

兼六園桜酵母の育種改良とオリジナルビールの開発

山崎裕也* 笹木哲也* 井上智実**

日本各地で地域性のある酵母を用いたクラフトビールの開発が盛んに行われている。当場ではこれまでに、兼六園の桜から発酵力の高い酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: KEN24-15) の分離に成功している。しかし、KEN24-15はマルトース発酵能が認められないため、ビールへの利用が難しかった。そこで、本研究では石川県独自のオリジナルビールを開発するために、マルトース発酵能を高めた兼六園桜酵母(KEN24-15)の育種改良を行うとともに、麦汁の発酵試験を行い、その醸造特性を評価した。KEN24-15を親株とした育種改良の結果、2-デオキシグルコース耐性を持つ株96株からマルトース発酵能の高いKEB10を選抜した。さらに、KEB10の麦汁発酵試験を行った結果、KEB10は市販ビール酵母と同等のマルトース発酵能(アルコール濃度4.4%)を示した。また、KEB10はカプリン酸エチル、カプリル酸エチルを比較的多く生産することが明らかとなった。

キーワード: 兼六園桜酵母, 育種改良, 2-デオキシグルコース, マルトース, ビール

Breeding Improvement of Kenrokuen Sakura Yeast and the Development of an Original Beer

Yuya YAMAZAKI, Tetsuya SASAKI and Tomomi INOUE

Many regions in Japan are actively developing craft beers using local yeasts. In a previous study, we successfully isolated a highly fermentative yeast (*Saccharomyces cerevisiae*: KEN24-15) from Kenrokuen cherry blossoms. However, KEN24-15 isn't suitable for brewing beer because it doesn't possess the fermentability of maltose. In this study, to develop an original beer unique to Ishikawa Prefecture, we improved the maltose fermentability of the Kenrokuen Sakura yeast (KEN24-15), and conducted a test brewing of wort to evaluate its brewing characteristics. As a result of the breeding improvement of KEN24-15, high maltose fermentability KEB10 was obtained from 96 strains resistant to 2-deoxyglucose. Furthermore, KEB10 showed the same maltose fermentability (alcohol concentration 4.4%) as a commercial beer yeast during the test brewing. In addition, the test sample brewed with KEB10 had larger amounts of ethyl caprate and ethyl caprylate than the sample brewed using a commercial beer yeast.

Keywords: Kenrokuen Sakura yeast, breeding improvement, 2-deoxyglucose, maltose, beer

1. 緒 言

近年、これまでにない多様性と、個性的な味わいを備えているクラフトビールの開発が盛んに行われている。そのような中、花などの地域由来の酵母を活用したクラフトビール¹⁾³⁾は、ご当地ビールとして観光土産市場などで大きな需要が期待できる。石川県工業試験場では、平成22年度より県内の名所旧跡の花などからアルコール発酵力の高い酵母の分離に取り組んできた。その結果、兼六園の八重桜から発酵力の高い酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: KEN24-15) の分離に成功し、この酵母を利用した清酒やパン、化粧品の開発を行い

県内企業に技術移転してきた⁴⁾⁶⁾。一方で、分離したままのKEN24-15はマルトース発酵能が認められないため、ビールへ利用することができなかった。

マルトース発酵能の向上については、2-デオキシグルコース(2-DG)存在下でマルトースを唯一の糖源とする培地で生育し、変異株を取得する方法が知られている⁷⁾⁸⁾。そこで本研究では、KEN24-15を用いたオリジナルビールの開発を目指して、2-DG添加培地によるKEN24-15の育種改良を行った。さらに育種改良した酵母を用いて麦汁の発酵試験を行い、その醸造特性を評価した。

*化学食品部 **企画指導部

2. 実験方法

2. 1 酵母の育種改良

2. 1. 1 2-DG耐性株の取得

グルコースリプレッションは、酵母においてマルトース等の発酵性糖の利用を抑制する現象である。グルコースのアナログ(類似体)である2-DGは、グルコースリプレッションを解除した変異株を取得するために広く使用され、ビール酵母においてはマルトース発酵能の高い株の取得が報告されている⁷⁾。そこで、兼六園桜酵母(KEN24-15)を親株として、マルトース発酵株を得るために以下①~③の工程にて2-DG耐性株の取得を試みた。①KEN24-15をYPD液体培地(イーストエキス1%, ポリペプトン2%, グルコース2%) 5 mLに1白金耳の量を接種し、30℃で2日間培養した。②これを遠心分離(5000 rpm, 4℃, 5分)で集菌・洗浄した後、滅菌水に懸濁し、その懸濁液を2-DG 0.02%添加したマルトース最少栄養培地(Yeast Nitrogen Base 0.67%, マルトース 2%, 寒天 2%)のプレートに塗布して、25℃で7日間以上培養した。③生育したコロニーから釣菌し、①~②の操作を繰り返した。このとき、2-DG濃度を0.02%から最大0.16%まで段階的に上げて繰り返し培養し、最終的に生育した株を2-DG耐性株として取得した。

2. 1. 2 マルトース発酵能の高い株の選抜

取得した2-DG耐性株を麦汁液体培地(モルトエキス(Muntons, SPRAYMALT light)13%) 5 mLに1白金耳の量を接種し、20℃で6日間静置培養した。その後、発泡が認められた株に対してアルコール濃度を測定し、マルトース発酵能の高い株を選抜した。

2. 2 麦汁の発酵試験

2. 2. 1 供試酵母

麦汁の発酵試験には育種改良したマルトース発酵能の高い株を用いた。対照としてKEN24-15, 市販ビール酵母(Muntons, Muntons Active Brewing Yeast)を用いた。

2. 2. 2 麦汁の調製

麦汁には、モルトエキスおよび、ドイツ産ノーザンブルワーのホップペレット(MoreFlaver製)を使用した。沸騰させた蒸留水2.5 Lにホップペレット1.5 gを添加し、30分間煮沸した。その後、ホップペレットを回収し、モルトエキス750 gを添加し、さらに5分間煮沸して、冷蔵庫内で1晩冷却したものを試験に供した。

2. 2. 3 麦汁発酵試験

各供試酵母を麦汁10 mLに1白金耳ずつ接種し、30℃で2日間振とうすることで培養を行った。遠心分離により培養した酵母を集菌し、500 mLの麦汁に添加して、20℃で6日間保持することで発酵試験を行った。

2. 2. 4 アルコールおよび糖分析

アルコール濃度の分析はアルコール濃度計(アルコメイトAL-2・理研計器(株))を用いた。糖分析は、試料をメンブレンフィルター(0.45 μm)でろ過した後、適宜希釈して高速液体クロマトグラフ(HPLC)に供することで実施した。装置には示差屈折率検出器(株島津製作所, RID-10A)を備えたClass-VPHPLCシステム(株島津製作所)を用い、カラムはアミノカラムAsahipakNH2P-50E(昭和電工(株), 4.6×250 mm)を用いた。カラムオープン温度は40℃, 注入量は10 μLとした。溶離液はアセトニトリル:水=75:25とし、流量は1.0 mL/minとした。なお、糖類は麦汁の主要可溶性糖類である単糖のグルコースおよびフルクトース, 二糖のマルトース, 並びに三糖のマルトトリオースを測定した。

2. 2. 5 香気成分分析

香気成分はガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS 7890A/5975C・アジレント・テクノロジー(株))を用いて分析した。バイアル内に試料5 mLと内部標準物質として0.1%の3-pentanolを0.1 mLを入れ、オートサンプラー(MPS2・ゲステル(株))にて、50℃で保持したバイアル内ヘッドスペースの香気成分をSPMEファイバー(DVB/Car/PDMS・Supelco製)で30分間抽出した。測定条件はカラム(DB-WAX 60 m×0.25 mm×0.25 μm・アジレント・テクノロジー(株)), 注入口温度230℃, オープン温度40℃(10 min保持)→5℃/min→230℃(12 min保持), スプリット比1:10とした。香気成分は、マススペクトルのNIST/Wileyライブラリとの一致, リテンションインデックスのAroma Office (ver.3.00.03・西川計測(株))データベースとの一致で同定した。また、内部標準物質のピーク強度から各成分のピーク相対強度を算出した。

3. 結果および考察

3. 1 2-DG耐性株およびマルトース発酵能の高い株の選抜

2-DG濃度を0.02%から段階的に最大0.16%まで上げ

て繰り返し培養を行った結果、2-DG耐性株を96株得ることができた。得られた96株に対してマルトース発酵能の確認を行った結果、発泡性を確認できた株が10株得られた。得られた10株(KEB1~10)のアルコール測定結果を図1に示す。KEN24-15はアルコール濃度0.1%であったが、発泡性を確認できた10株はアルコール濃度0.1%以上を示し、マルトース発酵能の向上が見られた。特にKEB3(アルコール濃度1.6%)、KEB4(アルコール濃度1.7%)、KEB10(アルコール濃度1.8%)の3株は高いアルコール濃度を示した。発泡性を確認できた10株はマルトース発酵能が向上していたことから、グルコースリプレッションが解除された変異株である可能性が高いと考えられる。中でもKEB10は最もマルトース発酵能の高い株であり、生育性が最も良いことから、より効率的にマルトースを代謝・利用できる株であると考えられ、麦汁の発酵試験に供することとした。

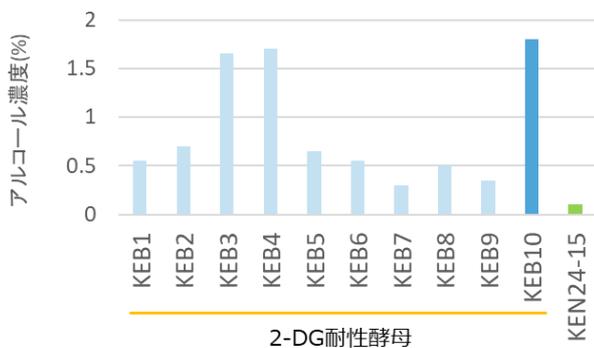


図1 2-DG耐性株のマルトース発酵能

3. 2 麦汁の発酵試験

3. 1の結果からKEB10及び、比較対照として親株であるKEN24-15と市販ビール酵母を用いて麦汁の発酵試験を行った。各酵母の発酵中の糖類およびアルコール濃度について経時的に測定した結果を図2, 3, 4に示す。親株であるKEN24-15はマルトースを発酵することなく、アルコールの生成もほぼ認められなかった。一方、KEB10と市販ビール酵母は発酵開始から経時的にマルトースを資化していき、4日目にはマルトースを全て資化して、それに対応してアルコールが生成された。最終的なアルコール濃度はどちらの酵母も4.4%であり、育種したKEB10は今回使用した市販ビール酵母と同等のマルトース発酵能があることが明らかとなった。また、三糖のマルトトリオースはどちらの酵母も資化されず、1.3%残存した。一部の清酒酵母やワイン酵母はマルトトリオース資化能が弱く、アルコール

生産性が抑制されることが報告されている^{9),10)}。一般的なビール酵母でアルコール濃度5%程度生産されるのに対して、アルコール濃度4.4%に留まった原因はマルトトリオース資化性の低さであると考えられた。

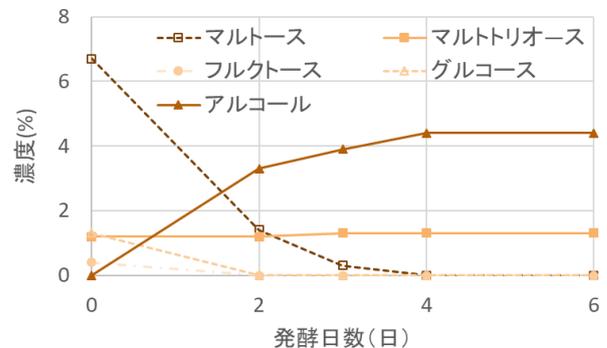


図2 KEB10の発酵経過

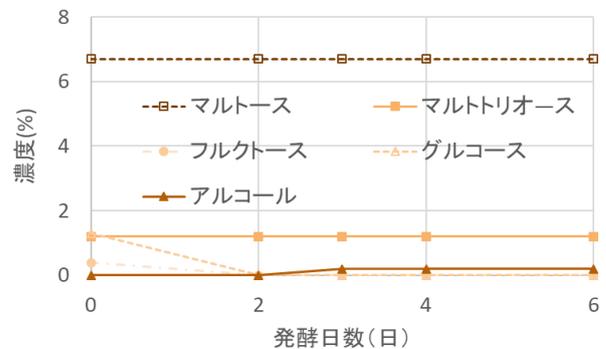


図3 KEN24-15の発酵経過

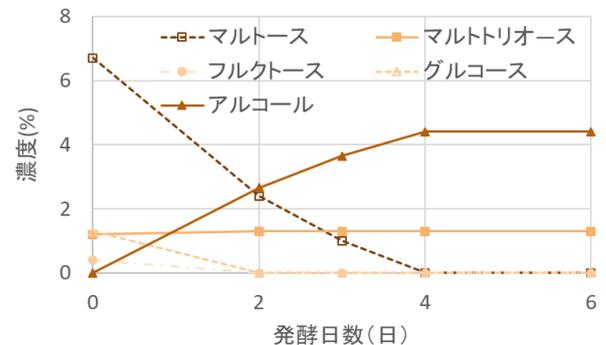


図4 市販ビール酵母の発酵経過

ビールの醸造において、酵母は様々な香気成分を生成している。それらにはアルデヒド、硫化水素、ジアセチルなどの若臭と呼ばれる好ましくない香気成分(オフフレーバー)や、エステル類などの銘柄固有のフレーバーとして評価される香気成分があり、ビールの特徴を決める成分として重要である¹¹⁾。そこで、酵母が生成する香気成分を確認するため、KEB10および市販ビール酵母で試作したビールの香気成分分析を行った。香気成分分析の結果、定性的に検出される成分はいず

れも同様の傾向を示した。ピーク強度と実際の感じ方は比例しないものの、高級アルコール類のフェネチルアルコール(バラ様香)、イソアミルアルコール(マーカ様香)、エステル類の β -酢酸フェネチル(桃の花様香)、酢酸イソアミル(バナナ様香)、カプリン酸エチル(甘様香)、カプリル酸エチル(アプリコット様香)、ラウリン酸エチル(石鹸様香)等が比較的高いピーク強度で検出され、オフフレーバーは検出されなかった。パネラー3名で簡易的な官能評価を行った結果、KEB10を用いたビールはアプリコット様の香りや甘い香りを有しているとの意見があった。これらに關与すると考えられる成分の相対ピーク強度はカプリン酸エチル(甘様香)が約1.7倍、カプリル酸エチル(アプリコット様香)約2.0倍KEB10を用いたビールに多い傾向が認められた(図5)。濃度の把握と閾値についての詳細な検討を行う必要があるが、KEB10を用いたビールのアプリコット様の香りや甘い香りはこれらの成分が關与している可能性が示唆された。

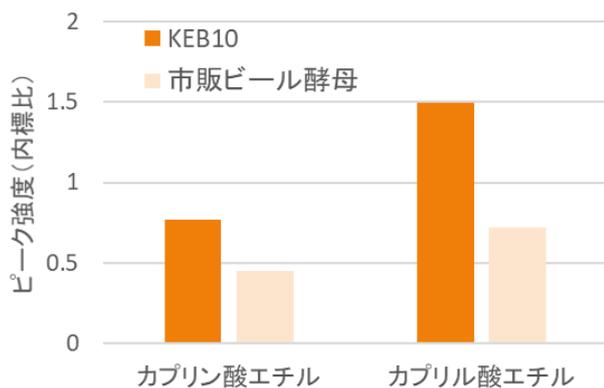


図5 各酵母の香氣成分分析結果

4. 結 言

本研究では石川県独自のオリジナルビールを開発するために、マルトース発酵能の高い兼六園桜酵母(KEN24-15)の育種改良を行うとともに、麦汁の発酵試験を行い、その醸造特性を評価したところ、以下の結果を得た。

- (1) 2-DG耐性酵母の中からマルトース発酵能の高い酵母KEB10を選抜した。
- (2) KEB10は市販ビール酵母と同等のマルトース発酵能(アルコール濃度4.4%)を示した。また、カプリン酸エチル、カプリル酸エチルを比較的多く

生産し、甘い香りやアプリコット様の香りが特長であることが明らかとなった。

これらの結果から、KEB10は甘い香りやアプリコット様の香りが特長のビールとなることが期待でき、ビール用酵母として利用可能であることが示された。

今後、育種改良した酵母を活用した石川県オリジナルビールの開発を積極的に進めていきたい。

参考文献

- 1) 渡部貴志, 齋藤季之, 倉田善弘, 柳澤昌臣, 吉野 功. やよいひめ酵母を用いた地ビール醸造の実用化. 群馬県群馬産業技術センター研究報告. 2020, p. 29-33.
- 2) 鈴木雅博, 勝山聡, 岩原健二, 稲村浩宣. 静岡県オリジナルのビール酵母の開発. 静岡県工業技術研究所研究報告. 2018, p. 77-81.
- 3) 鈴木成宗, 坂宮章世, 金澤春香, 栗田 修, 矢野竹男, 荻田修一. 樹液から単離した香気生産野生酵母のビール香気特性および実用性の評価. 日本食品工学会誌. 2016, vol. 17, no. 2, p. 59-69.
- 4) 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. 2017, no. 67, p. 27-32.
- 5) 井上智実, 山崎裕也. 石川県産酵母を用いたパンの開発. 石川県工業試験場研究報告. 2016, no. 66, p. 43-46.
- 6) 山崎裕也, 井上智実, 笹木哲也. 石川県産酵母の化粧品素材としての有効性評価. 石川県工業試験場研究報告. 2020, no. 69, p. 28-31.
- 7) Srdjan Novak, Tony D'Amore, Inge Russell, Graham G Stewart. Sugar uptake in a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1991, vol. 7, p. 35-40.
- 8) 関口昭博. 製パン用酵母「美の和酵母」の改良研究. 群馬県群馬産業技術センター研究報告. 2008, p. 9-12.
- 9) 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎. ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性. 日本醸造協会. 1998, vol. 93, no. 12, p. 967-975.
- 10) 望月玲於, 勝山聡. 様々な酒類醸造用酵母株のビール醸造特性の評価. 静岡県工業技術研究所研究報告. 2020, no. 13, p. 55-57.
- 11) ビール酒造組合, 国際競技委員会(BCOJ)編. ビールの基本技術. 日本醸造協会. 2002, p. 63-66.