

## やよいひめ酵母を用いた地ビール醸造の実用化

渡部貴志・齋藤季之\*・倉田善弘\*・柳澤昌臣・吉野 功\*\*

Breeding of novel craft beer brewed by a Yayoihime strawberry yeast  
WATANABE Takashi, SAITOU Toshiyuki,  
KURATA Yoshihiro, YANAGISAWA Masaomi and YOSHINO Isao

地ビールは、地域の特性を活かしたものが多く、多種多様で根強い人気がある。そこで本研究では、群馬県独自ブランドいちご「やよいひめ」から取得した酵母（やよいひめ酵母）から、ビール醸造に適するもの（PM13）を選抜し、新たな地ビールの開発に取り組んだ。やよいひめ酵母はいずれもマルトースを資化し、キラー活性はなかった。製品化した新地ビール「プリンセスマーチ・ロナ」は、「Japan Great Beer Award 2019」で金賞を受賞した。また、地ビール会社へ拡大培養酵母を安定して供給するため、ジャーフェーマンターを用いた培養条件の検討を行ったので報告する。

キーワード：やよいひめ、地ビール、酵母、拡大培養、ジャーフェーマンター

Craft beers are brewed with local characters, such as climate and food culture, and various quality. Thus, they are extremely consumed by fond of alcohol drink. In the presented study, we selected a yeast strain PM13, which was isolated from Gunma original “Yayoihime” strawberry as a suitable strain to brew beer. All Yayoihime yeast strains used utilized maltose as carbon source and did not have killer activity. We succeeded to produce a novel craft beer “Princess March RONA” which was prized gold medal of “Japan Great Beer Award 2019”. For the stable supply of cultivated yeast to a craft beer factory, we also performed jar-fermentor cultivation.

Keywords: Yayoihime strawberry, craft beer, yeast, cultivation, jar fermentor

### 1 はじめに

ビールは、麦とホップを原料とし、酵母によって醸される嗜好性の飲料である。全国のビール生産量の大半は、大手四社が占めているが、地域の特性を活かした地ビール会社の造り出す地ビールにも、根強い人気がある。月夜野クラフトビール株式会社は、月夜野びどろパークに併設するレストランに工場直送の地ビールを提供できる強みを持ち、観光と直売所を有しているだけでなく、群馬県産の麦芽を用いたビール造りも行っている。

バイオ・微生物係

\* 月夜野クラフトビール株式会社

\*\* 環境・エネルギー係

ビール醸造で用いられる酵母の多くは市販のものであるため、群馬県独自の酵母を用いることが可能となれば、消費者に分かりやすく、商品の独自性を説明できる。一方、群馬産業技術センター（当センター）では、群馬県独自ブランドいちごの「やよいひめ」から清酒酵母の探索を行っており、前橋工科大学の善野教授の研究室から、パン酵母探索の過程で単離されたやよいひめ酵母を分譲されている。これらの酵母は、冷凍耐性や乾燥耐性が無いため、パンの製造には向かないことが分かっている。また、発酵力が弱く、清酒のオフフレーバーの4-ヴィフェニルグアイアコール（4-VG）も産出するため、清酒醸造にも向かないことが分かってきた。

これらのことから、独自性のある酵母を探していた月夜野クラフトビールと、やよいひめ酵母をワインやビールといった清酒よりもアルコール度数が低い酒類への利用を模索していた当センターが協力し、新たな地ビール開発に取り組むことになった。

そこで本研究では、やよいひめ酵母がビール醸造に適しているか調べ、当センターでの小仕込み試験で酵母を選抜し、月夜野クラフトビール株式会社で選抜した株を用いた実地醸造試験を行った。また、実地醸造試験により、大量の酵母を安定して供給する技術開発をすることが、実用化に向けて不可欠であることが明らかとなったため、ジャーファーマンターを用いた培養条件の検討を行ったので報告する。

## 2 実験材料と方法

### 2.1 供試酵母

前橋工科大学から分譲されたやよいひめ酵母8株を用いた。なお、うち7株はビール酵母も属する *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) であり、残りの1株がワイン酵母の一種 *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*) であると同定済みである。また、(独)酒類総合研究所より分譲して頂いた、清酒酵母きょうかい701号(K701)を対照株として用いた。

### 2.2 酵母のキラ活性の評価

キラ活性評価用の培地には、YM寒天培地(0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ペプトン、1.0%グルコース、2.0%寒天)を加温加圧滅菌後、5 mL/Lとなるように乳酸を加えて固めたものを用いた。培地にK701を描線接種した後、各供試酵母をK701と交差するように描線接種し、30℃で24時間静置培養を行い、キラ活性によるK701の増殖阻害が起きるかを調べた。

### 2.3 酵母の糖資化性の評価

炭素源を含まない最小寒天培地(0.67% YNB w/o amino acids、2.0% agar)に、グルコースまたは、ガラクトース、マルトースを2.0%となるように添加した。それぞれの培地に酵母を接種し、30℃で48時間静置培養を行い、増殖の有無で資化性を

評価した。

### 2.4 加ホップ麦汁発酵能力試験

麴エキスは、秋田今野株式会社から冷凍濃縮麴エキス(Brix 20°)を購入し、Brix 5°となるように水道水で希釈して121℃、15分間の加温加圧殺菌処理をした。前培養では麴エキス5 mLを加え、酵母を一白金耳接種し、30℃、150 rpmで24時間振盪培養を行った。本培養は、100 mL容三角フラスコに麦汁培地(月夜野クラフトビールより提供された麦汁(Brix 12°)を121℃、5分間の加温加圧殺菌処理をしたもの)50 mLを加え、前培養液を50 µL接種し、15℃で8日間静置培養を行った。培養後のサンプルを全量回収し、遠心上清(7,000 rpm × 5分間)の密度を酒類用振動式密度計(DA-155、京都電子工業(株)製)を用いて分析した。

### 2.5 小仕込み試験

前培養は、試験管に麴エキス25 mLを加え、酵母を一白金耳接種し、30℃で48時間静置培養を行った。ガラス容器(800 mL容)に500 mLの麦汁を加え、培養酵母を遠心分離(3000 rpm × 1分間)で回収し、前述の麦汁培地にて再懸濁を行ったもの(25 mL)を接種した。大型低温水槽で浸漬し(15℃)、24時間毎に炭酸ガス発生による重量減少量を測定した。

### 2.6 分析方法

酒精度(アルコール濃度)、酸度は国税庁所定分析法に従い、分析を行った。pHおよびBrixはそれぞれ、pH計と糖度計を用いて分析した。糖類(グルコース、マルトース)は、高速液体クロマトグラフ、示差屈折率検出器を用い、分析を行った。香氣成分(酢酸エチル)は、ヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

### 2.7 実地醸造に向けた拡大培養

実地醸造に向け、当センターで拡大培養した酵母を冷蔵便で月夜野クラフトビール株式会社へ提供した。1度目の実地醸造試験では、清酒酵母の拡大培養と同様に麴エキス500 mLで拡大培養した酵母を提供した。2度目の実地醸造試験では、研究用のBecton Dickinson社製の酵母エキスではなく、市販の食品添加物用のミーストP1G

(アサヒフードアンドヘルスケア株式会社製)を用いた酵母エキス培地(3%酵母エキス、5%スクロース)を用いた。前培養は酵母エキス培地5 mLを試験管に加え、酵母を一白金耳接種し、30℃、150 rpmで24時間振盪培養を行った。本培養は、500 mL容三角フラスコに酵母エキス培地160 mLを入れ、前培養液を全量加え、30℃、150 rpmで24時間振盪培養を行った。12本分の培養液(約2 L)を遠心分離(5,000 rpm×5分間)し、得られた菌体を麴エキス500 mLに再懸濁したものを提供した。

拡大培養酵母を安定して供給するため、ジャーファーマンターを用いた培養条件の検討を行った。前培養は酵母エキス培地50 mLを300 mL容三角フラスコに加え、酵母を一白菌耳接種し、30℃、150 rpmで24時間振盪培養を行った。本培養では、拡大培養用培地1.2 Lを3 L容ジャーファーマンターに入れ、前培養液を全量加え、30℃で攪拌羽回転数400 rpm、0.3 LPMの通気を行った。なお、消泡剤は食品添加物の信越シリコーンKM-72(信越化学工業株式会社製)を200倍希釈し、培養開始時に5 mL加えることにより、高泡形成による培養液の流出を防いだ。上記の基本条件の下、拡大培養用培地の組成について検討を行った。

### 3 結果と考察

#### 3.1 酵母のキラ活性

自然界に生息する酵母の中には、キラー毒素という毒を生産することにより、その他の酵母を死滅させる能力(キラ活性)をもつものがある。酒造現場でキラ活性を有する酵母が存在すると、酒造目的で使用する有用酵母を死滅させてしまう恐れがあるため、自然界から取得した酵母を用いる場合、はじめにキラ活性の有無を調べる必要がある。

キラ活性を持たない清酒酵母 K701 の増殖を阻害するか調べたところ、いずれのやよいひめ酵母もキラ活性を有していないことが確認でき(データ略)、実用化へ向けた第一段階の課題をクリアした。

#### 3.2 酵母の糖資化性

ビール酵母やパン酵母、清酒酵母はいずれも *S. cerevisiae* に属しているが(あるいは近縁種)、様々な性質が異なっている。例えばビール醸造では、麦芽の酵素がデンプンをグルコースとマルトースに分解するため、麦汁中にマルトースが多く存在する。従って、ビール酵母のマルトース資化性は重要な性質であるが、清酒酵母にはマルトース資化能が無く、ガラクトース資化性が弱いものが多いという特徴がある。

用いたやよいひめ酵母はいずれも、グルコースだけでなくマルトース、ガラクトースを資化し、寒天培地上で増殖した。一方、対照株として用いた清酒酵母 K701 は、既存の報告通りマルトースを資化せず、増殖は弱かった(データ略)。以上の結果から、ビール醸造に必要な基本的な能力をやよいひめ酵母が持っていることを確認した。

#### 3.3 加ホップ麦汁発酵能

酒類醸造では、開放形で行われているため、雑菌汚染を防ぐために様々な方法がとられている。ビール醸造では、麦芽により糖化した麦汁に雑菌増殖抑制効果があるホップを加えて煮沸することにより、殺菌処理をしたものを用いている。ビール酵母に求められる能力の一つには、この加ホップ麦汁でも効率よく増殖し、発酵できることである。そこで向井らの方法<sup>1)</sup>に従い、短時間の加温加圧滅菌処理した麦汁培地での発酵能を調べた。

いずれのやよいひめ酵母もボーメ度を下げていたため(表1)、麦汁をよく発酵し、エタノールを生産していることが分かった。やよいひめ酵母13、31、49、65は、培養初期で良く泡発生していたので選抜した。

表1 発酵によるボーメ度の変化

	ボーメ度
Blank	6.80
やよいひめ酵母1	1.74
やよいひめ酵母3	1.71
やよいひめ酵母13	1.67
やよいひめ酵母24	1.75
やよいひめ酵母31	1.69
やよいひめ酵母49	1.68
やよいひめ酵母56	1.68
やよいひめ酵母65	1.66



図1 小仕込み試験の様子（2連で実施）

### 3.4 小仕込み試験

ビール醸造では、加ホップ麦汁を滅菌処理せずに発酵しているため、パイロットスケールでの発酵試験を行う前に、小仕込み試験をして各酵母の発酵能と醸造成分を調べる必要がある。そこで、前述の向井らの方法を参考にし、500 mL規模の小仕込み試験を実施した（図1）。

用いた4種のやよいひめ酵母は、いずれも2日目から良く発酵し、5日目までに発酵がほぼ終了した（図2）。得られた製成酒のアルコール濃度は、約5%であり、グルコースとマルトースもほぼ消費されていたことから、成分分析の面からも、やよいひめ酵母が加ホップ麦汁を発酵していることが確認できた（表2）。一方で、それぞれの供試株の挙動は、2連の間で少しずつ異なっており、微生物実験の再現性の難しさが認められた結果であった。

また、セメダイン様の香りでオフフレーバーである酢酸エチルの濃度が低めであり、官能試験でも比較的良好だったやよいひめ酵母13と31が最終選抜株となった。なお、やよいひめ酵母13は、*T. delbrueckii* と同定された株である。

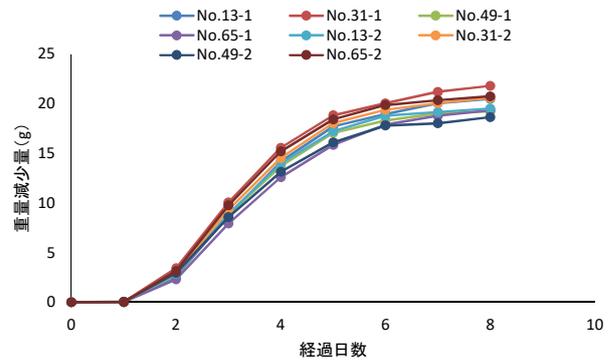


図2 重量減少量の経日変化

### 3.5 実地醸造試験

さらに検討を進め、やよいひめ酵母13を選抜し、月夜野クラフトビール株式会社で1000 L規模の実地醸造試験を行うことになった。用いる麦芽やホップなどの醸造条件は、酒質に関わるものであるため月夜野クラフトビール株式会社に検討を依頼し、当センターでは実用化へ向け、どの程度の酵母量を提供するかを調べることにした。

小仕込み試験の検討では、麦汁500 mLに対し、酵母の添加量を2.5 mLまで減らしても問題なく発酵していたことから、1度目の実地醸造試験では、清酒酵母の拡大培養と同様に麴エキス500 mLで拡大培養した酵母を提供した。しかしながら、酵母を添加して4日間程度は目立った発泡が確認されず、規模を大きくすると同じ割合で酵母添加量を増やしただけでは対流が起きないことが認められた。

はまゆり酵母で地ビール開発をした岩手県工業技術センターに問い合わせをしたところ、麦汁5 L分の酵母培養液を添加していることが分かったので、調製しやすく酒税法で利用しても問題ない食品添加物用の酵母エキスを利用して、酵母の拡大培養を

表2 小仕込み試験酒の各種成分分析のまとめ

	重量減少量 (g)	エタノール (%)	酸度	pH	Brix	グルコース (%)	マルトース (%)	酢酸エチル (ppm)
Blank	-	-	-	4.9	12.6	0.9	6.9	-
No.13-1	20.5	5.1	3.6	4.1	6.1	0.0	0.0	11.6
No.31-1	21.8	5.1	3.4	4.1	6.1	0.0	0.0	11.1
No.49-1	19.2	5.1	3.6	4.1	6.2	0.0	0.0	9.7
No.65-1	19.3	4.7	3.8	4.0	6.6	0.0	0.2	20.9
No.13-2	19.5	4.8	3.7	4.1	6.4	0.0	0.0	17.7
No.31-2	20.6	4.8	3.4	4.0	6.6	0.0	0.0	17.6
No.49-2	18.6	4.6	3.4	4.0	6.4	0.0	0.1	14.4
No.65-2	20.8	5.0	3.8	4.1	6.8	0.0	0.1	15.6



図3 Princess March RONA

行うことにした。また、静置による嫌気培養ではなく、酵母菌体の増殖速度が速く、増殖量も高い好気培養を採用し、得られた菌体を500 mLの麹エキスに濃縮して提供したところ、実地醸造試験でも問題なく発酵することが可能となった。

得られた試験データを参考に月夜野クラフトビール株式会社が制作した新商品「Princess March RONA」（図3）は、日本地ビール協会の「Japan Great Beer Award 2019」で金賞を受賞することができた。なお、前橋工科大学の善野教授とも協議し、やよいひめ酵母13を「PM13」と命名し、群馬県共通の財産として保管することが決まった。

### 3. 6 拡大培養酵母提供の安定化

岩手県のケースでは、（独）製品評価技術基盤機構との共同で「はまゆり酵母」の探索と地ビール製造を行っており、酵母の拡大培養は民間企業に委託されている。しかしながら、群馬県だけでは酵母の外部機関への流出を監視することができないため、拡大培養酵母を当センターで提供することになった。また、拡大培養酵母は新鮮な状態で提供する必要があり、提供する時期も不定期であることから、一定の品質のものをできるだけ効率的かつ迅速に培養する技術開発が必要となった。

ジャーフェーマンターは、温度、攪拌数、通気量、pHなどを制御、モニタリングできる卓上型の培養装置である。ジャーフェーマンターは、酵素や医薬品などの有用物質生産で用いられる培養装置へスケールアップする前段階に用いられている（図4）。



図4 ジャーフェーマンターの外観

フラスコ培養と同じ組成の酵母エキス培地では、培養開始18時間前後（午前2～3時）には炭素源が枯渇し、細胞の自己消化が始まった。次に酵母エキスの添加量を3%から2%へ減らしたところ、今度は菌体量が不足してしまった。そこで酵母エキスに不足し、酒税法上問題ないリン酸一カリウム0.025%と硫酸マグネシウム・七水和物0.005%を添加したところ、1回のジャー培養（1.2 L）で三角フラスコ12本分（2 L）とほぼ同量の菌体量が得られた。

## 4 まとめ

本研究では、群馬県独自ブランドいちご「やよいひめ」から取得した酵母PM13を用いた地ビール醸造の実用化を行った。月夜野クラフトビール株式会社で「Princess March RONA」として商品化された。また、拡大培養酵母提供のため、ジャーフェーマンターを用いた培養技術を確立した。

### 謝 辞

本研究の一部は、平成30年度 ぐんま新技術・新製品開発推進補助金の受託研究として行った。前橋工科大学の善野修平 教授には、PM13を提供して頂いた。（独）酒類総合研究所の向井伸彦 醸造技術部門長には、地ビール開発の助言を頂いた。岩手県工業技術センターの佐藤稔英 主任専門研究員には、酵母提供量を教えて頂いた。

### 文 献

- 1) 向井伸彦ら：日本醸造協会誌、93、967-975（1998）