

ナラノヤエザクラ酵母のビール醸造特性

栗原 智也^{*1)}

Beer brewing characterization of “Naranoyaezakura” yeast

KUWAHARA Tomoya^{*1)}

ナラノヤエザクラ酵母は、奈良県が 2008 年に国立大学法人奈良国立大学機構奈良女子大学と共同で奈良公園のナラノヤエザクラの花から単離した酵母であり、2009 年には特許出願するとともに本酵母を使用した清酒が商品化され、現在も製造・販売されている。しかし、特許出願後から現在に至るまで、ナラノヤエザクラ酵母の使用が特定の 1 者のみに留まっていることから、ナラノヤエザクラ酵母の新たな活用方法の検討を行った。その結果、ナラノヤエザクラ酵母は高いマルトース発酵能を有することが明らかとなり、麦汁発酵試験においても高いアルコール発酵能を示したことから、ビール醸造に適用可能であることが示された。さらに、ナラノヤエザクラ酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* の変種で分泌性グルコアミラーゼを産生できる *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) であることが、PCR 法による簡易識別によって強く示唆された。*S. diastaticus* は、ベルギービールの 1 つであるセゾンスタイルのビール醸造で多く使用されていることから、ナラノヤエザクラ酵母はセゾンスタイルビールに利用可能な酵母であることが示唆された。

1. 緒言

これまで奈良県では、清酒醸造業界で広く使用されているきょうかい酵母との差別化を図るため、県内の地域資源から単離した野生酵母を使用した清酒の開発を進めてきた¹⁾²⁾³⁾。そのうちの 1 つ、ナラノヤエザクラ酵母は 2008 年に国立大学法人奈良国立大学機構奈良女子大学と共同で奈良公園のナラノヤエザクラの花から単離した酵母であり、2009 年には特許出願⁴⁾するとともに本酵母を使用した清酒が県内清酒製造会社より商品化され⁵⁾、現在も製造・販売されている。ナラノヤエザクラ酵母を使用した清酒は、低アルコールで甘みはあるものの、リンゴ酸やコハク酸の含有量が高く、しっかりとした酸味のあるフルーティーな味わいであることが特徴である。しかし、ナラノヤエザクラ酵母は特許出願から現在に至るまで県内清酒製造会社 1 者のみの使用に留まっており、本酵母の新たな活用方法を見出すことが課題となっていた。

一方、近年のクラフトビールブームの影響もあり、国内の地ビール製造場数が 184 (平成 29 年) から 405 (令和 2 年) と顕著に増加しており⁶⁾、奈良県内のクラフトビール醸造所も増えてきている。このような背景のもと、ナラノヤエザクラ酵母をビール醸造に適用できないか検討したところ、本酵母は麦汁中で良好なアルコール発酵能を示し、ビール醸造に適用可能であることを見出した。さらに、遺伝子解析の結果、ナラノヤエザクラ酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* の変種である *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) であることが強く示唆され、ベ

ルギービールの 1 つであるセゾンスタイル⁷⁾のビール醸造に利用可能な酵母であることが示唆されたので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用酵母及び培地

酵母は、県有酵母のナラノヤエザクラ酵母及び山乃かみ酵母、市販ビール酵母の SafAle US-05 (Fermentis 社)、LalBrew Belle Saison (Lallemand 社)、SafAle WB-06 (Fermentis 社) を使用した。培地は、YPD 培地 (グルコース 2%、ペプトン 2%、酵母エキス 1%)、SMal 培地 (マルトース 2%、Yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%) を使用した。

2.2 マルトース発酵試験

ナラノヤエザクラ酵母、山乃かみ酵母及び US-05 を YPD 5 mL で 30 °C、100 rpm で一晩前培養させ、集菌後、滅菌水で 2 回洗浄し、滅菌水に再懸濁させた。再懸濁液を SMal 培地 10 mL に OD₆₀₀=1/mL となるよう添加後、20 °C で 7 日間静置培養し、Brix の経時変化を測定した。

2.3 麦汁発酵試験

2.3.1 麦汁調製

粉砕済みの北米産ベースモルトを 2 kg に水 6 L を添加し、50 °C で 30 分間加熱後、65 °C で 90 分間加熱し、さらに 85 °C で酵素失活させて糖化液を調製した。糖化液をステンレスざるで粗ろ過後、粗ろ液にペレット状のカスケードホ

*1) バイオ・食品グループ

ップ 17 g 添加し、60 分間煮沸した。煮沸後は 4 °C で一晚保管し、上清を麦汁原液とした。その後、麦汁原液を Brix 14 になるように滅菌水を添加して麦汁を調製した。

2.3.2 麦汁発酵試験

ナラノヤエザクラ酵母及びUS-05をYPD 5 mLで30 °C、100 rpmで一晩培養後、培養液 400 µLをYPD 40 mLに添加し、30 °C、100 rpmで24時間培養した後、集菌後滅菌水で2回洗浄した。得られた菌体を滅菌水 10 mLに再懸濁させ、麦汁 500 mLにOD₆₀₀=0.2/mLとなるように菌体懸濁液を添加し、20 °Cで21日間静置培養した。培養液の重量変化をCO₂減量として計測し、CO₂減量をモニターすることによって、発酵能を評価した。発酵終了後、発酵液を10,000 rpmで15分間遠心分離し、上清をビールとした。アルコメイトAL-2(理研計器株式会社)を用いて、ビール中のアルコール濃度を測定した。また、pH、比重、Brixを、それぞれ、コンパクトpHメーターB-211(株式会社堀場製作所)、あまからメイトDA-120(京都電子工業株式会社)、PR-101α(株式会社アタゴ)を用いて測定した。

2.4 PCR法によるSTAI+株の簡易識別

STAI+株の簡易識別には、Krogerusら、Yamaguchiらが報告している既知のプライマーペア STAI_1055_F (5'-CCCAAATTCATTCGTAGCC-3')⁸⁾とSD-6B (5'-GATGGTGACGCAATCACGA-3')⁹⁾を使用し、STAI及びプロモーター領域の一部を増幅させた。鋳型DNAには、ナラノヤエザクラ酵母のほかに、ネガティブコントロールとしてSTAI-株のUS-05、ポジティブコントロールとしてSTAI+株のBelle Saison、弱いSTAI+株のWB-06のgDNAを使用した。gDNAは、Genとるくん™(酵母用)High Recovery(タカラバイオ株式会社)を使用して抽出した。鋳型DNA(0.5 µg未満)に、TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase(タカラバイオ株式会社)10 µLを添加し、各プライマーを0.3 µMとなるように加えて、滅菌水で総量20 µLに調製して、PCR反応液とした。Veriti™ 96-Well Fast サーマルサイクラー(Thermo Fisher Scientific)を用いて、94 °C 1分、(98 °C 10秒、60 °C 15秒、68 °C 90秒)×30サイクルで増幅した。増幅させたPCR産物は、1.0%アガロースで電気泳動し、泳動バンドを確認した。

3. 結果及び考察

3.1 マルトース発酵試験

ビールの原料となる麦汁の糖組成は、グルコースが約10%～15%、マルトースが約50%～60%、マルトトリオースが約15%～20%、そのほか4糖以上の多糖類が約20%～30%であり¹⁰⁾、マルトースが大半を占めることから、ビール醸造にはマルトース発酵能が必須である

といえる。そこで、マルトース発酵能の有無を調査するため、マルトースを唯一の炭素源とする最少培地(SMal培地)を用いて発酵試験を行った。

その結果、ナラノヤエザクラ酵母の発酵では、発酵1日目にBrixが減少した(図1)。SMal培地は炭素源がマルトースのみであることから、Brixの減少はマルトースの消費とみなすことができ、ナラノヤエザクラ酵母はマルトース発酵能を有することが示された。さらに、ナラノヤエザクラ酵母の発酵では、市販ビール酵母のUS-05と比較して、発酵初期のBrix減少量はわずかに劣るものの、ほぼ同様の減少傾向が見られ、市販ビール酵母と同等のマルトース発酵能を有することが示唆された。一方、同じく具有酵母である山乃かみ酵母の発酵では、発酵5日目まではBrixの減少がなく、マルトース発酵能が低いことが明らかとなった。

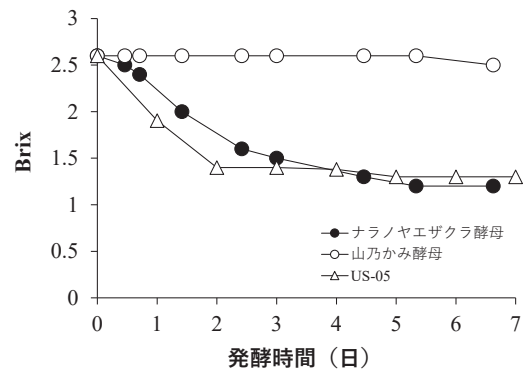


図1 マルトース発酵試験におけるBrix経時変化

3.2 麦汁発酵試験

ナラノヤエザクラ酵母はビール酵母と遜色ないマルトース発酵能を有していたので、ビールの原料である麦汁を用いた発酵試験を行った。ナラノヤエザクラ酵母及びUS-05を用いた発酵試験での経時的な累積CO₂発生量(A)と重量測定時点での単位時間当たりのCO₂発生量の経時変化(B)を図2に示す。

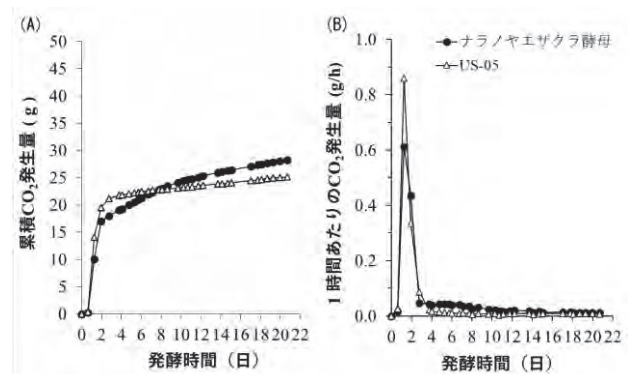


図2 麦汁発酵試験におけるCO₂発生量

ナラノヤエザクラ酵母及びUS-05を用いた発酵では、いずれも単位時間当たりのCO₂発生量は発酵2日目に最大

となり、4日目以降は大幅に減少した。また、US-05の発酵では4日目以降のCO₂発生量が約0.01 g/hで推移しており、発酵3日目以降は発酵がほぼ完了していると考えられる。一方、ナラノヤエザクラ酵母の発酵では、発酵4日目以降も約0.05 g/hの高いCO₂発生量を維持し、発酵4日目の時点で累積CO₂発生量はUS-05よりも少なかったものの、発酵7日目にはUS-05を上回った。

ビール中のアルコール濃度においては、ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビールの方がUS-05よりも高かった(表1)。さらに、初期比重と最終比重の差を初期比重で割ることで算出した発酵度においても、ナラノヤエザクラ酵母で醸造した方が高かった。また、ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビールのpHはUS-05より低く、酸味が強いビールであることが示唆された。

表1 麦汁発酵試験結果

	ナラノヤエザクラ酵母	US-05
アルコール(%)	6.25	5.90
初期比重	1.0560	1.0560
最終比重	1.0073	1.0104
発酵度(%)	87	81
pH	4.3	4.6

3.3 PCR法による *STA1*+株の簡易識別

ビール酵母には、エールビールを醸造するための上面発酵酵母とラガービールを醸造するための下面発酵酵母の大きく2種類が知られている。上面発酵酵母は、その大半が *S. cerevisiae* に属しており、そのうち *S. cerevisiae* の変種である *S. diastaticus* は、一部のビールスタイルで使用されている¹¹⁾。*S. diastaticus* は、分泌性グルコアミラーゼを産生することから、多糖類を発酵に利用できる酵母であり、麦汁中で高いアルコール発酵性を示す。ナラノヤエザクラ酵母は、麦汁発酵試験において高い発酵性を示したことから、PCR法による簡易識別により、*S. diastaticus* かどうかを確認した。

S. diastaticus は、分泌性グルコアミラーゼをコードする *STA1* 遺伝子を所有するため、*STA1* の有無を調べることで識別が可能である⁹⁾。さらに、最近、Krogerusらは、*STA1* のプロモーター領域に1,162 bpの欠損がある場合、*STA1*+株であっても表現型が弱くなるため、*STA1* 及びプロモーター領域の一部を増幅させることで、*STA1*+株、弱い *STA1*+株、

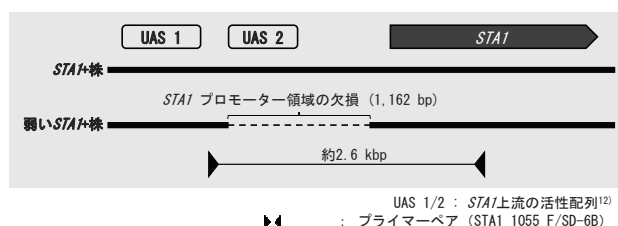


図4 *STA1*+株の簡易識別方法

STA1-株の識別が可能であることを報告しており⁸⁾、同様の方法でナラノヤエザクラ酵母の簡易識別を行った(図4)。

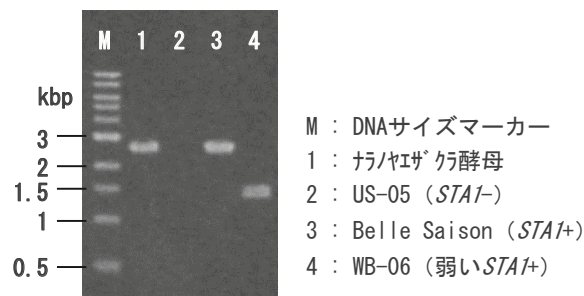


図5 簡易識別結果

その結果、ナラノヤエザクラ酵母は、*STA1*+株の Belle Saison と同じ約2.6 kbpの増幅DNA断片が確認され、完全なプロモーター領域を所有する *STA1*+株であることが示唆された(図5)。さらに、麦汁発酵試験の結果も考慮すると、ナラノヤエザクラ酵母は *S. diastaticus* であることが強く示唆された。

S. diastaticus は、瓶詰めや缶詰め後のビールに混入していた場合、容器内に残存する多糖類により発酵してしまい、破裂事故等につながることから、腐敗酵母として認識されている¹⁰⁾。しかし、その高いアルコール発酵能から一部のビールスタイルでは本酵母が好んで用いられている。特に、ベルギービールの1つであり、近年人気となっているセゾンスタイルビールでは、*S. diastaticus* が使用されている¹⁰⁾。このことから、ナラノヤエザクラ酵母もセゾンスタイルビールに利用可能な酵母であることが示唆された。

4. 結言

本研究では、県有酵母であるナラノヤエザクラ酵母について、清酒醸造以外の新たな活用方法を見出すために、ビール醸造への適用を検討した。主な結果は以下の通りである。

- (1) ナラノヤエザクラ酵母は、SMal培地を用いた発酵試験において、市販ビール酵母US-05と遜色ないマルトース発酵性を有することが確認された。
- (2) ナラノヤエザクラ酵母は、麦汁発酵試験において、市販ビール酵母US-05よりも高いアルコール発酵能を示した。
- (3) ナラノヤエザクラ酵母は、PCR法による簡易識別により、*S. cerevisiae* の変種であり、セゾンスタイルビールで多く用いられる *S. diastaticus* であることが強く示唆された。

以上の結果より、ナラノヤエザクラ酵母はセゾンスタイルビールに利用可能な酵母であることが示唆され、清酒醸

造以外の活用方法を新たに見出すことができた。

参考文献

- 1) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木孝仁, 岩口伸一, “ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発”, 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.35, 35-38, 2009
- 2) 都築正男, 大橋正孝, 清水浩美, “ササユリからの酒造用酵母の分離とその醸造特性”, 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.41, 5-11, 2015
- 3) 藤野布久代, 西尾実紗, 都築正男, 特許第 7002077 号, “クズの花から分離した酵母の取得方法, クズの花から分離した酵母, この酵母を用いた清酒の製造方法及びその他の飲食物の製造方法”, 株式会社井上天極堂, 奈良県
- 4) 松澤一幸, 清水浩美, 大橋正孝, 都築正男, 岩口伸一, 鈴木孝仁, 特許第 4601015 号, “ナラノヤエザクラの花から分離した酵母, この酵母を用いた清酒の製造方法及びその他の飲食物の製造方法”, 奈良県, 国立大学法人奈良女子大学
- 5) 岩口伸一, “奈良八重桜から分離した花酵母でつくった爽やかな旨味の清酒”, 生物工学, 87, 7, 356-357, 2009
- 6) 国税庁, 酒のしおり (令和 4 年 3 月)
- 7) Poelmans, E., Taylor, J., “Belgium's historic beer diversity: Should we raise a pint to institutions?”, *J. Institutional Econ.*, 15(4), 695-713, 2019
<https://doi.org/10.1017/S1744137419000080>
- 8) Krogerus, K., Magalhães, F., Kuivainen, J., Gibson, B., “A deletion in the *STAI* promoter determines maltotriose and starch utilization in *STAI+* *Saccharomyces cerevisiae* strains”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 7597-7615, 2019
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10021-y>
- 9) Yamauchi H, Yamamoto H, Shibano Y, Amaya N, Saeki T, “Rapid methods for detecting *Saccharomyces diastaticus*, a beer spoilage yeast, using the polymerase chain reaction”, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56, 58-63, 1998
<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-56-0058>
- 10) Stewart, G.G., “*Saccharomyces* species in the Production of Beer.”, *Beverages*, 2, 34, 2016
<https://doi.org/10.3390/beverages2040034>
- 11) Krogerus, K., Gibson, B., “A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 3745-3756, 2020
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10531-0>
- 12) Kim TS, Kim HY, Yoon JH, Kang HS, “Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tec1 promotes Flo8-Mss11-mediated activation of *STAI* expression”, *Mol. Cell. Biol.* 24, 9542-9556, 2004a
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9542-9556.2004>