

# ビール造りの研究とは？

谷川 篤史

ビール製造はアルコール飲料産業の中でも、高度に工業化されており、日本を始め、世界中の工場で数百klもの巨大なプラントでの発酵や、製造が行われている。一方、ビールの原料は植物である大麦や微生物の酵母といった「生き物」であるため、味や香りのような製品の品質は大麦（麦芽）の良し悪しや酵母の生理状態によって大きく左右される。さて、生物工学会の会員の皆さんの中にはビール工場の見学をした経験があるかたもおられると思うが、十数mもの巨大な金属のタンクに入ったビールを目の当たりにし、研究室で行っている実験との関連性が今ひとつピンと来ないことはないだろうか。また、ビール製造といった特殊な産業で、どのような課題があり、どのような研究が行われているのか、具体的に知る機会は少ないのではないだろうか。そこで、本稿では、いくつかのビール醸造の研究課題をピックアップし、解説する。

## 大麦と酵母のコラボレーション。ビールの製法

個別の研究課題を述べる前に、まずはビールの製造法を簡単に説明する。ビールはその製造方法から、「単行複発酵型」の「醸造酒」に分類される。醸造酒とは、蒸留や、香辛料の浸出などが行われず、発酵を行った液そのものが製品となる酒である。複発酵式とは、酵母による糖からのアルコール生成以外に、他の生物による原料の分解工程（糖化）を含む方式のことである。酵母のアルコール生成は糖分の代謝によって行われるが、原料の主な糖分がデンプンのような多糖である場合、酵母は代謝することができない。そこで、他の生物によって糖分を1〜3糖に分解する糖化工程が必要となる。ビールは、糖化と発酵が別々の容器で行われる「単行」式である。単行に対し、並行複発酵の代表的なものに清酒が該当し、麴 (*Aspergillus oryze*) による糖化と酵母によるアルコール生成が同じ容器内で行われる。並行複発酵が、麴や酵母の「共同作業」で行なわれるのに対し、単行複発酵型のビールは、大麦（麦芽）と酵母の2つの生物のいわゆる「流れ作業」によって醸造される。

図1に、簡略したビールの製造工程を示す。製麦〜仕込までが大麦、発酵以降が酵母の生化学反応である。大麦は二条大麦 (*Hordeum vulgare*) を使用することが多く、ヨーロッパ、北米、オーストラリア、日本などさまざまな地域で栽培されている。その大麦を「製麦」と呼ばれ

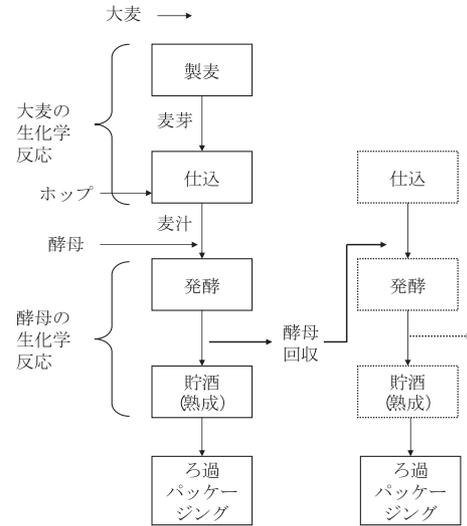


図1. ビールの製造工程

る工程で加工したものを麦芽と呼ぶ。製麦は、大まかに言うと、大麦に吸水させ発芽を促し、発芽初期状態の穀粒を乾燥させる工程である。この工程を経ることで、休眠状態の種子からアミラーゼ、プロテアーゼなどの分解酵素を生成し、タンパク質や炭水化物など自身の貯蔵物質の一部の分解が起こる。このようにして生成された麦芽が次の「仕込」工程で、マルトース、グルコースなどの糖分や、アミノ酸などの窒素源に分解され、酵母が吸収可能な栄養素を含んだ培地（麦汁と呼ばれる）となる。

もう一方の主役であるビール酵母は、発酵中の挙動から上面酵母、下面酵母に分類される。金色に透き通る色、白い泡、爽快な味わいが特徴のピルスナータイプのビールが世界中で主流であり、その大部分は下面酵母を使用している。下面酵母は、その名の通り、発酵終了時に、タンクの下部に酵母が凝集、沈殿する特徴がある。そのため、酵母の回収が容易であり、回収した酵母を再使用できる特徴を持つ。現在では、*Saccharomyces pastrianus* (以前は *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces uvarum*) に分類される。*S. pastrianus* は、出芽酵母の実験室株と異なり、5〜6倍体とされ、*S. cerevisiae* と一部のワイン酵母などが含まれる *Saccharomyces bayanus* の交雑株と考えられている。また、つい先日、*S. bayanus* ではなく、南米パタゴニアのブナの木から見つかった酵

母とも遺伝子配列の相同性が高いことが報告された例もある<sup>1)</sup>。現在、世界中のほとんどのビールの製造にかかわるこの酵母がどのような祖先をもつのか興味もたれるところである。では、これらの「生き物」が関わるビール造りには、どのような研究が行われてきたのかをいくつか取り上げてみよう。

### 見た目が一番。泡の研究

ピルスナータイプのビールの「ビールらしさ」を大きく演出するものは、金色に透き通る色はもちろん、白く盛り上がる泡である。清酒では、もろみに生じる高泡が製造上の課題となり、酵母の泡の気泡吸着性のタンパク質の解明 (Awai<sup>2)</sup>)、泡なし酵母の育種にまでつながったのとは対照的に、ビールでは注いだ際の泡立ちや、グラスへの泡の付着などが高品質の条件となる。麦芽に由来する脂質結合性や疎水性のタンパク質、ホップに由来するイソフムロンが架橋することで安定的なビールの泡ができる。そのため、麦芽中のどのようなタンパク質が泡に寄与しているのか、そのタンパク質の特定、解析、製造中のタンパク質の挙動変化などの研究が盛んに行われている。また、製造中、保存中に酵母が生成する酸性プロテアーゼにより、麦芽由来のタンパク質が分解され、泡の形成が阻害される現象も知られており、酵母のプロテアーゼ生成機構についても研究が進んでいる<sup>3)</sup>。

### 鮮度が大事。酸化防止の研究

缶や瓶に詰められたビールはさまざまな場所に輸送、保存される。場合によっては、直射日光や高温など過酷な条件下で長期間保存され、本来の味や香りが損なわれることがある。このような保存による変化は、ビール成分の酸化によって引き起こされる。酸化変化して生成する成分はさまざまあるが、アルデヒド類が多く、特に *trans*-2-nonenal は、カードボード臭 (ダンボール臭) と呼ばれる劣化臭の原因になる。*trans*-2-nonenal は、麦芽に含まれるリノール酸に由来するため、麦芽中の脂質酸化経路の解明や製造工程中での変化が研究されている (図2)。近年では、リノール酸からリノール酸9-ヒドロペルオキシドに変換する酵素、リポキシゲナーゼ-1 (LOX1) を欠損させた大麦の育種にも成功しており<sup>4)</sup>、保存性に優れたビール製造が期待されている<sup>5)</sup>。他方、ビール中の抗酸化物質として、麦芽、ホップ中のポリフェノールとともに、酵母が産生する亜硫酸が注目されてきた。亜硫酸は酵母のメチオニン生合成の中間代謝物であるため、アミノ酸代謝経路の研究や、亜硫酸を多く排出する酵母の育種などが行われている<sup>6)</sup>。また、製品の酸化を防ぐような醸造方法、パッケージング方法、製造後、迅速に出荷できる微生物の検査方法などの研究も進んでいる (図3)。

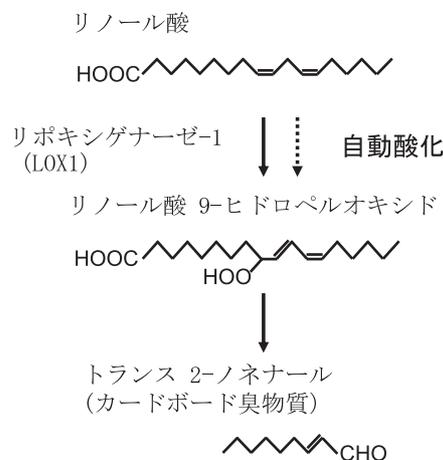


図2. カードボード臭の原因 *trans*-2-nonenal の生成機構

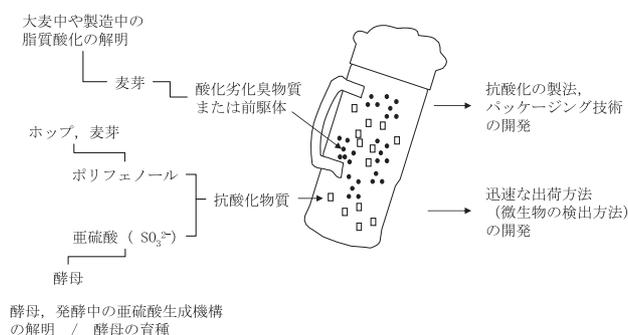


図3. 酸化防止のための研究

### 都合のいい? 性質。酵母の凝集性の研究

下面酵母の大きな特徴は、発酵終了時にタンク下部分に酵母が沈降することである。顕微鏡下で沈んだ酵母を観察すると、単に沈んでいるわけではなく、細胞同士が密着して大きな塊となった「凝集」状態であることがわかる (図4)。下面酵母は、アルコール生成を促進したい発酵初期には、細胞が液中に浮遊し、酵母を効率よく回収したい発酵終期には、酵母が沈む性質がある。ビール製造上大変「都合の良い」下面酵母の凝集はどのようにして起こるのか長年の研究課題となっている。研究が進むにつれ、凝集は出芽酵母の細胞表層のレクチン様の糖結合タンパク質 (Flo1p) と細胞表層のマノースの結合によることが分かってきた<sup>7)</sup>。その後、下面酵母特有のレクチン様タンパク質 (Lg-Flo1p) の発見やその糖結合の選択性、酵母の再利用を続けると凝集しなくなる性質の変化、栄養成分による遺伝子発現の様子などの詳細が解明されている<sup>8-10)</sup>。

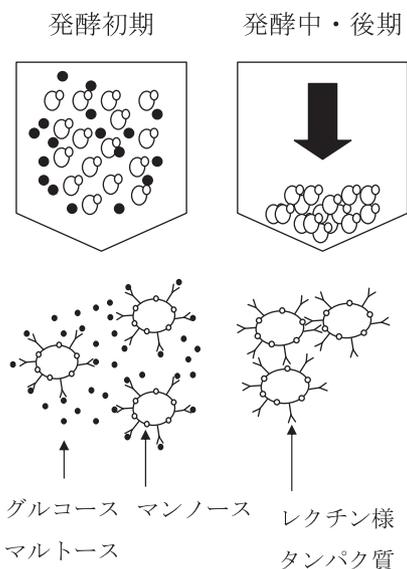


図4. 酵母の凝集のメカニズム。発酵初期には、レクチン様タンパク質は発酵液に含まれているグルコースやマルトースと結合しているが、発酵中・後期に液中からグルコースやマルトースがなくなると、酵母細胞表面のマノースと結合し、細胞同士が凝集し、タンクの底に沈む。

### 酵母の健康状態のチェック！ 酵母活性の研究

下面酵母は、酵母を回収し、何度か繰り返して酵母を利用できるため、酵母の培養工程がなく、迅速に大量の製造ができるメリットがある。しかし、酵母を何度も使用したり、酵母を保存する条件が悪かったりすると、発酵性（酵母の増殖やアルコール生成のスピード）や製品の品質が変化してしまう。そこで、醸造中に酵母がどのような生理状態にあるのかを詳しく評価する必要がある。それも細胞の生死だけではなく、醸造性にかかわる複雑な生理状態を、製造現場でリアルタイムに測定できることが理想的である。そこで、さまざまな色素を使用した染色法や細胞内の成分（グリコーゲン、トレハロースなどの貯蔵多糖）を測定する方法が開発されてきた（図5）。近年では、蛍光色素を利用して、細胞内のpHやエステラーゼ活性を測定する手法が提案されている<sup>11)</sup>。

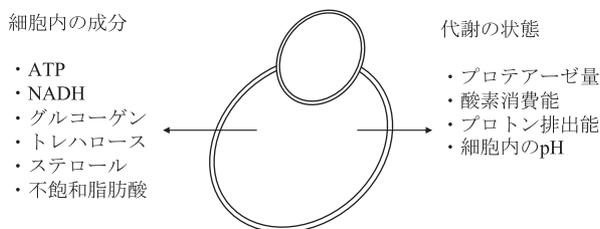


図5. さまざまな酵母の活性測定方法

### ビールの汚染. 乳酸菌の研究

ビールは微生物汚染が少ない飲料である。その理由は、アルコールを含み、嫌気状態であること、栄養源、pHが低いこと、ホップ由来の抗菌成分を含むためである。ただし、数百klのタンクで製造を行うため、一度微生物汚染が起こると多大な損害が生じる。そこで、微生物汚染を防ぐためや汚染した際に迅速に検出する測定方法などさまざまな研究が行われてきた。前述したようなビールの「液」の特殊な性質のため、ビール中で生育可能な微生物は限られている。そのほとんどが乳酸菌である。ビール業界では、このような乳酸菌をビール混濁乳酸菌と呼び、これらの迅速な検出方法や菌種の特特定などが研究対象となっている。しかし、ビール混濁乳酸菌はさまざまな菌種に広がっており、どのような菌がビールで生育するのが判明し難かった。その中で、ビール混濁性（ビールで生育可能な）主因子を特定する研究として、ホップ耐性遺伝子の研究が行われている。研究が進むにつれ、複数のビール混濁乳酸菌が共通のホップ耐性遺伝子 (*hor A*, *hor C*) を持つことが分かり、菌種間で遺伝子の水平伝播を示唆する興味深い事例が報告されている<sup>12)</sup>。これらの研究が、パッケージ前や後に熱殺菌することのない「生ビール」の製造を可能にし、また工場ですぐに出荷できる出荷体制の構築などにつながっている。

### ビールから温泉の匂い？ 栄養源の不足と硫化水素

最後に日本特有の市場条件により研究が進んだ事例を紹介する。日本のビール類は、原料や製法の違いでいくつかの種類に分類されるのが特徴的である。酒税法では、ビール、発泡酒、その他の醸造酒（発泡性）①、リキュール（発泡性）①の4品目に分けられ、それぞれの品目で麦芽の使用量が決められている。その中でも、発泡酒などではビールに比べて、麦芽の使用量が少なく、糖分として麦芽の代わりに液化した糖類を使用していることが多い。

こうした発泡酒では、原料中の糖分は十分なのだが、他の栄養分、麦芽に含まれているアミノ酸などが不足する傾向がある。そのような場合、深刻な発酵性の低下や、香りや味に負の影響を与える可能性があった。特に、温泉様の匂いである硫化水素 ( $H_2S$ ) の発生が予測された。 $H_2S$ は、温泉様の他にも腐敗した卵の匂いなどに例えられるオフフレーバーであり、数 $\mu g/l$ でも人が感じられる閾値の低い物質である。

$H_2S$ は酵母では、側鎖に硫黄を含んだアミノ酸であるメチオニン生合成の中間代謝産物として生成される。酵母はメチオニンが不足すると硫酸イオンを膜透過性のトランスポーターによって能動的に取り込みメチオニンを

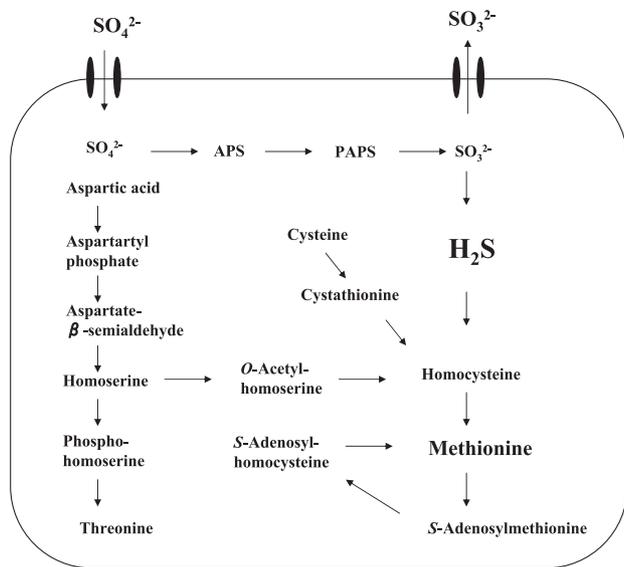


図6. 酵母のメチオニン合成経路 (APS, 5'-Adenylyl sulfate; PAPS, 3'-Phospho-5'-adenylyl sulfate)

合成しようとする(図6)。その中間体としてH<sub>2</sub>Sが生成される。1990～2000年代の発泡酒などの発売と時期を同じくして、分子生物学の技術が加速的に進む中、下面酵母のゲノムの解読、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子の発現解析や、代謝産物のメタボローム解析など様々な手法が行われた。その結果、下面酵母特有のH<sub>2</sub>S生成機構が明らかになってきている<sup>6,13)</sup>。

また、麦芽の使用率が下がると、アミノ酸だけではなく、ビタミンやミネラルなどの微量な栄養素の含有量も低下し、これらの欠乏も品質に影響を与えることもある。

たとえば、筆者らは、ビールテイスト飲料製造時に微量な栄養素が製造性や香り、味にどのような影響を与えるのかを研究している中で、ビタミン類のひとつであるピリドキシン(ビタミンB<sub>6</sub>)が欠乏した際に、これまでのビール醸造では感じられなかった腐敗様の香りが発生することを発見した<sup>14)</sup>。匂い嗅ぎGC(GC-O)やGC-MSでの測定の結果、その腐敗様の香りはインドールであることがわかった。ビール製造中のインドール発生は大腸菌群などの微生物汚染が原因として知られているが、微生物汚染以外の理由で酵母が生成する事例はこれまでのビール醸造ではみられない事象であった。インドールは酵母の代謝中、トリプトファン合成の中間体として生成される(図7)。トリプトファンは、(3-indolyl)-glycerol phosphateからトリプトファン合成酵素(Tryptophan synthase)によって生成される。このTryptophan synthaseはα、βの2つのサブユニットからなる酵素で、αサブユニットは(3-indolyl)-glycerol phosphateからインドール、βサブユニットはインドールからトリプトファンの反応を触媒すると考えられている。中でもβサブユニットの

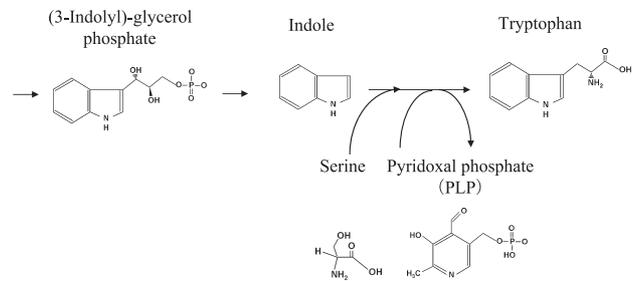


図7. トリプトファン合成経路

反応には、PLP (pyridoxal 5'-phosphate) が補酵素として必要である。PLPの供給源となるピリドキシン(ビタミンB<sub>6</sub>)が欠乏した場合、αサブユニットの反応だけが進行し、βサブユニットの反応が進まないため、腐敗様の香りをもつインドールが中間代謝産物として過剰蓄積されたのではと考えられた。

なお、各企業の研究努力もあり、現在市場で販売されている製品ではH<sub>2</sub>Sなどのオフフレーバーが閾値以上の多量に含まれているビール類はない。

### おわりに

筆者が学生の際に、産業、企業にどのような研究課題があるのか具体的に知る機会が少なかった。そこで、企業の応用研究にはどのようなものがあるのかを知る機会になればと思い、ビール醸造の研究を例とし、解説した。会員の皆さんの専門とされる分野が、産業に応用する可能性が広がれば幸いである。また、筆者の不勉強もあり、分野に偏りがあることをご容赦いただきたい。最後に、研究例として引用させていただいた諸先輩方に厚くお礼を申し上げたい。

### 文 献

- 1) Lidlind, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14539 (2011).
- 2) Shimoi, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018 (2002).
- 3) Kondo, H. *et al.*: *J. Biochem.*, **124**, 141 (1998).
- 4) Hirota, N. *et al.*: *Theor. Appl. Genet.*, **111**, 1580 (2005).
- 5) [http://www.sapporobeer.jp/news\\_release/0000020111/index.html](http://www.sapporobeer.jp/news_release/0000020111/index.html)
- 6) Yoshida, S. *et al.*: *Yeast*, **28**, 109 (2011).
- 7) Watari, J. *et al.*: *Yeast*, **10**, 211 (1994).
- 8) Soares, E. V.: *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 1 (2011).
- 9) Sato, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 395 (2002).
- 10) Ogata, T.: *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 1186 (2008).
- 11) Imai, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3604 (1995).
- 12) 鈴木康司ら：醸協, **102**, 314 (2007).
- 13) Nakao, Y. *et al.*: *DNA. Res.*, **16**, 115 (2009).
- 14) Arai, K. *et al.*: *ASBC Annual meeting* (2010).