

## ビール醸造に適した酵母の探索

和田健太郎\*<sup>1</sup> 原田雅典\*<sup>2</sup>

## Isolation of Yeast Strain Suitable for Beer Brewing from Plants in the Chichibu Region

WADA Kentaro\*<sup>1</sup>, HARADA Masanori\*<sup>2</sup>

抄録

秩父地域からマルトース発酵性のある酵母の分離を試み、得られた酵母のビール醸造適性を評価した。その結果、リンドウとミズキの二つの花から酵母を分離することができた。これらの酵母は26S rRNA 遺伝子のD1/D2領域の塩基配列解析から、*Lachancea thermotolerans* と *Lachancea meyersii* と同定された。麦汁発酵試験を行ったところ、いずれの酵母も市販ビール酵母と比較して、炭酸ガスの減少は緩やかに推移したものの最終アルコール濃度は同程度となった。また、製成酒の糖や有機酸の組成は市販ビールのものと異なっていた。今後、これらの酵母の特性を活かした新規ビール開発が期待される。

キーワード：酵母，花，ビール，有機酸，地域資源

## 1 はじめに

近年、全国的にクラフトビールがブームになっており、県内においても新規の醸造所は増加傾向にある。各社様々な果物や素材を副原料として使った個性的なビール造りに取り組んでいる<sup>1)</sup>。しかし、多くのビール醸造では市販の酵母を使用しているのが現状である。一方、日本酒業界では、地域ごとに自然界から酵母を分離し、その土地ならではの個性的な日本酒を生み出している。これらの地域固有の酵母は、ビール造りにも新たな可能性を秘めている。自然界から分離した酵母を使ったビールは、地域の特徴を表現し、ストーリー性のある商品として消費者の関心をひきつけることが期待される。

そこで本研究では、県オリジナルのビール開発を目的とし、秩父地域の花を中心とした森林資源から麦汁の主要糖であるマルトースを発酵できる酵母を分離し、ビール醸造適性の評価を行った。

\*<sup>1</sup> 食品・バイオ技術担当\*<sup>2</sup> 現 材料技術担当

## 2 実験方法

## 2.1 酵母の分離

試料は、秩父地域の森林を主な採取場所として、花や実を採取した。採取した試料は、YPM6 培地(酵母エキス 1%, ペプトン 2%, マルトース 6%)<sup>3)</sup> をオートクレーブ後、クロラムフェニコールを 100mg/L (エタノールに 0.1g/mL 溶解して添加)、プロピオン酸ナトリウムを 2g/L となるよう調製した液体培地に加え、28°C で約 7 日間集積培養した。濁りが認められた培養液の一部をガストラップチップの入った YPM6 液体培地で培養しガス生産性を確認した。YPM6 培地に寒天を 2% となるように加えて調製した平板寒天培地にガス生産が確認できた培養液を画線塗抹し、28°C で 24 時間培養した。生育したコロニーを釣菌し、別の YPM6 平板寒天培地で継代して純化した。

形態観察は、走査型電子顕微鏡(日本電子(株)製 JSM-IT300LA)により行った。走査型電子顕微鏡用の試料作製は、2% グルタルアルデヒド溶液で固定し、50~100% エタノール溶液で順次脱水後、t-ブ

チルアルコール凍結乾燥を行った。

## 2.2 酵母の同定

分離した酵母を同定するため、26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列を解析した。遺伝子解析は、(株)マクロジェン・ジャパンへの委託試験により行った。

## 2.3 キラー性試験

他の酵母の発酵を妨げるキラー性を確認するため、分離した酵母を YPD 平板寒天培地 (BD 社製) 上で市販のビール酵母 Safale S-04、S-33 (FERMENTIS 社製) と交差するように画線塗布し、28℃で24時間培養した。交差部位に、酵母の生育が抑制されて生じる透明なハローの有無を確認した。

## 2.4 麦汁発酵試験

麦汁にはモルトエクストラクト (Muntons 社製) を使用した。Brix13 になるように調整した麦汁 50 mL に酵母密度が  $1.0 \times 10^7$  cells/mL となるように接種し、20℃で10日間の発酵試験を行った。対照としてビール酵母 Safale S-33 (Fermentis 社製) を用いた。発酵経過は、炭酸ガス減量で評価した。発酵終了後にアルコール濃度の測定と糖、有機酸の分析を行った。

## 2.5 小規模試験製造

麦汁にはモルトエクストラクト (Muntons 社製) にホップペレットを添加したものを使用した。Brix13 になるように調整した麦汁 3.5L に酵母密度が  $1.0 \times 10^7$  cells/mL となるように接種し、20℃で発酵試験を行った。炭酸ガスの発生が収まるまで試験を続けた。対照としてビール酵母 Safale S-04 (Fermentis 社製) を用いた。発酵終了後にアルコール濃度の測定と糖、有機酸の分析を行った。

## 2.6 成分分析

Brix の測定は糖度計 (PAL-1、(株)アタゴ)、アルコール分はビールアナライザー (DSA-48、Anton

paar 社) により測定した。糖と有機酸の分析は高速液体クロマトグラフ (1260 Infinity II、アジレント・テクノロジー(株)) で行った。糖の分析は蒸発光散乱検出法 (ELSD) で行い、カラムは Shodex HILICpak VG-50 4E (4.6 mm×250 mm、粒径 5 μm)、溶離液には水とアセトニトリルを用いた。有機酸の分析はポストカラム法 (UV-Vis 検出器, 430nm) で行い、カラムは Agilent Hi-Plex H (7.7 mm×300 mm、粒径 8 μm) 2本、溶離液は 3mM 過塩素酸を用いた。

## 3 結果及び考察

### 3.1 酵母の分離・キラー性

本研究では、秩父地域の 28 種類の花や実からサンプリングを行い、マルトースを資化し発酵性のある酵母の分離を試みた。その結果、リンドウとミズキの花 (図 1) から 2 株を分離することができた。以下、リンドウから分離した酵母をリンドウ酵母、ミズキから分離した酵母をミズキ酵母とする。

リンドウ酵母及びミズキ酵母は、26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列解析の結果、それぞれ *Lachancea thermotolerans* 及び *Lachancea meyersii* と同定された。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) を使用して、分離した酵母の形態を確認した (図 2)。



図 1 左：リンドウの花、右：ミズキの花

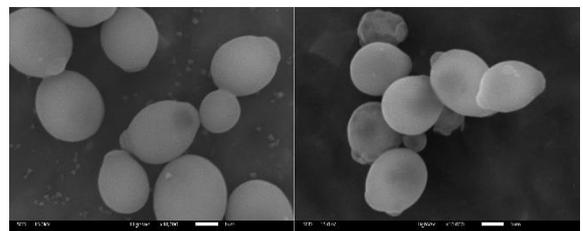


図 2 分離した酵母の SEM 画像  
(左：リンドウ酵母、右：ミズキ酵母)

*Lachancea thermotolerans* はワインやサワーエールの醸造に使用される報告<sup>4)</sup>が、*Lachancea meyersii* はブラジルのケフィアから分離された報告<sup>5)</sup>があり、どちらも食経験がある酵母であることから食品への応用が期待される。

分離したリンドウ酵母、ミズキ酵母のどちらも市販のビール酵母との境界にハローが認められなかったことからキラ性を有さないことが確認された。

### 3.2 麦汁発酵試験

発酵経過を図3に示す。分離した酵母は対照に対して炭酸ガスの減少が鈍く、緩やかに減少した。最終的にはリンドウ酵母は対照と同程度まで減少したが、ミズキ酵母の減少量はやや低かった。アルコール濃度は、対照のビール酵母が4.5%であったのに対し、リンドウ酵母は5.1%、ミズキ酵母は4.1%であった。麦汁と発酵後の糖濃度を図4に示す。グルコース、フルクトース、スクロースはすべての酵母で消費されていた一方、マルトトリオースは消費されていなかった。マルトースはミズキ酵母では完全には消費されていなかったが、これはマルトースの資化性が弱いためではないかと推察される。これにより、ミズキ酵母のアルコール生成量が対照よりも低くなったと考えられる。有機酸の濃度を図5に示す。対照と比較してクエン酸は変わらず、リンドウ酵母では乳酸が、ミズキ酵母ではリンゴ酸、コハク酸、酢酸が高かった。

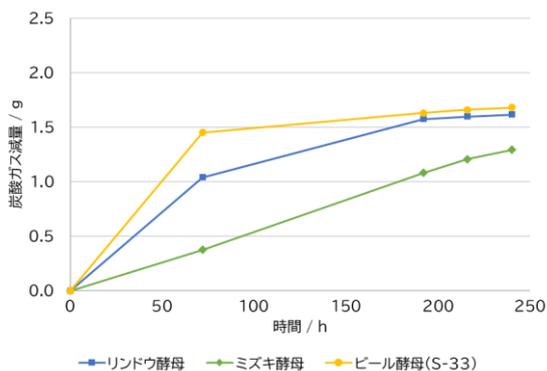


図3 発酵経過

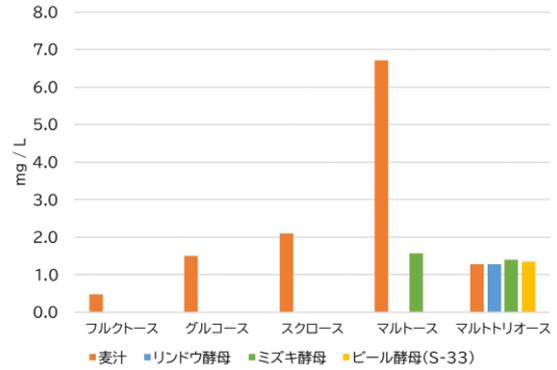


図4 麦汁発酵前後の糖濃度

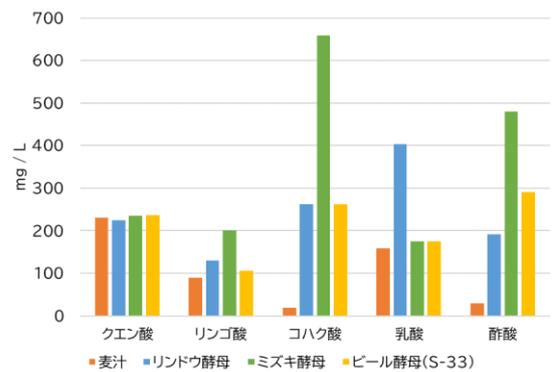


図5 麦汁発酵前後の有機酸濃度

### 3.3 小規模試験製造

発酵後の糖濃度を図6、有機酸濃度を図7に示す。麦汁発酵試験と同様に、ミズキ酵母ではマルトースが残っていた。有機酸組成も麦汁発酵試験と同様にリンドウ酵母は乳酸が多く、ミズキ酵母はコハク酸、リンゴ酸が多かったが酢酸はリンドウ酵母と同程度であった。製成酒はどちらも異味異臭はなく飲用上問題ないと評価できた。

リンドウ酵母はすっきりとした感じがあり、ミズキ酵母はややまろやかな印象であった。香りに関しては、いずれの酵母も特に顕著な特徴は認められなかったが、酵母由来の香気が穏やかであることから、ホップとの組み合わせによって多様な香味設計が可能であると考えられる。

これらの特徴は、市販ビールと比較して、味の面で差別化が可能であると考えられる。リンドウ酵母は乳酸、ミズキ酵母はコハク酸やリンゴ酸などを多く生成する特性を有しており、サワーエールのようなスタイルのビール製造に応用できる可能性がある。

本研究により、自然界から分離した酵母を用いて製造したビールが、独自の風味を有することが示された。今後は、酵母の糖質化性の改善や、ホップとの組み合わせによる味及び香りの特性解析を進めることで、新規ビールの開発につながる事が期待される。

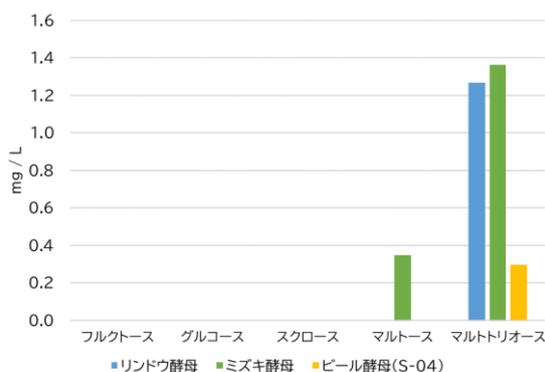


図6 麦汁発酵後の糖濃度

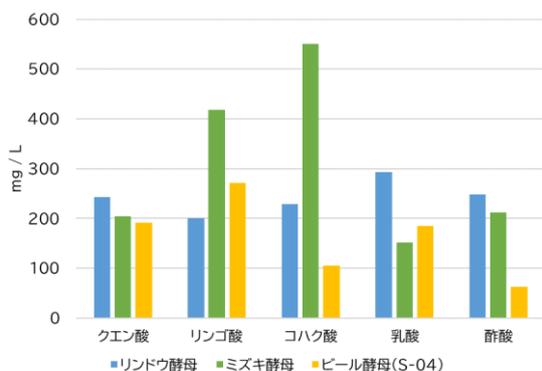


図7 麦汁発酵後の有機酸濃度

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、森林資源からのサンプリングに御協力いただいた特定非営利活動法人秩父百年の森の坂本裕三様、島崎武重郎様、斎藤隆様に感謝いたします。

### 参考文献

- 1) 都築正男, 桑原智也, “法隆寺境内の植物からの酵母分離と清酒への応用”, 奈良県産業振興総合センター研究報告, vol. 49, pp. 28-33 (2023)
- 2) 井上智実, 松田章, “花から分離した酵母を用いたオリジナル清酒の開発”, 石川県工業試験場研究報告, vol. 67, pp. 27-32 (2018)

- 3) 松本健一, 福嶋瞬, 小坂忠之, 山下創, 横須賀貞夫, 菊地明, 齋藤高弘, “付加価値の高い県産ビールの開発”, 栃木県産業技術センター研究報告, vol. 12, pp. 15-18 (2015)
- 4) 武内純子, 阪内淳逸, 山崎雅夫, “自然界からの酵母分離および分離された *Lachancea thermotolerans* の酒類製造上の性質と活用”, 日本食品科学工学会誌, vol. 72 no. 1, pp. 1-10 (2003)
- 5) Karina Teixeira Magalhães, Gilberto Vinícius de Melo Pereira, Cássia Roberta Campos, Giuliano Dragone, Rosane Freitas Schwan, “Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition”, Brazilian Journal of Microbiology, vol. 42, pp. 693-702 (2011)