 2 時間以内にアセトインに還元される。この急速熟成ビールもまた、通常の低温貯蔵期間と、PVP またはシリカゲルによる処理によって安定化される。しかしながら、このバイオリアクターアプローチは酵母の異臭を発生しやすく、かつ、先進技術の装置を必要とするため、資本支出が大きくなるおそれがある。

【 0 0 0 8 】

さらに、ビール発酵段階で添加する新開発の酵素の導入が、ビールの製造に影響を及ぼし始めている。ごく最近のアプローチでは、冷却混濁の生成を防止するために、PVP またはシリカゲルによる処理に代えてプロリン特異性エンドプロテアーゼが使用されている（EP 1 326 957 号明細書）。ビールの発酵過程で、酵素がプロリンに富むヘイズ活性タンパク質を選択的に加水分解し、それによってタンパク質 - ポリフェノール複合体の沈殿が防止される。この方法の利点は、報告によれば、酵素によって冷却混濁が有効に防止されるので、PVP またはシリカゲルが不必要であることである。さらに、この方法は、ビール製造の最後の最も不安定な段階の処理工程をかなり簡素化するが、ビール醸造プロセスの期間については何ら重大な影響は及ぼさない。実際のところ、PVP とポリフェノールとの反応、および / または、シリカゲルとヘイズ活性タンパク質との反応は、ほぼ瞬時に起こる。したがって、PVP またはシリカゲルによる処理が不要になることは、ビール醸造プロセスを短縮することにはならない。酵素を用いる別のアプローチでは、酵母を投入した麦汁に酵素アルファアセトラクテートデカルボキシラーゼを添加する。この添加によって、ビール発酵時のジアセチルの生成が防止され、それによって、ジアセチル濃度の低減が主な目的である熟成期間を 2 ~ 3 日短縮することができる（米国特許第 5, 108, 925 号明細書および米国特許第 4, 708, 875 号明細書を参照）。

30

40

【 0 0 0 9 】

ビール製造の熟成段階を短縮する多くの報告が存在するが、ビールの安定化段階の速度を速める実施可能な方法に関する報告は、今までのところ見当たらない。しかしながら、この安定化期間は、通常、0 付近の温度で約 1 週間であって、かなりの装置容量を専有し、かなりのエネルギーを投入する必要がある。ビール製造プロセスをさらに短縮し、か

50

つ簡素化することが、経済的に非常に重要であることは明白である。そうした短縮され、かつ簡素化された製造プロセスは醸造プラントの柔軟性を高め、ひいては固定費および労働コストを減少させる。

【 0 0 1 0 】

[発明の概要]

本発明においては、好ましくはラガーリング期間を短縮することにより、ビール醸造プロセスを加速するためのプロリン特異性プロテアーゼの使用が提供される。

【 0 0 1 1 】

本発明は、また、

- プロリン特異性プロテアーゼの存在下にビールを製造することを含むビール醸造プロセスの加速方法であって、ラガーリング期間が短縮される方法、および

- プロリン特異性プロテアーゼの存在下に麦汁を発酵させた後、熟成段階および安定化段階を行うことを含むビールの製造方法であって、安定化段階の持続期間が7日未満である方法

を提供する。

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明は、本発明の方法によって得られるビール、およびそのようなビールを含むビン、ケグまたは缶を提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 I F B M パイロットプラントで製造した 1 0 月齢ビールについて、 P C S により測定した粒子径と累積正規化散乱強度との関係を示す。

【 0 0 1 4 】

[発明の詳細な説明]

本発明は、ビール醸造プロセスを加速するためのプロリン特異性プロテアーゼの使用に関する。特に、ビール製造の安定化段階を短縮および簡素化することによりビール醸造プロセスを加速するためのプロリン特異性プロテアーゼの使用に関する。

【 0 0 1 5 】

安定化段階は、また、従来の醸造プロセスより高い温度で行うことができる。したがって、事実上、本発明は、醸造プロセスの後発酵段階が従来の方法に比べて短縮され、かつ / または、従来の方法より高い温度の方法に関する。したがって、本発明は、また、プロリン特異性プロテアーゼの存在下にプロセスを実行することを含むビール醸造プロセスの加速方法に関する。そのような方法においては、安定化段階を、従来の醸造プロセスと比べて、より短期間に、かつ / または、より高温で実施することができる。

【 0 0 1 6 】

世界では非常に多様なビール醸造プロセスが使用されている。しかしながら、通常、これらのプロセスは全て、少なくとも次の工程、またはそれに対応する段階を基本的に含んでいる。

・ 発酵

・ 熟成

・ 安定化

・ る過 (しかしながら、る過を使用しないプロセスもある)

【 0 0 1 7 】

プロセスは、場合により、安定性をさらに高めるため、例えば保存期間を長くするために、追加の一つないし複数の工程を含む。これについては任意の公知の技術、例えば、ポリビニルポリピロリドン (P V P P) および / またはシリカゲルによる処理の使用が可能である。通常は、そのような追加の工程は、安定化と最終る過段階との間で行われるが、そのような工程をプロセスの他の部分で行ってもよい。

【 0 0 1 8 】

各プロセス行程の詳細は、プロセスが異なれば相当に異なる可能性があり、ビール醸造

10

20

30

40

50

プロセスを実施する際に、当業者であれば各段階について自分自身の定義を持つであろう。不明瞭さを避けるために、本発明との関連においては、発酵、熟成、安定化、PVP P およびシリカゲル処理、およびろ過という用語は、本説明中の開示と同じであるとする。あるプロセスでは、発酵が一次発酵としても知られていることに注意すべきである。発酵段階は、酵母を加えることによって、利用可能な糖をアルコールに発酵させることを目的としたビール醸造の段階である。熟成段階は二次発酵としても知られており、ジケトンなどの望ましくないフレーバー成分を味のより良好な成分に変化させることを目的とするものである。安定化段階は、ポリフェノール-タンパク質凝集体の生成を促進し、それらを沈殿させることを目的とするものである。PVP P および/またはシリカゲル処理は、行うとすれば、非沈殿ポリフェノールおよびヘイズ活性タンパク質をそれぞれ除去して、パッケージング後の製品の保存安定性を高めることを目的とするものである。最後に、ろ過工程は、行うとすれば、パッケージングの前に、沈殿したポリフェノールおよびヘイズ活性タンパク質、残留酵母、PVP P および/またはシリカゲルを除去することを目的とするものである。

10

【0019】

一般に、ビール醸造中には多くのパラメータがチェックされる。例えば、発酵段階の終わりは、製造中のビールの密度を測定し、グルコース量などの発酵性抽出物の減少を調べることによって決定される。発酵段階の終わりは、一般に、熟成段階の始まりであるとみなされる。熟成段階の終わりと、それに伴う安定化段階の始まりは、通常、ビール中に存在するジアセチルの量を測定することによって決定される。しかしながら、実際には、これは所望のビールのタイプによって変化し得る。例えば、隣接ジケトン濃度が約0.10 mg/l未満になると熟成段階を終了したとする醸造所もあれば、隣接ジケトン濃度が約0.05 mg/l未満になると終了したとする醸造所もある。したがって、熟練者であれば、所望の隣接ジケトン濃度によって、熟成段階の終わりおよび安定化段階の始まりを決めることができるであろう。

20

【0020】

本発明との関連においては、安定化段階の始まりは、EBC method 9.24.1 ビール中の隣接ジケトン：分光光度法(Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method)による測定で、ジアセチル濃度が約0.10 mg/l未満にまで減少した時点と定義することができる。本発明との関連においては、安定化期間の終わりは、ビールが最終ろ過工程に供される時点、あるいは、PVP P および/またはシリカゲル処理が醸造プロセスの一部である場合は、ビールがPVP P および/またはシリカゲルに接触した時点と定義される。ろ過を行わないプロセスならば、安定化期間の終わりはビールがパッケージングされる時点と定義される。

30

【0021】

本発明の一実施態様においては、安定化に必要な時間が約7日未満に短縮される。6、5、4または3日未満であることが好ましい。2または1日未満に短縮されることがより好ましい。熟成段階の温度から望ましい温度、例えばビールのろ過および/またはパッケージングに望ましい温度にまでビールを冷却するのに必要な期間と、製造規模で安定化期間が同等になるまでに短縮されることが特に好ましい。この期間は、従来、冷却期間と呼ばれている。ビールを望ましい温度に冷却するのに必要な時間まで安定化期間を短縮することは、そうなれば安定化段階の期間が利用可能な冷却能力にのみ依存することになることから、非常に有利である。

40

【0022】

熟成段階からのビールは、伝統的に約-2 ~ 約0 (0を含む)に冷却される。意外にも、本発明のプロリン特異性プロテアーゼを使用すると、安定化段階が短縮されるだけでなく、従来よりも高温で実施できることがわかった。伝統的にも、比較的高い温度で行われる安定化プロセスはあるが、これらのプロセスでは、例えば6週間以上と、非常に長い時間がかかる。したがって、本発明の別の実施態様では、通常、上記のように短縮さ

50

れ得る安定化期間が、好ましくは最高で約 2 、より好ましくは最高で約 3 、 4 、 5 または 6 、よりいっそう好ましくは最高で約 7 または約 8 、特に好ましくはパッケージング、すなわちビン詰めまたはケグ詰めに望ましい温度にまで冷却したビールに適用される。

【 0 0 2 3 】

パッケージングに望ましい温度は、プロセスにより異なり得るが、ビール中に二酸化炭素を望ましい濃度で溶解させるためには、8 以下、好ましくは 7 前後の温度で行うことが好ましい。ビールをパッケージングに要求される温度にまで単に冷却するプロセスでは、当該技術分野で知られているプロセスと比べてかなり少ないエネルギーで済む。

【 0 0 2 4 】

本発明の好ましい一実施態様では、安定化段階が、熟成段階の終わりの温度からパッケージングに望ましい温度にビールを冷却するのに必要な期間にまで短縮され、それにより、従来の低温安定化期間が省略される。

【 0 0 2 5 】

したがって、本発明においては、ビールは、最高で約 2 、より好ましくは最高で約 3 、 4 、 5 または 6 、よりいっそう好ましくは約 7 または 8 に、特に好ましくはパッケージングに望ましい温度にまで冷却される。その後、ビールは直ちにパッケージングされ得る。すなわちこの実施態様では、ビールは冷却された温度で一時的にも保持されることはない。

【 0 0 2 6 】

本発明においては、必要に応じて、清澄性および/または安定性をさらに向上させるために、さらなる処理工程を行ってもよい。実際、もしパッケージングに望ましい温度にまでビールを冷却するのに必要な期間に対応する短縮安定化段階を使用するならば、例えば、PVP P および/またはシリカゲルでビールを処理することが望ましい。これにより、保存期間の安定性を向上させ得る。

【 0 0 2 7 】

この実施態様が工業的に意味するところは、安定化期間それ自体をビール製造プロセスから省略することができ、それによりコストを大幅に節約し、かつビール製造プラントの柔軟性を増大させることができることである。

【 0 0 2 8 】

本発明により安定化されたビールは、製品として販売が許可される清澄度および安定度を得るために、さらなる処理を行うことができる。これは、一般に、追加の処理工程により達成される。ろ過工程を用いてもよい。これは、通常、パッケージング前の醸造プロセスにおける最終工程である。

【 0 0 2 9 】

これに関しては、任意の公知の技術を使用することができる。例えば、そのような追加の清澄化および/または安定化処理は、PVP P、シリカゲル、ガロタンニンまたは固定化した架橋不溶性アガロースによる処理などの適切な吸着剤による処理を用いることによりなし得る。これらの処理の使用やそれらの醸造への適用は、当業者にはよく知られている。PVP Pは、通常、約 10 ~ 約 70 g / h l の量が加えられる。シリカゲルは、通常、約 10 ~ 約 70 g / h l の量が加えられる。

【 0 0 3 0 】

固定化した架橋不溶性アガロースの例としては、国際公開第 97 / 43401 号パンフレットおよび米国特許第 6,001,406 号明細書に記載の複合安定化システムおよび GE Health Care Bioscience AB 製造の複合安定化システム樹脂が挙げられる(テラー(Taylor)ら、2006、Use of the Combined Stabilisation System and its impact on beer composition、Proceedings of the Institute of Brewing and Distilling、Asia Pacific Section、ホバート(Hobart)、オーストラリア

10

20

30

40

50

(Australia)を参照)。あるいは、または、これに加えて、パパイーンによる処理などの酵素処理も、さらなる安定性および/または清澄度を達成するために使用できるであろう。

【0031】

上記の処理は、固定化した形態、例えば固定化PVP粒子の形態で行うことができる。

【0032】

上に挙げた追加処理は全て、本発明の安定化手順と併用することができる。追加処理の組み合わせ、例えば、そのような追加処理のうちの2つ、3つ、4つまたは全部を、本発明の安定化手順と併用することができる。

10

【0033】

都合のよいことに、そのような追加の清澄化および/または安定化処理は、本発明によりビールを安定化させた後に行うことができる。しかしながら、本発明は、また、追加の清澄化および/または安定化処理をプロセスの他の時点、または本発明の安定化と同時に行う方法に関する。

【0034】

本発明の好ましい実施態様では、EP-A-1326957号明細書に開示されているようなプロリン特異性エンドプロテアーゼを使用しており、そのため、PVPおよびシリカ処理が場合により不要となり、また、PVP再生装置に固有のコストやこの装置の運転に係る労働コストが不要となる。さらに、ビールの天然抗酸化能が高まるとともに、多くのPVPまたはシリカゲル処理したビールの不十分なコロイド安定性が向上する。さらに、飲料が酸素に触れる危険性が格段に減少し、廃液流れが最小限に抑えられる。

20

【0035】

本発明の好ましい一実施態様では、この安定化段階の短縮またはさらに省略は、熟成段階(ジアセチルのアセトインへの転換が主なる目的の段階)の短縮と組み合わせられる。本発明との関連においては、以下、熟成段階の始まりは、ビールの密度測定から算定した外観発酵度が約70%~約90%に、より好ましくは約77~約84%に達した時点と定義する。ビールの密度は、ピクノメータまたは密度計(それぞれ、EBC Method 8.2.1および8.2.2)により測定することができ、最終発酵度はEBC method 8.6.1または8.6.2(発酵性、麦汁の最終発酵度(Fermentability, Attenuation Limit of wort))に準拠して測定される。本発明との関連においては、熟成段階の終わりは、EBC method 9.24.1 ビール中の隣接ジケトン: 分光光度法(Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method)による測定で、ジアセチル濃度が約0.10mg/リットル未満に減少した時点と定義することができる。熟成段階は当該技術分野で知られた方法で短縮することができる。例えば、熟成は、「加圧発酵」法および「低温発酵-高温熟成」法(ナルチス, エル(Narziss, L.) 1990、ファーマンテーション(Ferment)、3、p. 54-62)で記載されているような高温の使用で加速させることができる。熟成は、また、バイオリアクターのアプローチでの固定化酵母の使用、あるいはアセトラクテートデカルボキシラーゼ活性体の使用によって短縮することができる(ALDC: EC 4.1.1.5; 例えば、米国特許第5,108,925号明細書または米国特許第4,708,875号明細書参照)。熟成は、これらの方法の1つまたは組み合わせを使用し、高温で操作されるバイオリアクターを使用すれば、実現可能な期間として、2日、1日または1日未満まで短くすることができる。

30

40

【0036】

本発明との関連においては、ビール製造の熟成段階および安定化段階の両者を組み入れた段階をラガーリング期間と呼ぶ。

【0037】

したがって、本発明は、ビール醸造プロセスを加速するためのプロリン特異性プロテ

50

ーゼの使用を提供するものである。通常、加速は、発酵後の期間の短縮、例えばラガーリング期間の短縮、好ましくは安定化期間の短縮によって達成される。

【0038】

これに関連して、用語「加速」および「短縮」には、プロリン特異性プロテアーゼを使用しない同等のプロセスと比べて時間のかからないビール醸造プロセスを示す目的がある。加速は、一般に、発酵後の期間を短縮した結果として生じる。すなわち、その期間は、プロリン特異性プロテアーゼを使用した場合、そうした酵素を使用しない同等のプロセスと比較して、より短時間に行うことができる。

【0039】

熟成段階を短縮する対策と組み合わせて本発明を使用すれば、ラガーリングの全期間を8日未満、7日未満または6日未満にまで短縮することができる。好ましくは5日未満、4日未満または3日未満にまで短縮される。より好ましくは、2日未満にまで短縮される。よりいっそう好ましくは、ラガーリングの全期間を24時間未満にまで短縮される。

【0040】

本発明の好ましい一実施態様では、プロリン特異性プロテアーゼとアセトラクテートデカルボキシラーゼ、例えばアルファアセトラクテートデカルボキシラーゼと組み合わせることによって、4日以下にまでラガーリング期間を短縮することができる。

【0041】

好ましい一実施態様では、プロリン特異性プロテアーゼと、場合によりアセトラクテートデカルボキシラーゼとを、一次発酵に加える。この一次発酵後、グリーンビールを急速熟成処理に供し、その後、ジアセチル濃度が約0.10mg/リットル未満に低下したところで、直ちにビールを約2、好ましくは約5、より好ましくは約7、特に好ましくはパッケージングに適した温度に冷却し、その後、場合によりろ過を行うことにより、ビン詰めが可能な透明なビールを得ることができる。こうして、発酵後の段階の加速が達成され、また醸造プロセス全体の加速が達成される。

【0042】

本発明の方法の利点は、下面発酵ラガービールにも上面発酵ラガービールにも適用される。上面発酵ビールは非常に速く発酵し熟成するが、下面発酵ビールと同様に、ポリフェノール-タンパク質凝集体を除去するために長期の低温貯蔵期間を必要とする。本発明の方法の利点は、特に、下面発酵ラガービールに適用される。本発明の使用および方法は、自然発酵したビールにも適用することができる。

【0043】

別の態様では、本発明は、本発明に従ってプロリン特異性プロテアーゼを使用する方法に関する。すなわち、本発明は、好ましくはラガーリング期間を短縮することによって（安定化期間を短縮するなどによって）、ビール醸造プロセスを加速する方法であって、前記ビール醸造プロセスをプロリン特異性プロテアーゼの存在下に行うことを含む方法を提供するものである。ラガーリング段階、例えば安定化段階は、従来のビール醸造プロセスで通常使用されているよりも高い温度で行うことができる。通常、安定化段階の継続時間は、ビールを熟成段階からパッケージング温度に冷却するのに必要な時間であろう。

【0044】

本発明との関連においては、ペプチドおよびタンパク質という用語は同じ意味で使われる。本発明との関連においては、「ヘイズ(haze)」、「混濁(cloudiness)」および「濁り(turbidity)」という用語もまた同じ意味で使用される。

【0045】

外観発酵度が約77~約84%に到達する時点を決定的ために、ビールの密度測定が用いられる。EBC method 9.24.1 ビール中の隣接ジケトン：分光光度法(Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method)は、ジアセチル濃度を定量するために使用される。EBC method 9.24.1は、一般に、ジケトン測定のために設計されたものであるが、ジアセチルがジケトンの圧倒的な主成分であることから、本発明との関連におい

10

20

30

40

50

ては、この測定法の結果をジアセチル濃度の指標とみなしていることに注意されたい。ジアセチル濃度は、その方法に代えて、EBC method 9.24.2 ビール中の隣接ジケトン (Vicinal Diketones in beer) により、ガスクロマトグラフでも測定することができる。飲料中のヘイズ量の定量には、濁度計を使用することができる。濁度計では、入射光線の方角に対して所定の角度で散乱する光量が測定される。濁度の測定は、タンパク質 - ポリフェノール間の相互作用の結果生じるヘイズの測定に非常に適していることが知られている。

【0046】

ポリフェノールは、少なくとも1個の水酸基で置換された少なくとも2個の芳香環を含む化学構造、または、少なくとも2個の水酸基で置換された少なくとも1個の芳香環を含む化学構造を有する化合物と定義される。ポリフェノールの例としては、例えばカテキン、フラボノールおよびアントシアニンなどのタンニンおよびフラボノイドが挙げられる。

【0047】

用語「ビール」は、ここでは、非モルト化穀類から製造されるマッシュや、モルト化穀類から製造される全てのマッシュ、さらに、モルト化および非モルト化穀類の混合物から製造される全てのマッシュから製造されるビールを少なくとも包含するものである。用語「ビール」は、下面発酵ビールのみならず上面発酵ビールも、さらに添加物を加えて製造されるビールも、そしてあらゆる可能なアルコール含有率を有するビールも包含する。

【0048】

発酵時に添加されるプロリン特異性プロテアーゼの量は、使用するモルトの濃度および実施する発酵のタイプによって異なり得る。本発明の使用および/または方法の好ましい一実施態様では、100%モルトビール1ヘクトリットル当たり、例えば約12プラト度で、約7.5~約15単位 (PPU)、例えば約10~約12.5単位 (PPU) のプロリン特異性プロテアーゼ活性体が添加される。添加されるプロリン特異性プロテアーゼ活性体の最大量を明記することはできない。最大量は、例えば、ヘイズを低減ないし抑制する所望の量、プロテアーゼが最大の活性を示すpHでのビールの組成により異なる。酵素の単位の定義は、本願の材料および方法の項に記載する。

【0049】

プロリン特異性プロテアーゼは、ビール製造の様々な段階で加えることができる。発酵の開始時に酵素を加えれば、見込まれる最良の結果が得られる。しかしながら、酵素はマッシュ、またはヘイズが生成される前の発酵ビールに加えることができる。

【0050】

ここでは、プロリル特異性プロテアーゼ、プロリン特異性プロテアーゼ、プロリン特異性エンドプロテアーゼ、プロリン特異性エンドペプチダーゼ、およびプロリル特異活性または類似の発現を有するプロテアーゼという用語は、同じ意味で使用される。

【0051】

本発明においては、プロリン特異性プロテアーゼは、単離または精製された形態で 사용할ことができる。「単離された」または「精製された」とは、生来の環境から移動したプロリン特異性プロテアーゼを意味する。例えば、宿主細胞中に発現した、遺伝子組換えにより製造されたプロリン特異性プロテアーゼは、例えば、スミス (Smith) およびジョンソン (Johnson)、ジーン (Gene) 67: p. 31-40 (1988) で開示されている一段精製法などの適切な技術により十分に精製された天然または組み換え技術によるポリペプチドと同様に、本発明の目的のために単離されたとみなされる。

【0052】

本発明の使用に適したプロリン特異性プロテアーゼは、組み換え細胞培養物から、例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱法、酸抽出法、および高速液体クロマトグラフィ (HPLC) などのクロマトグラフ法などの当業者にはよく知られた方法により回収することができる。

【0053】

本発明の使用に適したプロリン特異性プロテアーゼは、自然精製により製造された物、

10

20

30

40

50

化学合成により製造された物、例えば細菌、酵母、真菌、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞といった原核生物または真核生物の宿主から遺伝子組換え技術によって生産された物であってよい。

【0054】

しかしながら、プロテアーゼは意図した酵素の目的を妨害しない担体または希釈剤と混合して使用することができ、それも単離されたものとみなし得ることは、理解できるであろう。本発明の使用に適したプロリン特異性プロテアーゼは、また、精製度のより高い形態もとれる。したがって、プロリン特異性プロテアーゼは、その中のタンパク質の70%超、例えば80%、90%、95%、98%または99%超がプロリン特異性プロテアーゼである配合物に含まれていてもよい。

10

【0055】

通常、プロリン特異性プロテアーゼは、他のプロテアーゼを含まないか、または実質的に含まない形態をとれる。

【0056】

本発明の使用に適したプロリン特異性プロテアーゼは、大量のタンパク質含有液を処理することができるよう、固定化した形態で使用することができる。適当な担体材料および適当な固定化法を選択する方法は、文献、例えば「Immobilization of Enzymes and Cells」(ゴードン・エフ・ビッカースタッフ(Gordon F. Bickersstaff)編; ISBN 0-89603-386-4)に広く記載されている。

20

【0057】

本発明との関連においては、プロリン特異性プロテアーゼは、タンパク質またはペプチドがその分子鎖上にプロリン残基を含む位置で、タンパク質またはペプチドを切断するプロテアーゼと定義される。好ましくは、プロリン特異性プロテアーゼは、タンパク質またはペプチドがプロリン残基を含む位置で、タンパク質またはペプチドを「切断する」(加水分解する)エンドプロテアーゼである。本発明の方法においては、プロリン残基のカルボキシ末端のペプチド結合を加水分解するプロリン特異性エンドプロテアーゼを使用することが好ましい。そのような酵素の例としては、プロリルオリゴペプチダーゼ(EC 3.4.21.26)、ジャーナル・オブ・アグリカルチュラル・アンド・フード・ケミストリー(J. Agric. Food Chem)、第53巻(20)、p. 7950-7957、2005に報告されているアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)由来のプロリルエンドプロテアーゼ、およびDPP IV(EC 3.4.14.5)などのプロリン特異性ジペプチジルペプチダーゼが挙げられる。プロリン残基をNH₂末端で切断するプロリン特異性エンドプロテアーゼは、例えば、1998年1月15日のネイチャー(Nature)、第391巻、p. 301-304での発表に記載されている。

30

【0058】

酵素活性によく見られるように、プロリン特異性エンドプロテアーゼの活性はpHに依存する。本発明では、通常、添加するビール(または、マッシュもしくは麦汁など)のpHに対応するpHで最大のプロリル特異性活性を示すプロリン特異性エンドプロテアーゼが使用される。本発明の方法の好ましい実施態様では、酸性pHが最適な、すなわち、最適pHが6.0以下、例えばpH 5、4または3のプロテアーゼがビールの一次発酵時に加えられる。本発明の使用および/または方法のより好ましい実施態様では、酸性pHが最適で、かつ食品グレードの微生物によって発酵培養液中に活発に分泌されるプロテアーゼがビール発酵時に加えられる。

40

【0059】

プロリン特異性プロテアーゼは、動物および植物中には広く見出されるが、微生物中の存在は限られているようである。現在、プロリン特異性プロテアーゼは、アスペルギルス(Aspergillus)(EP 0 522 428号明細書)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)(EP 0 967 285号明細書)およびエロ

50

モナス (*Aeromonas*) (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*J. Biochem.*) 113, p. 790 - 796)、キサントモナス (*Xanthomonas*) およびバクテロイデス (*Bacteroides*) の種で確認されている。これらの微生物の多くに由来するプロリン特異性酵素は、pH 8 付近で活性であるが、アスペルギルス (*Aspergillus*) 由来の酵素は pH 5 付近で最適の活性を有す。本発明のプロリン特異性プロテアーゼは、上記微生物種の 1 種、特にアスペルギルス (*Aspergillus*) の種から単離することができる。好ましくは、プロリン特異性エンドプロテアーゼは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の菌株から単離される。プロリン特異性エンドプロテアーゼは、大腸菌 (*E. coli*) などの他の宿主も適切な発現ベクターであるが、より好ましくは、プロリン特異性エンドプロテアーゼをコードする遺伝子を過剰に発現するように改変されたアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 宿主から単離される。例えば、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 由来のプロリン特異性エンドプロテアーゼを、なかでも大腸菌 (*E. coli*) 中でクローニングおよび過剰生産することによって、純粋な形態で利用可能なある種のプロリン特異性エンドプロテアーゼが生産されている。そのような過剰生産による構築物の例は、ワールド・ジャーナル・オブ・マイクロバイオリジー・アンド・バイオテクノロジー (*the World Journal of Microbiology & Biotechnology*)、第 11 巻、pp 209 - 212 に記載されている。アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 宿主は、A. ニガー (*A. niger*) プロリン特異性エンドプロテアーゼをコードする遺伝子発現を駆動する A. ニガー (*A. niger*) プロモータを使用して、非組み換え自己構築物を生産するのに好適に使用される。

【0060】

特に好ましくは、プロリン特異性エンドプロテアーゼは、EP - A - 1326957 号明細書に開示されているエンドプロテアーゼであり、このプロテアーゼは参照することによって本明細書に援用される。EP - A - 1326957 号明細書には、また、ビール醸造におけるプロリン特異性エンドプロテアーゼの使用についても開示されている。しかしながら、その明細書には、飲料中のヘイズを減少させるために使用することのみが開示されているに過ぎない。プロリン特異性エンドプロテアーゼそれ自体が、ビール醸造プロセスを加速するために使用できるであろうことは開示されていない。さらに、当業者には、PVP および / またはシリカゲル処理が瞬時に行われるものであることが知られている。ラゲリング期間または安定化期間を短縮する方法は、何ら開示されていない。適切な安定化段階を行わずに従来のプロセスを使用する場合、例えばコロイドの安定性および透明度に関して品質の悪いビールが得られることは当業者には明らかであろう。したがって、ビールの醸造にプロリン特異性エンドプロテアーゼを使用すると、ビールの品質に悪影響を及ぼさずにプロセスを短縮できることは予期できないことであった。

【0061】

発酵中に加えられるアセトラクテートデカルボキシラーゼ活性体は、当業者に知られている範囲で変化し得る。要求される活性体の指標は、ハンネマン (*Hannemann*) の論文 (*MBAA TQ*、第 39 巻、第 3 号、2002、p. 149 - 155) に記載されている。

【0062】

現代の醸造所は、ビール醸造プロセスから、PVP、シリカゲルまたは珪藻土のようなバルク粉体は全て使用しないよう努めている。このアプローチでは、最終の珪藻土ろ過はメンブランろ過またはクロスフローろ過に置き換えられている。本発明の別の実施態様では、本発明のビール製造プロセスは、ろ過用の PVP またはシリカハイドロゲルまたは珪藻土のようなバルク粉体を使用せずに実施することができる。したがって、本発明の使用および / または方法により製造されたビールは、PVP および / またはシリカハイドロゲルおよび / または珪藻土を含まないか、または実質的に含まないものとなり得る。

【0063】

本発明の方法を使用すれば、クロスフロー過などのろ過技術によりビールを透明にすることができる。したがって、本発明は、プロリン特異性プロテアーゼをクロスフローメンブランフィルターと組み合わせて使用するビール製造方法を包含する。

【0064】

本発明は、プロリン特異性プロテアーゼを使用し、安定化期間がプロリン特異性プロテアーゼを使用しない醸造プロセスに比べて短縮でき、さらに、EBC 9.29の目視判定のための用語による目視によるビールの透明度に関しては、同等の特性を少なくとも維持するビール醸造法に関する。

【0065】

本発明は、また、本発明の方法により得られるビールに関する。通常、ビールの透明度は種々の方法で判定される。EBC method 9.29には、ビール中のヘイズ量の測定方法が記載されている。EBC単位は、濁時計により90度の角度で測定される。あるいは、目視により評価することもできる。EBC method 9.29、すなわち、90度の散乱角度でEBC単位を測定したとき、0.5 EBC単位未満の濁度を有するビールは、目視では「非常に透明 (brilliant)」と評価されるであろう。ビールの濁度が約0.5 ~ 1.0 EBC単位の場合、ビールは目視では「透明 (very clear)」と評価され、2 ~ 1 EBC単位では「非常に僅かに濁っている (very slightly hazy)」と評価され、2 ~ 4 EBC単位では「濁っている (hazy)」と評価され、8 EBC単位を超えると「非常に濁っている (very hazy)」と評価されるであろう。当然ながら、ヘイズの異なる尺度間、あるいは異なる研究所で行われた目視観察の間には、正確な等価性は期待できないものの、大きく相違することはない。さらに、結局のところ、消費者によって行われる目視検査が、商業的観点からは重要であろう。したがって、一般に許容されるには、ビールは(ほぼ)非常に透明 (brilliant)、すなわち、90度散乱で測定したEBC単位の値が1以下でなければならない。

【0066】

意外にも、本発明の方法で製造したビールでは、EBC単位の値は、訓練された評価委員会による目視評価に対応しないことが判明した。ビール中に依然存在するタンパク質とポリフェノールの量が多いほど90度散乱値は高くなるが、目では検出できないのであろうと推測される。実施例で示すように、EBC単位値が1を超えるビールに対し「非常に透明 (brilliant)」との目視評価や、EBC単位値が2を超え8までにも達するビールに対し「ほぼ非常に透明 (almost brilliant)」との目視評価がなされ得ることが判った。すなわち、本発明の方法により得られるビールは、従来の醸造ビールとは異なる(物理)化学的組成を有している。

【0067】

このことは、異なる方法で安定化させたビールの粒子分析を行うことによって確認された。これは、本発明により安定化されたビールに含まれる粒子の大きさが、PVPまたはシリカハイドロゲルを用いて安定化されたビール中に確認されるものより、平均して小さいことを示している。

【0068】

したがって、別の態様では、本発明は、濁度が1 EBC単位を超える、好ましくは1.25以上、特に好ましくは1.5以上のビールであり、一方で、訓練された委員会による醸造直後の1での目視評価では、そのビールはEBC用語で「非常に透明 (brilliant)」と格付けされるであろう。別の一実施態様では、本発明は、濁度が2 EBC単位を超える、好ましくは3を超える、より好ましくは4を超える、よりいっそう好ましくは6を超える、特に好ましくは8 EBC単位を超えるビールに関し、一方で、少なくとも3カ月間の室温での貯蔵、好ましくは少なくとも6カ月間の貯蔵、または、特に好ましくは9カ月間の室温での貯蔵後の、訓練された委員会による1での目視評価では、そのビールはEBC用語で「ほぼ非常に透明 (almost brilliant)」と格付けされるであろう。

【 0 0 6 9 】

本発明の使用および／または方法により得られたビールは、通常は、パッケージングされるであろう。ビン、ケグまたは缶など、任意の適切なパッケージを用いることができる。本発明の使用および／または方法により得られたビールは、また、バルクタンクにパッケージングすることもできる。したがって、本発明は、本発明の使用および／または方法により得られたビールを含むパッケージ、例えばそのようなビールを含むビン、ケグまたは缶を提供するものである。

【 0 0 7 0 】

以下、次の実施例により本発明を説明するが、それらは本発明を限定するものではない。

10

【 0 0 7 1 】

[材料および方法]

[プロリン特異性酵素の活性測定]

最適 pH が 6 . 0 未満のプロリン特異性エンドプロテアーゼの活性は、pH 4 . 6 のクエン酸塩 / リン酸二ナトリウム緩衝液中、37 °C で、合成ペプチド Z - G l y - P r o - p N A で試験する。

最適 pH が中性のプロリン特異性エンドプロテアーゼの活性は、pH 7 . 0 のリン酸塩緩衝液中、37 °C で、合成ペプチド Z - G l y - P r o - p N A で試験する。

最適 pH が 6 . 0 未満のジペプチジルジペプチダーゼの活性は、pH 4 . 6 のクエン酸塩 / リン酸二ナトリウム緩衝液中、37 °C で、合成ペプチド G l y - P r o - p N A で試験する。

20

最適 pH が 6 . 0 未満のジペプチジルジペプチダーゼの活性は、pH 7 . 0 のリン酸塩緩衝液中、37 °C で、合成ペプチド G l y - P r o - p N A で試験する。

全てのプロリン特異性プロテアーゼの反応生成物を、分光光度法により 405 nm でモニターする。1 単位 (1 P P U) は、これらの試験条件で 1 分当たり 1 μ m o l の p - ニトロアニリドを遊離させる酵素の量である。

【 0 0 7 2 】

[醸造プロセス中の分析]

特に記載がない場合、各種分析は、「アナリティカ - E B C (A n a l y t i c a - E B C) 」 (ファッハフェアラーク・ハンス・カール (F a c h v e r l a g H a n s C a r l) 、ニュルンベルク (N u r n b e r g) 、独国 (G e r m a n y)) の 2004 年版に準拠して行った。モルトの分析は、次の E B C m e t h o d 、4 - 2、4 - 5 - 1、4 - 9 - 1、4 - 3 - 1、4 - 18、8 - 13 - 2、4 - 8、4 - 15 および 4 - 14 に準拠して行った。マッシングは、糖化速度の測定およびマッシュろ過によりモニターした。麦汁は、E B C 4 - 5 - 1、4 - 7 - 2、4 - 11 に準拠して分析し、さらに遊離アミノ窒素 (E B C m e t h o d 8 . 10) 、全窒素 (E B C m e t h o d 8 . 9 . 1 - ケルダール (K j e l d a h l) 、または 8 . 9 . 2 - デュマ燃焼法 (D u m a s C o m b u s t i o n m e t h o d)) 、pH および全麦汁ポリフェノール (E B C 法 8 . 12) を分析した。各種発酵実験は、温度、抽出物の減少および圧力を測定した。酵母の数は、投入時、発酵第 1 日目およびビールのろ過前に測定した。ジアセチルは、発酵中、熟成中およびろ過の直前に、ガスクロマトグラフィにより測定した。ビールのろ過は、ろ過前後の酵母の計数、関係する圧力降下および流量によりモニターした。溶解酸素は、炭酸水中と、ろ過の入り口および出口のビール中と、ビン詰めしたビール中で測定した。各種のビールの分析には、泡保持性、t r a n s - 2 - ノネナールおよび還元力を測定するための、E B C 9 . 4、9 . 6、9 . 7、9 . 8、9 . 11、9 . 24 . 1、9 . 24 . 2、9 . 29、9 . 30、9 . 35、9 . 37、R o s s & C l a r k 法および N I B E M (9 . 42) 法が含まれる。V O S R O T A 90 / 25 H a z e m e t e r (ハフマンズ (H a f f m a n s) 、ベンロー (V e n l o) 、オランダ (T h e N e t h e r l a n d s)) を使用し、種々の温度 (実施例 2 参照) において、散乱角 25 度および 90 度で行った種々のヘイズ測定により、ヘイズの発達を追跡した。E B C

30

40

50

9.30 保存期間推定試験に準拠して加速試験を行った。

【0073】

[醸造プロセス]

ビール醸造実験は全て、マッシング用に300kgのピルゼンモルト（ハイネケン（Heineken）Aタイプ）および950lの水を使用して20hl規模で実施した。醸造には、次の温度条件：45 で20分間、20分以内に45 から64 へ、64 で15分間、12分以内に64 から76 へ、76 で25分間、そして最後に5分以内に76 から78 へという条件のマッシングプロセスを組み込み、その後、マッシュろ過を行った。スパージングには熱水を使用した。煮沸は90分間とし、ホップペレットの形態でホップを加えた。個々の実施例に明記した条件で低温安定化を実施した。粗および微細グレードのプレコートをしたプレートフィルターを使用してビールをろ過した。微細グレードのプレコートは、また、ボディフィードとしても使用した。ビン詰めには、Carbofill フィラーを使用した。ピンは60 で15分間の殺菌を行った。

10

【0074】

[実施例]

[実施例1]

[パイロット規模でのビールの製造]

IFBM（Institute Francais de la Brasserie et de la Malterie、Vandoeuvre-les-Nancy、フランス（France））の20hl半工業的パイロット醸造所において、2つのピュアモルト麦汁を同一条件で醸造した。発酵中に、これらの麦汁の1つにプロリン特異性プロテアーゼ（オランダ、DelftにあるDSM Food Specialitiesからの5PPU/グラム製品を含有するBrewers Clarex）を10PPU/ヘクトリットル麦汁となるように添加し、また、発酵の初期にアセトラクテートデカルボキシラーゼ（デンマーク（Denmark）、BagsvaerdにあるNOVOからの1,500ADU/グラム製品を含有するMaturex L）を4500ADU/ヘクトリットル麦汁となるように添加した。この発酵を「試行発酵」と称した。他方の麦汁はそのまま発酵させ、「対照発酵」と称した。

20

【0075】

[醸造]

300kgの大麦モルトおよびホップペレットから醸造物を製造した。マッシング条件は、水：穀物比を4：1（体積/重量）、pHを5.6とした。マッシング図は、45 で20分間の第1工程、64 で15分間の第2工程、74 で30分間の第3工程、そして最後の78 で5分間のマッシュオフを含んだ。加熱速度は毎回1 /分とした。マッシュオフの後、ロータータンでマッシュをろ過した；最初は麦汁を再循環させ、その後pH5.6で高温（78 ）スパージングを行った。得られた麦汁を90分間煮沸し、その後、渦により良好なトラブ（trub）分離を行った。

30

【0076】

[発酵]

発酵は、VLB（ベルリン（Berlin）、独国）より購入した下面酵母菌株Rhを用い、 1.7×10^6 生菌細胞/ml - 12 プラート麦汁となるように投入して行った。発酵プロセスは5 プラートになるまで12 で行い（3日間）、その後は、発酵の終わりまで14 で継続した（3日間）。

40

【0077】

[後発酵]

発酵の終わりに、対照発酵では、さらに3日間14 に保持し、ジアセチル濃度を減少させた。この熟成期間の後、1日以内にビールを0 まで冷却し、0 で5日間ビールを安定化させ、その後、用量30g/Hlでの使い捨てPVPによる処理、珪藻土を用いたビールのろ過およびビン詰めを行った。

【0078】

50

しかしながら、試行発酵では熟成期間は設けなかった。さらに、安定化期間は、ビールを4 にまで冷却するのに必要な期間に限定した。発酵終了後直ちに、4日間で4 にまで直線的に温度を下げてビールを冷却した。発酵中にBrewers Clarexを使用しているために、ビール安定化剤(PVPまたはシリカゲルなど)は添加しなかった。その代わりに、冷却後直ちにビールを珪藻土でろ過し、その後、ビン詰めを行った。「アナリティカ-EBC(Analytica-EBC)」に記載されている、欧州醸造協議会(European Brewery Convention)(EBC)が制定した方法に準拠して、標準的なビールのパラメータ(例えば、pH、色、苦味、エタノールなど)を分析した。

【0079】

10

[結果]

一般に、標準的なビールの分析では、対照および試行発酵の両方でビールのパラメータは類似していた。溶解酸素濃度は、両試験品で同程度であり、0.2mg/l未満であった。初期のヘイズレベルは両ビールで同程度であったが、エル・シャボン(L. Chapon)(EBC method 9.41)によるアルコール冷却混濁試験では、試行ビールが非常に低い値を示した。さらに、ビールの加速試験「ビール保存期間の推定(Prediction of the Shelf-Life of Beer)」(EBC method 9.30)では、試行ビールは、参照発酵ビールより良好な成績であった。試行発酵および参照発酵の両ビールの隣接ジケトンの濃度は、0.10mg/リットル未満であった(EBC method 9.24.1 ビール中の隣接ジケトン:分光光度法(Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method)により測定)。IFBM(Vandoeuvre-Iles-Nancy、フランス)で、訓練された評価委員会(8人で構成)により、官能試験を、標準手順、すなわち、サンプルを試飲後、評価者が味質特性について採点するという手順で実施した。結果を集計してサンプルの官能プロフィールを作成した。試験は、「アナリティカ-EBC(Analytica-EBC)」の2004年版第13章に記載された官能分析のためのガイドラインに準拠して行った。試飲委員会では、参照および試行発酵のビール間に大きな味質の差は観察されなかった。

20

【0080】

[結論]

30

この例は、プロリン特異性プロテアーゼおよびアセトラクテートデカルボキシラーゼを使用することによって、参照ビールのパラメータと類似し、かつ参照ビールと比較して味質に大きな差のない標準的なビールのパラメータ(欧州醸造協議会(EBC)が制定した方法により測定)を有するビールを製造できることを示している。さらに、9日間のラガーリング期間(対照)が4日間に短縮されることから、本発明の使用は、時間節約プロセスに繋がるものである。さらに、1日で0 にまで冷却し、この温度をさらに5日間維持する代わりに、4日以内に4 に冷却することによって、かなりのエネルギーが節約された。

【0081】

[実施例2]

40

[低温安定化期間の短縮と、酵素により安定化された100%モルトビールの透明度に与えるその効果]

短縮した低温安定化期間を採用したときの100%モルトビールに対するプロリン特異性エンドプロテアーゼの効果を評価するために、醸造試験を行った。その目的のために、6つの異なる麦汁を準備し、全く同一の手順で発酵させた(材料および方法を参照)。5つの発酵槽にアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)由来のプロリン特異性プロテアーゼを、0.125PU/リットルの濃度(活性の定義は、材料および方法を参照)になるように加え、しかも、その酵素は、5つの全ての発酵において、酵母投入の前に、低温麦汁に加えた。第6番目の発酵は参照用であり、プロリン特異性プロテアーゼは加えなかった。全ての発酵槽に新鮮なラガー酵母(約1千7百万個の細胞

50

/ m l 麦汁)を加え、5 プラートになるまで12 で発酵させ、その後、ジアセチルなどの隣接ジケトンを除去するために14 まで温度を上昇させた。熟成の終わり(この場合、発酵開始から9日後)に、マイナス1 までビールを冷却した。酵素を加えた全ての発酵槽からの熟成ビールを、様々な期間、マイナス1 に保持した後、珪藻土ろ過を行った。プロリン特異性プロテアーゼを加えた4つのバッチは、そのままろ過した。プロリン特異性プロテアーゼを加えた第5番目のバッチは、使い捨てPVP(40g/hl; ビールフィルターに向けて注入)によりインライン処理し、その後、ろ過した。

【0082】

酵素を加えなかった発酵槽からの熟成ビールもまた、マイナス1 まで冷却し、「古典的」安定化手順に供した。すなわち、ビールをマイナス1 に9日間保持した後、40g/hlの使い捨てPVPにより同一のインライン処理を行い、その後、珪藻土ろ過を行った。充填後、ピンを15PUで殺菌し、20 で保管した。

10

【0083】

6週間の保管期間の後、それらの各種ビールについて20 および1 でヘイズの測定を行った。そのために、ビールを測定温度、すなわち1 または20 で24時間のプレインキュベーションを行った後、その温度でヘイズの測定を行った。90度および25度の散乱を測定する濁度計を使用してヘイズの測定値を記録した。この濁度計(Haffmans VOS ROTA 90/25)で得られた90度および25度散乱データを、それぞれ「H90」および「H25」値として、関連する測定温度とともに表1に示す。これらのヘイズ測定に先立って、ピンを振盪して均一化し、十分な時間放置して気泡を消失させた。気泡が測定に影響しないよう、複数回の測定を行った。これらのヘイズの測定とは別に、訓練された評価委員会(n=5)により、目視評価および試飲評価を行った。

20

【0084】

【表 1】

表 1

	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3	バッチ 4	バッチ 5	参照
-1℃での安定化日数	0	1	3	5	0	9
プロリン特異性酵素	使用	使用	使用	使用	使用	不使用
PVPP (40 g/hl)	不使用	不使用	不使用	不使用	使用	使用
20℃でのヘイズ実測値 (H25)	0.30	0.31	0.32	0.28	0.28	0.27
1℃でのヘイズ実測値 (H25)	0.34	0.34	0.37	0.32	0.30	0.28
20℃でのヘイズ実測値 (H90)	0.48	0.59	1.06	0.83	0.48	0.48
1℃でのヘイズ実測値 (H90)	0.52	0.66	1.17	0.90	0.53	0.49
EBC 9.30準拠加速試験 (H25)	0.70	0.35	0.33	0.27	0.22	0.22
EBC 9.30準拠加速試験 (H90)	1.0	0.75	1.26	0.92	0.52	0.48
ビン詰め6週後、 8℃での目視評価 (EBC 9.29用語)	非常に 透明	非常に 透明	非常に 透明	非常に 透明	非常に 透明	非常に 透明
試飲 (ビン詰め3週間後)	良好	良好	良好	良好	良好	良好

【 0 0 8 5 】

目視検査によれば、全てのビン詰めビール、すなわち、低温安定化期間に供されなかった酵素処理ビールを含むビールは、20 で6週間の保管後、24時間、8 に冷却した後も完全に透明であった。

【 0 0 8 6 】

非常に意外なことに、これらの目視によるヘイズの評価は、異なる方法で得られたヘイズ測定値とは完全には一致しなかった。EBC標準では、EBC9.29法(90度散乱角で測定)に準拠して測定され、1.0~2.0EBCの値を得るビールは、「非常に僅かに濁っている(very slightly hazy)」となる。2.0EBCを超えると、ビールは「僅かに濁っている(slightly hazy)」になり始める。得られた90度散乱測定値は最大で1.26EBCにもなるが(表1参照)、これらのビールは全て、目視では「非常に透明(brilliant)」に格付けされた。この相違については実施例3で扱う。

【 0 0 8 7 】

また、専門家による試飲委員会によれば、製造されたビールがいずれも試飲プロフィールに異常を示さなかったということも、注目すべきことである。

【 0 0 8 8 】

[実施例 3]

10

20

30

40

50

[濁度測定およびヘイズの生成]

1 2 プラートの 1 0 0 %モルト麦汁に対し、実施例 2 に記載した手順に従って 3 つの 2 0 H l 発酵を行った。第 1 の発酵 (参照) は、発酵時にプロリン特異性プロテアーゼを加えずに行った。他の 2 つの発酵では、酵母投入時に A . ニガー (A . n i g e r) 由来のプロリン特異性プロテアーゼを、それぞれ 0 . 1 2 5 P P U / l および 0 . 2 0 P P U / l の濃度となるように加えた。熟成の終わり (この場合、発酵開始から 9 日後) に、3 種類のビールを全て、1 で 5 日間、低温で安定化させ、その後、酵母および低温沈殿物を除去した。いずれも P V P P またはシリカゲルによる処理は行わなかった。3 種のビールを全て、粗および微細グレードのプレコートが施された珪藻土フィルターでろ過した。最後に、ビールをビン詰めし、1 5 P U で殺菌し、その後、保存期間を調べるために室温で保管した。

10

【 0 0 8 9 】

種々の保管期間の後、ビールに 1 で 2 4 時間のブレインキュベーションを行い、その後、この温度において 9 0 度散乱角でビールのヘイズを測定した。測定に先立って、ビン振盪して均一化し、十分な時間放置して気泡を消失させた。気泡が測定に影響しないよう、複数回の測定を行った。得られたデータを表 2 にまとめて示す。

【 0 0 9 0 】

【 表 2 】

表 2

20

20℃での保管月数	0	3	6	9
	1℃で測定した H90 (EBC)値			
参照 (酵素不使用)	7.2	24.8	20.7	21.8
発酵+酵素 (0.125 PPU/l)	1.5	4.6	7.5	6.9
発酵+酵素 (0.20 PPU/l)	1.3	4.0	6.9	5.2

30

【 0 0 9 1 】

濁度測定とともに、訓練された委員会 (n = 5) によりビールの目視検査を行い、E B C 9 . 2 9 の用語を用いた判定を行った。

【 0 0 9 2 】

予想されたように、酵素処理を行わなかった参照ビールは、高い H 9 0 E B C 値を示した。この高 H 9 0 値に一致して、t = 0、3、6 および 9 ヶ月の全てのビールは、目視検査で「非常に濁っている (v e r y h a z y) 」 (E B C m e t h o d 9 . 2 9 に規定されている用語による格付け) と格付けされた。

40

【 0 0 9 3 】

酵素処理したビールの中で、新鮮な (t = 0) サンプルだけが低 H 9 0 値を示した (それぞれ 1 . 5 および 1 . 3 E B C) 。新鮮な酵素処理ビール (t = 0 ヶ月) に対する目視委員会の評価は、得られた H 9 0 値に基づく、「非常に僅かに濁っている (v e r y s l i g h t l y h a z y) 」との格付けが予想されたが、その予想に反して「非常に透明 (b r i l l i a n t) 」であった。

【 0 0 9 4 】

より長い期間保管された酵素処理サンプルは全て、4 E B C 以上の H 9 0 値を示した。意外にも、3、6 および 9 ヶ月の保管後の 2 種類の酵素処理ビールの目視による格付けは、H 9 0 値から予想される「濁っている (h a z y) 」でなく、「ほぼ非常に透明 (a l

50

most brilliant)」であった。

【0095】

したがって、ビール発酵プロセスにプロリン特異性プロテアーゼを使用したことの結果として、計器によるH90散乱値は、目視によるヘイズの認識の指標にならず、また、本発明のパッケージングされたビールのコロイド安定性の指標にもならないと結論しなければならない。さらに、本発明のビールは当該技術分野で知られているビールとは異なっていると結論しなければならない。

【0096】

[実施例4]

[異なる方法で安定化させたビールの粒子径分析]

10

IFBM (Institut Français de la Brasserie et de la Malterie, Vandoeuvre-les-Nancy, フランス)の半工業的パイロット醸造所において、12プラートの100モルト麦汁に対して、実施例2に記載した手順に従って、4種類の発酵を行った。発酵体の1つに、酵母投入時にA.ニガー (A. niger) 由来のプロリン特異性プロテアーゼを0.125 PPU/lの濃度となるように加えた。他の3つの発酵体にはプロリン特異性プロテアーゼは加えなかった。熟成の終わり(この場合、発酵開始から9日後)に、全てのビールを1で5日間、低温で安定化させ、その後、酵母および低温沈殿物を除去した。プロリン特異性プロテアーゼで安定化させなかった3種のビールのうちの1つは、その後、30g/Hlの使い捨てPVPで安定化させた(ビールろ過部に向けてインラインで注入)。プロリン特異性プロテアーゼを加えなかった別の1つのビールは、30g/Hlのシリカヒドロゲルで安定化させた(ビールろ過部に向けてインラインで注入)。A.ニガー (A. niger) 由来のプロリン特異性プロテアーゼで処理したビール、および残りの「非処理」対照ビールは、そのまま、すなわちPVPまたはシリカヒドロゲルを加えずにろ過した。4種のビール全てを、粗および微細グレードのプレコートをした珪藻土フィルターでろ過し、いずれの場合も、ろ過中に珪藻土のボディフィードを加えた。最後に、ビールをビン詰めし、15PUで殺菌し、その後、室温で保管した。処理中、酸素濃度を注意深く最小化し、そして、それは4種類全てのビールで同等であった。

20

【0097】

室温で約10ヶ月保管した後、4種のビールの粒子径分布を、Brewing Research International (BRI, Nutfield, 英国 (United Kingdom))において、光子相関分光法 (PCS) により、6で調べた。この技法は、粒子をそのまま計数するのではなく、光散乱の測定値を提供するものであって、散乱の割合と特定サイズのクラスの粒子と関連付けることができ、それにより4種のビールの粒子径分布を比較することが可能となる。

30

【0098】

累積の正規化散乱強度を図1にプロットする。図1は、「非処理」の対照ビールでは、全ての散乱光が2000ナノメートルより小さい粒子からのものであることを示している。PVPおよびシリカヒドロゲルで安定化したビールでは、光を散乱する粒子は全て、それぞれ約1250nmおよび750nmより小さい。しかしながら、プロリン特異性プロテアーゼで処理したビール中の粒子は平均してそれよりさらに小さく、385nmを超える大きさの粒子は見出されなかった。比較のために、図1のグラフを、次の2つの変数により定量化した。

40

- ・d50、散乱光の50%がこれより小さな粒子からのものである粒子直径、および
- ・d90、散乱光の90%がこれより小さな粒子からのものである粒子直径

後者のデータを表3に示す。

【0099】

【表 3】

表3:異なる安定化を施したiFBMビールサンプルのd50値およびd90値(説明は本文参照)。
 NT:非処理、PVPP:ポリビニルピロリドンポリマー、SHG:シリカヒドロゲル、PSP:プロリン
 特異性プロテアーゼ

処理	温度 (℃)	d ₅₀ (nm)	d ₉₀ (nm)
NT-対照	6	895	1073
30g/hl PVPP	6	556	1141
30g/hl SHG	6	537	629
0.125 PPU/l PSP	6	325	361

10

【 0 1 0 0 】

表3のd50およびd90の両者の値は、プロリン特異性プロテアーゼで処理したビール中で散乱を起こしている粒子は、PVPPまたはシリカヒドロゲルで安定化したビール中のものより、かなり小さいことを示している。これは、ヘイズ活性タンパク質をプロリン特異性プロテアーゼにより加水分解すると、エージング時のタンパク質 - ポリフェノール複合体の生成が防止ないし抑制されるという本発明者らの仮説と一致する。本発明者らは、プロリン特異性プロテアーゼのこのような作用の結果として、ヘイズ活性タンパク質が加水分解され、保管期間中、タンパク質とポリフェノールとの複合体がより小さいまま留まり、これにより、専門家による委員会によるヘイズの目視評価と測定器による比較的高い90度散乱測定値との間に不一致が見られると結論する。本発明者らは、再度、本発明の方法を使用して得られるビールが当該技術分野で知られているビールと異なるものであると結論する。

20

【 0 1 0 1 】

[実施例 5]

[低温安定化期間の短縮と、室温で4ヶ月および6ヶ月保管後の100%モルトビール中のヘイズの発達に及ぼすその影響]

30

この実施例では、実施例2に記載したビールの長期安定性に関するデータを提供する。ピン詰めされ、殺菌されたビールを、最大で6ヶ月間、室温(約20℃)で保管した。4ヶ月および6ヶ月の保管後、ビール(表1に示すように、バッチ1、2、3、4および5と参照)を、これも実施例2に記載した濁度測定および目視評価により分析した。得られたデータを表4に示す。

【 0 1 0 2 】

【表 4】

表 4

	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3	バッチ 4	バッチ 5	参照
-1℃での安定化日数	0	1	3	5	0	9
プロリン特異性酵素	使用	使用	使用	使用	使用	不使用
PVPP (40 g/hl)	不使用	不使用	不使用	不使用	使用	使用
室温で4ヶ月保管後に得られたデータ						
20℃でのヘイズ実測値 (H25)	0.60	0.58	0.51	0.38	0.36	0.36
1℃でのヘイズ実測値 (H25)	1.69	1.25	0.87	0.61	0.57	0.55
20℃でのヘイズ実測値 (H90)	0.82	0.87	1.32	0.96	0.65	0.51
1℃でのヘイズ実測値 (H90)	2.76	1.96	2.17	1.44	0.68	0.69
8℃での目視評価	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に透明	非常に透明	非常に透明	非常に透明
1℃での目視評価	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に透明	非常に透明
室温で6ヶ月保管後に得られたデータ						
20℃でのヘイズ実測値 (H25)	1.78	1.64	1.56	1.40	1.34	1.35
1℃でのヘイズ実測値 (H25)	2.17	1.74	1.38	1.12	1.10	1.04
20℃でのヘイズ実測値 (H90)	1.59	1.49	2.11	1.52	1.07	1.04
1℃でのヘイズ実測値 (H90)	4.24	3.10	2.97	1.94	1.11	1.00
8℃での目視評価	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に透明	非常に透明
1℃での目視評価	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に僅かに濁っている	非常に透明	非常に透明

【 0 1 0 3 】

実施例 2 の表 1 に示したデータは、室温で 6 週間保管後、EBC 9.29 に準拠した目視評価を行うと、ビン詰めされ殺菌されたビールは全て「非常に透明 (brilliant)」に格付けされることが示している。これらのデータによれば、低温安定化期間が、熟成ビールをマイナス 1 にまで冷却するのに必要な時間に短縮されたとしても、すなわち、この低温での保持期間を実質的に設けなくとも、プロリン特異性プロテアーゼを使用するだけで優れたビールが保障されることになる。しかしながら、表 4 に示すように、さらに長期間保管すると、ビールのヘイズ安定性は変化する。室温で 4 ヶ月保管後では、酵

素処理した全てのビール（0～5日までの低温安定処理がされている）に、非常に微かではあるがヘーズが生じている。したがって、プロリン特異性プロテアーゼを、最小限の低温安定化期間と組み合わせて使用するならば、100%モルトビールは、少なくとも6週間までは目視上、安定性が維持されると結論しなければならない。プロリン特異性プロテアーゼとPVPで処理されたバッチ5のビールは、最小限の氷点下の安定化期間が与えられただけであるが、「非常に透明（brilliant）」を維持している。したがって、後者の知見は、プロリン特異性プロテアーゼをPVPと組み合わせて使用すれば、ビールの長期的なヘイズ安定性に悪影響を及ぼさずに、低温安定化期間を飛躍的に短縮できることを示している。本発明者らが100%モルトビールを扱っているという事実からすれば、この知見はより意外である。

10

【0104】

[実施例6]

[酵素処理と高温での短い安定化期間との組み合わせ]

低温安定化期間の長さとは別に、ビールを0未満に冷却するために必要なエネルギーもまた、ビール製造プロセスのコストを大幅に増大させる。したがって、プロリン特異性プロテアーゼを使用するメリットは、理想的には、低温安定化期間の大幅な短縮に限定すべきものではなく、氷点下の安定化温度を不要のものとすべきである。この後者の選択肢をテストするために、新たな一連のパイロット規模の醸造実験を開始した。実質的に本願の材料および方法の項と実施例2に記載した条件下、20hlの規模で、6通りの醸造を試みた。ここでも、プロリン特異性プロテアーゼを使用することの効果を、PVPおよびシリカを使用した場合と比較した。0および7で、数時間から4日間にわたる種々の低温安定化手順を使用した。プロリン特異性プロテアーゼとPVPとは、有力なビール安定化の組み合わせと考えられるので、実施例2に記載した実験のバッチ5の条件を繰り返した。しかしながら、本実験では、ビールをマイナス1まで冷却せず、7までとした。後者の温度は、通常、ビン詰めまたはケグ詰めで使用される最高温度であるから、使い易い選択肢を提供することになるであろう。

20

【0105】

第1の20hl発酵では、熟成ビールを、0に冷却する1日を含む低温安定化期間、次いで、0での4日間の保管期間に供した。その後、ビールを珪藻土でろ過し、そのビールのろ過過程で2つに分けた。最初の7hlは珪藻土（ボディフィード）と混合した30g/hlのPVPにより処理し、最後の7hlは、これもまた珪藻土（ボディフィード）と混合したSiligel S（Spindal, Armainvilliers、フランス；40g/hl）で処理した。ろ過後、ビールをビン詰めし、殺菌した。表5では、これらの2種類の生成物をバッチ1（PVP使用）およびバッチ2（シリカゲル使用）という。

30

【0106】

第2の20hl発酵は、第1の発酵と全く同じ方法で行った。しかしながら、この場合には、ビールは、7に冷却する1日を含む低温安定化期間、次いで、7での4日間の保管期間に供した。これらの2種類の生成物をバッチ3（PVP使用）およびバッチ4（シリカゲル使用）という。

40

【0107】

第3および第4の20hl発酵は、両者とも、酵母投入前に、A.ニガー（A.niger）由来のプロリン特異性エンドプロテアーゼを0.125PPU/lの濃度になるように低温麦汁に加えて行った。この第3発酵から得られたビールは、0に冷却する1日を含む低温安定化期間、次いで、0での4日間の保管期間、その後、珪藻土ろ過（PVPおよびシリカゲルの添加なし）、ビン詰めおよび殺菌に供した（バッチ5）。第4発酵からのビールは、7に冷却する1日を含む低温安定化期間、次いで、7での4日間の保管期間に供した。この場合も、その後、珪藻土ろ過（PVPおよびシリカゲルの添加なし）、ビン詰めおよび殺菌を行った（バッチ6）。

【0108】

50

第5の発酵では、低温安定化を、熟成ビールを単に0℃へと冷却することによってのみ行い（所要日数1日未満）、その後、珪藻土でビールをろ過した。その後、ここでも、得られたビールを、そのろ過中に2つの部分に分けた。最初の7hlは珪藻土と混合した30g/hlのPVPにより処理した（バッチ7）。このビールの最後の7hlは、これもまた珪藻土（ボディフィード）と混合した40g/hlのSiligel Sで処理した（バッチ8）。

【0109】

第6の発酵は、再び、酵母投入前に、A.ニガー（A. n i g e r）由来のプロリン特異性エンドプロテアーゼを（0.125PU/l）の濃度になるように低温麦汁に加えた。熟成後、ビールを直ちに7℃まで冷却し、珪藻土と混合した30g/hlのPVPで処理した。ろ過後、このビールもまた、直ちにビン詰めし、殺菌した。表5では、得られたビールをバッチ9という。

10

【0110】

ビン詰め後すぐに、全てのビールについて、アルコール度、苦味度、ジアセチル濃度、ポリフェノール濃度およびノネナール濃度など、数多くの標準ビール分析を行った。さらに、泡の保持力を測定した（NIBEMおよびRoss & Clark）。得られたデータからは、得られた各種ビールの品質は類似しており、予測できないほどの差がないことがわかった。また、官能分析でも、些細な差が示されたのみであった。予想されたように、最も大きな差は、各種加速試験でのビールの成績に現れた。例えば、EBC9.30に準拠した加速データと、6日間、60℃の加速エージング試験後の最終的なヘイズの量を、各種ビールのビン詰め後すぐに測定した。これらの測定結果を表5に示す（「加速」および「6日間60℃」を参照）。表5には、また、室温で8週間保管後に記録したビン詰めビールの各種H90濁度のデータおよび目視評価を示す。これらH90データの測定は実施例2に記載したように行った。

20

【0111】

【表 5】

表 5

	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3	バッチ 4	バッチ 5	バッチ 6	バッチ 7	バッチ 8	バッチ 9
0℃での日数	4	4	-	-	4	-	冷却 のみ 0	冷却 のみ 0	-
7℃での日数	-	-	4	4	-	4	-	-	冷却 のみ 0
+プロリン特異性 酵素	無	無	無	無	有	有	無	無	有
+ PVPP	30 g/hl	no	30 g/hl	無	無	無	30 g/hl	無	30 g/hl
+シリカ	無	40 g/hl	無	40 g/hl	無	無	無	40 g/hl	無
加速試験: EBC.9.30 1℃での 最終ヘイズ (H90)	1.70	5.07	3.57	11.4	1.62	1.58	1.85	6.30	0.68
加速試験: 6日間 60℃ 1℃で 24 時間 (H90)	7.41	14.15	11.48	38.82	3.22	4.02	7.60	15.18	2.09
室温で 8 週間保管後得られたデータ									
1℃ (H90)	0.62	2.97	1.13	6.71	0.97	1.74	1.14	3.31	0.63
20℃ (H90)	0.69	0.71	0.50	0.58	0.82	1.50	1.08	0.60	0.54
8℃ 目視	Brill.	Brill.	Brill.	Vsh	Brill.	Brill.	Vsh	Vsh	Brill.
1℃ 目視	Brill.	Sh	Vsh	Hazy	Brill.	Brill.	Vsh	Sh	Brill.

「Brill.」: 非常に透明である(brilliant)、「Vsh」: 非常に僅かに濁っている(very slightly hazy)、

「Sh」: 僅かに濁っている(slightly hazy)。全て、24 時間保管後の EBC9.29 に準拠した目視評価。

「冷却のみ 0」は、示された温度に冷却後、その温度に保持しないことを示す。

【 0 1 1 2 】

表 5 に示したデータは、プロリン特異性プロテアーゼを単独で使用するだけで、低温安定化期間を飛躍的に短縮することができることを再度示している(バッチ 5 を参照)。さらに、表 5 のデータは、そのような短い安定化期間は、高温においても実行可能であることを示している(バッチ 6 を参照)。こうしたことから、特定のカテゴリーの醸造業者にとって、この知見は経済性に大きく関係するものである。実施例 5 で提供されたデータを

、プロリン特異性プロテアーゼを使用せずに安定化させたビールの比較的高い EBC . 9 . 30 加速試験値と組み合わせると、本実施例の表 5 に示すように、これらの安定化条件が、長期間保管後に目視による優れた透明性を有する (b r i l l i a n t) ビールになることを保障するのに十分でないことも、また、示唆している。長期の保存が予想されるならば、ここに示したデータ (バッチ 9) は、プロリン特異性プロテアーゼと P V P P 処理を組み合わせれば、「ビン詰め温度までの冷却のみ」の手順、すなわち、約 7 までの急速冷却で十分であることを示唆している。このように、本実施例の最も意外な知見は、プロリン特異性プロテアーゼ (長期保存が予想される場合は、場合により P V P P と組み合わせ) を組み合わせることにより、低温安定化期間を完全に省略できそうなことである。その意味するところは、熟成から直接ビン詰めという、非常に重要なプロセス上の短縮であり、さらに保存安定性に優れ、目視的に非常に透明 (b r i l l i a n t) であるビールが製造されることである。

10

【 図 1 】

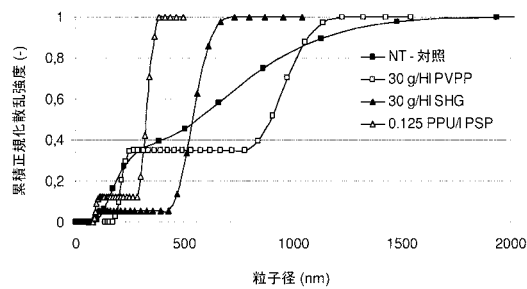


図 1 :

IFBM パイロットプラントで製造した 10 月齢ビールについて、
PCS により測定した粒子径と累積正規化散乱強度の関係。
安定化法については、凡例を参照のこと。NT: 非処理、PVPP: ポリビニルピロリドン
ポリマー、SHG: シリカヒドロゲル、PSP: プロリン特異性プロテアーゼ。

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/924,236
(32)優先日 平成19年5月4日(2007.5.4)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100152191
弁理士 池田 正人
(72)発明者 グエン, ミン-タム
オランダ, エンエル - 2 4 9 7 ベーハー デン ハーグ, アンソニー ホッカーシング
9 2
(72)発明者 エデン, ルッポ
オランダ, エンエル - 3 0 6 2 ジェイエル ロッテルダム, ホフラン 1 1 8
(72)発明者 ルーン, バン, ユルーン, ルイス
オランダ, エンエル - 4 8 1 4 ヴィエル ブレダ, ケインザーマントル 3

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 特表2007-505639(JP,A)
特表2004-515240(JP,A)
特表2005-528906(JP,A)
特開平03-172180(JP,A)
特開平02-265488(JP,A)
特表平08-512244(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12C 11/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
Cinii
G-Search