



主任研究員

丸山 裕慎

共同研究者

長谷川 圭司

伊藤 太一

・経歴

2015 年 金沢大学大学院 修了

2015 年 三重県入庁

2017 年 三重県工業研究所

2020 年 同課 主任研究員

2024 年 三重大学大学院 博士（学術）

海外戦略用日本オリジナルビアスタイル創出に向けた ビール醸造用清酒酵母におけるビール醸造条件の最適化

1. 背景・目的

日本政府は農林水産物や食品の輸出力強化を掲げており、クラフトビールに関しては、アメリカへの輸出を推進している。アメリカでは、クラフトビールだけで年間 389 万 kL 消費されており、金額ベースでは、クラフトビールの売上げだけで日本の総ビール類と同等以上ある（図 1）。さらに、世界中のクラフトビール市場は 2021 年時点で 1,025 億 9 千万 US ドル、2028 年には 2,000 億 US ドルに達すると予測されるなど、アメリカの 5-10 倍となる巨大マーケットが広がり、クラフトビールの海外輸出には大きな可能性があることが窺える。政府の調査では、輸出用の日本産クラフトビールの重要成功要因に「独自性」の必要性を挙げているが、既存の輸出用ビールは、副原料にワサビや茶など日本風フレーバーの添加が主であり、それだけでは日本の独自性=「日本らしさ」が非常に弱く、日本の独自性・文化性が際立ち、かつ世界のマーケットの中で商業的に競争力のある魅力的な商品となり得ていないことが現在の課題である。

國酒である「清酒」の香味に寄与する「清酒酵母」を活用し、ビールに清酒の特徴的な香味を付与できれば、日本の歴史的・文化的背景を含めることができる。さらに、清酒のリンゴ様の吟醸香である「カプロン酸エチル」を高生成させる酵母の育種技術は日本で開発された技術であることから、このカプロン酸エチルを特徴とした清酒様のビールは日本の独自性を有した「新規日本オリジナルビアスタイル」となりうる¹⁾。一方、清酒酵母は麦汁の主要糖類であるマルトースを発酵する能力が非常に弱く、そのままでは清酒酵母をビール醸造に転用できない²⁾。そこで、カプロン酸エチルを高生成する三重県清酒酵母 MK3 から、マルトース発酵能を改善したビール醸造用清酒酵母の育種を行い、新規ビール醸造用清酒酵母 BMK3 を開発した³⁾。BMK3 により醸造されるビールは、清酒の吟醸香である酢酸イソアミルやカプロン酸エチルを高含有し、さらに、「果実様の吟醸香」が華やかで、「甘み」が残存し「ボディ感」がありながらも「すっきりキレがある」という特徴的な酒質になることを明らかにしている。

ビール酵母のエステル生成能はそもそも低く、さらに、多くのビアスタイルではエステルが低生成となる醸造方法が採用されてきている⁴⁾。そのため、BMK3のようなエステル高生成能を有した酵母による、エステルを特徴香としたビールを高品質に醸造する条件についての知見が少ない。つまり、ビール醸造条件において、カプロン酸エチルの高生成を追求した基礎研究がなされておらず、清酒酵母の特徴を最大限引き出すことができるビール醸造条件を明らかにすることが、海外戦略用日本オリジナルビール開発には不可欠である。

そのため、当該研究では酵母のエステル生成に影響を与える可能性のある諸因子（発酵温度、初期菌体数、初期グルコース濃度、初期マルトース濃度）の寄与について、体系的に明らかにすることを目的とした。

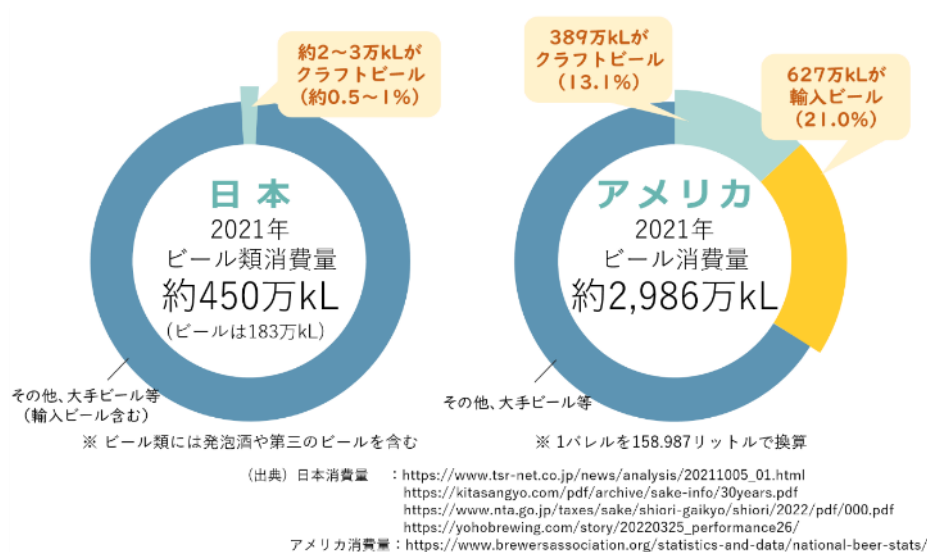


図1 2021年の日本とアメリカのビール市場の比較.

2. 材料・方法

2.1 直行表 (L9) への発酵因子貼り付け

直行表はL9を用いて、「発酵温度」、「初期菌体量」、「初期グルコース濃度」、「初期マルトース濃度」の4つの因子について3水準設定し、表1の通り因子を貼り付けた。これら9通りのビール小仕込み試験を2周実施し、合計18回のビール小仕込み試験を実施した。この際、これら4つの因子には相互作用が無いと仮定し、設定した4因子の主因子効果について解析を行った。

表1 L9 直行表を活用したビール小仕込み試験条件.

NO.	Temperature (°C)	Piching rate (cells/mL)	Glucose (% w/v)	Maltose (% w/v)
1	12	1.0×10^5	1	5
2	12	1.0×10^6	4	11
3	12	1.0×10^7	7	8
4	18	1.0×10^5	7	11
5	18	1.0×10^6	1	8
6	18	1.0×10^7	4	5
7	24	1.0×10^5	4	8
8	24	1.0×10^6	7	5
9	24	1.0×10^7	1	11

2.2 ビール小仕込み試験

麦汁の調整は市販のモルトエキスとホップペレットを用いて行い、煮沸及びオリ引きを経て清澄化させた麦汁を試験に用いた。BMK3 は YPM 培地を用いて前培養し、表 1 の濃度となるように各種耐圧ビンに分注した麦汁に懸濁させた。また、初期グルコース、マルトース濃度は各種条件が表 1 の濃度となるように、標準試薬を添加することで調製した。主発酵は表 1 に示した 3 水準の温度に設定したインキュベーター内で、スターラーで軽く攪拌しながら実施し、Brix の減少が落ち着いたところを発酵終了とした。各時点におけるマッシュを耐圧ビンよりサンプリングし、菌体濃度は顕微鏡観察でカウントし、各種成分分析は遠心分離にて酵母を除去した上清を用いた。

2.3 成分分析

Brix は糖度計で、発酵性糖類とエタノールは HPLC で分析した。カプロン酸エチルは HS-GC-MS で分析した。製成ビール中の水溶性代謝物について、CE-TOFMS を用いてターゲット分析を行い、合計 59 成分について定量した。

2.4 統計解析

糖類やエタノール濃度の経時経過については、波形解析ソフト Igor を用いてシグモイドフィッティングを行った。カプロン酸エチル高生成に寄与する発酵因子の四元分散分析および製成ビール中の水溶性代謝物を用いた主成分分析には統計解析ソフト R を用いた。

3. 結果と考察

今回実施したビール小仕込み試験の発酵経過の一部（例えば No. 5）を、図 2 に示す。いずれの実験条件も遅滞なく発酵が進行し、製成ビールが得られたことから、直行表による解析が可能と確認できた。グルコースを先に資化し、次いでマルトースが資化されたことから、BMK3 ではグルコースリプレッションが起こっていることが示唆された。また、分析値の変化として捉えられるようなダイナミックな変化は、菌体濃度が 10^7 cells/mL を超えたあたりで生じていることが確認できた。

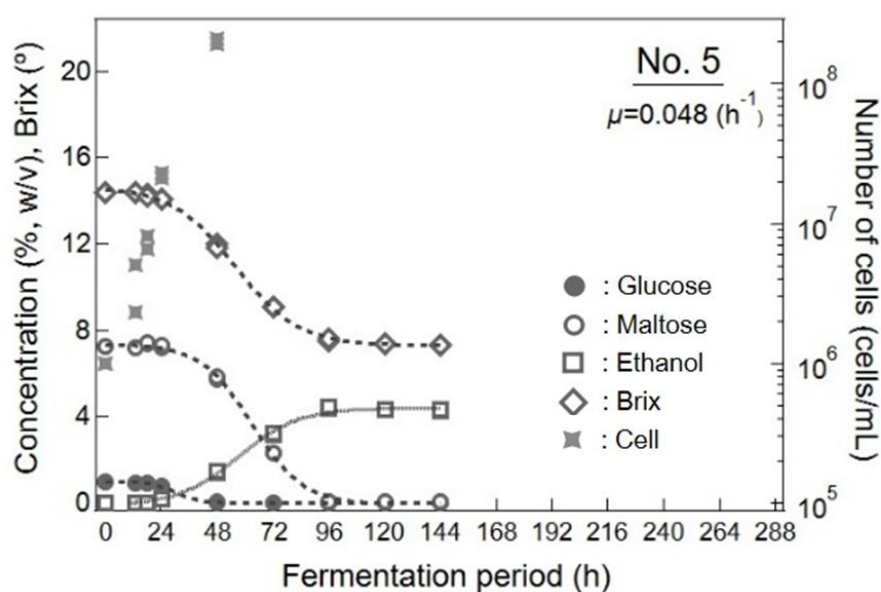


図 2 ビール小仕込み試験時の経時変化 (No. 5) . μ は非増殖速度を示す.

カプロン酸エチル生成について、経時変化を図3に示す。多くの発酵条件において、主発酵が進行している際にカプロン酸エチルが蓄積され、その後、減少していることが確認された。このことから、カプロン酸エチル高生成に寄与する発酵因子解析には、カプロン酸エチル濃度が最大であった時点の濃度を採用した。

四元分散分析による分散分析の結果を図4に示す。図4 (A)には、9通りの発酵条件におけるカプロン酸エチル生成量の各因子各水準の挙動を示し、図4 (B) には分散分析表を示した。分散分析の結果、カプロン酸エチルの生成には発酵温度の寄与が最も顕著であり、温度水準が大きくなるほどカプロン酸エチルの生成量が多くなる傾向を示した。ついで、グルコース濃度が有意に寄与していることが示され、麦汁の初期グルコース濃度が多い条件ほどカプロン酸エチルの生成量が多くなる傾向を示した。一方で、麦汁中の初期マルトース濃度によるカプロン酸エチル生成への寄与は危険率5%では有意な差は示されず、また、初期菌体濃度の違いはカプロン酸エチル生成には全く寄与していないことが示された。

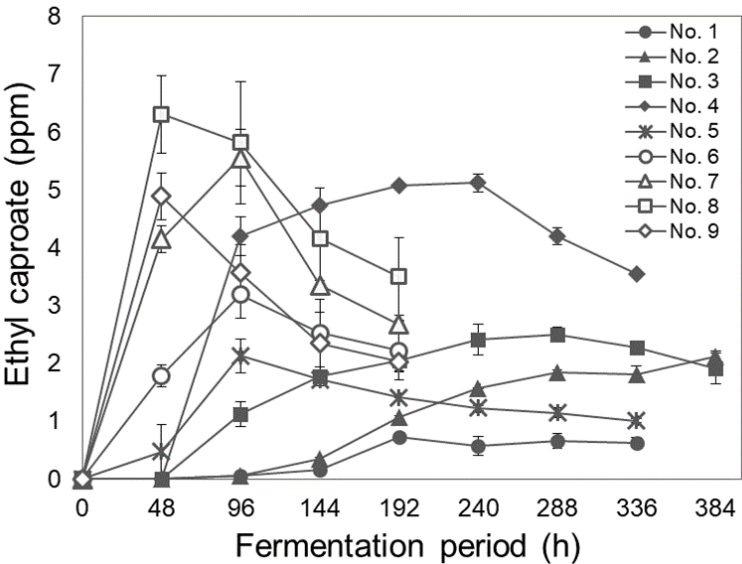


図3 カプロン酸エチル濃度の経時変化.

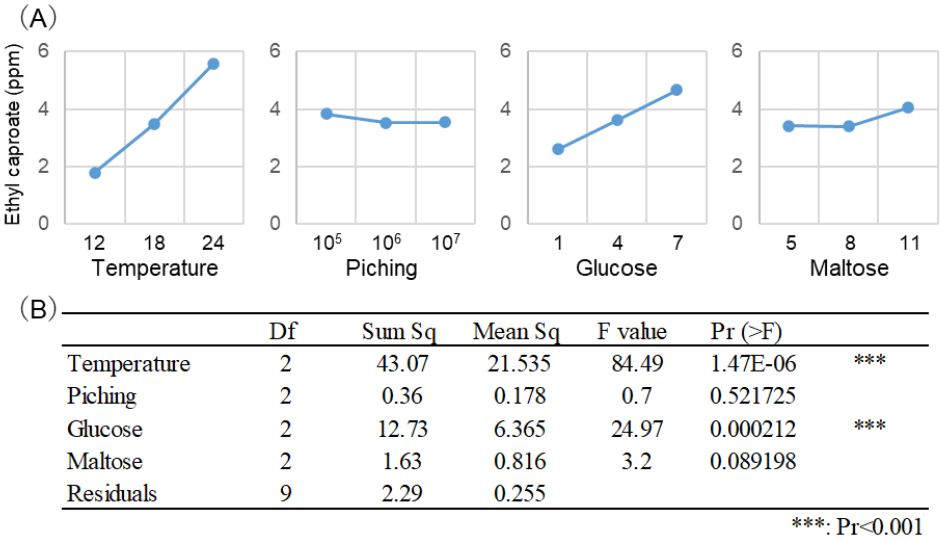


図4 カプロン酸エチル高生成に寄与する発酵因子の解析.

(A) 各因子各水準の平均値によるの変化傾向、(B) 分散分析表

酵母菌体の代謝は各種菌体内酵素の酵素反応により制御されている。これら酵素反応は、一般にアレニウスの式により ($k=Ae^{-E_a/RT}$) として表され、温度が上がると反応速度 k が指数関数的に増加する。ゆえに、発酵温度を高くすると酵母菌体内の酵素反応が活発となり、代謝物が多く生成される⁵⁾。当該ビール小仕込み試験において、発酵温度が最もカプロン酸エチル生成に寄与したことは、カプロン酸エチル高生成を狙うという観点においても、発酵温度の影響は大きいことを示している。

一方、麦汁の糖組成がカプロン酸エチル生成に寄与しているのは興味深い。グルコースとマルトースでは、酵母菌体内への糖の取り込みスキームが異なる⁶⁾。グルコースはヘキソーストランスポーターを介して酵母菌体内に輸送される。この、ヘキソーストランスポーターは促進拡散型のトランスポーターのため、ATP を直接消費せず、濃度勾配に従って受動的に輸送される。一方で、マルトースの菌体内への取り込みはマルトーストランスポーターを介して行われる。マルトーストランスポーターはプロトンシンポーターのため、マルトース 1 分子の取り込むために、生物のエネルギー通貨とされている ATP を 1 分子消費してプロトンの排出が行われる。このような取り込みスキームの違いから、ビール醸造のような嫌気環境下では、解糖系の代謝経路において、グルコース 1 mol に対して ATP 2 mol 獲得できるのに対して、マルトース 1 mol では 4 mol の ATP 生産が見られるものの、取り込みに ATP を 1 mol 使用していることから、実質の ATP 獲得は 3 mol であり、エネルギー獲得効率は、グルコースに比べ 75%と低い⁷⁾。カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸は、脂肪酸合成経路にて生成されるが、この経路では ATP を消費して代謝が進行する⁸⁾。この糖種の違いで生じたエネルギー効率の差は、カプロン酸の生成に回すことのできる余剰 ATP の差となり、結果的にエネルギー効率の良いグルコースの方がカプロン酸エチル生成に強く寄与しているのかもしれない。

さらに、初期の糖濃度がもたらす浸透圧が異なることも寄与しているだろう。温度が一定であれば、浸透圧は溶質の mol 数に比例する⁹⁾。今回の発酵条件では、グルコースとマルトースの水準はそれぞれ 3 wt%ずつ増加するように添加し、質量としては同水準増加しているものの、グルコースの分子量はマルトースの分子量の約半分であることから、グルコースの方が約 2 倍の mol 数を示し、浸透圧はグルコースがマルトースの 2 倍となる。つまり、単糖であるグルコースの方が酵母に浸透圧ストレスを生じさせることとなる。高浸透圧下では、浸透圧に対応するため菌体内に糖アルコールを生成し、脱水に適応するよう代謝が切り替わるなど、浸透圧と菌体内の代謝については多くの報告があり、特に、酢酸が増加することなどが知られている¹⁰⁾。このことから、グルコースとマルトースの糖類の違いが浸透圧の違いにつながり、酵母菌体内の代謝に影響を与え、その結果の一つとしてカプロン酸エチル濃度に差が生じているのかもしれない。

酵母による代謝の影響はさまざまな代謝成分への影響として現れる。そこで、CE-TOFMS を用いて製成ビール中の水溶性代謝物を中心にターゲット分析を行い、糖・有機酸・アミノ酸・核酸の合計 59 成分について定量した。これら分析結果を用いて主成分分析を行い、設定した 4 つの発酵因子の影響について解析した結果をバイプロットとして図 5 に示す。合計 18 回のビール小仕込み試験のサンプルビールの個々の結果をプロットで示し、各種水溶性代謝物の寄与を矢印で図示している。主成分寄与率は、PC1 で 41.4%、PC2 で 15.6%を示し、PC3 が約 8%と低い値となったことから、PC2 まで（累積寄与率 57%）を解析に用い

た。図5(A)～(D)には、それぞれの発酵因子・水準でグルーピングを行い、各グループのプロット分布から、各種発酵条件の存在分布予測として、95%誤差範囲となるような確率楕円を示している。

それぞれの発酵因子の影響を概観すると、発酵温度が高くなるほど PC1 の正の方向に分布し、成分の寄与を示す矢印も PC1 正方向に集約していることから、発酵温度が高くなるほど多くの成分が生成される傾向を示した。さらに、PC2 方向では、グルコース濃度を高くするほど、PC2 の負の方向に分布が広がる傾向を示し、成分としては解糖系やクエン酸回路の代謝物が寄与していることが示唆された。一方で、初期菌体濃度とマルトース濃度の発酵因子については、PC1-PC2 比較では全面にわたって分布が広がっており、確率楕円が重なっていた。このことから、今回のビール醸造における発酵因子比較では、酵母由来の代謝成分に関しては発酵温度の寄与が最も大きく、ついでグルコース濃度が寄与し、初期菌体濃度とマルトース濃度に関しては、比較的影響が小さいことが確認された。

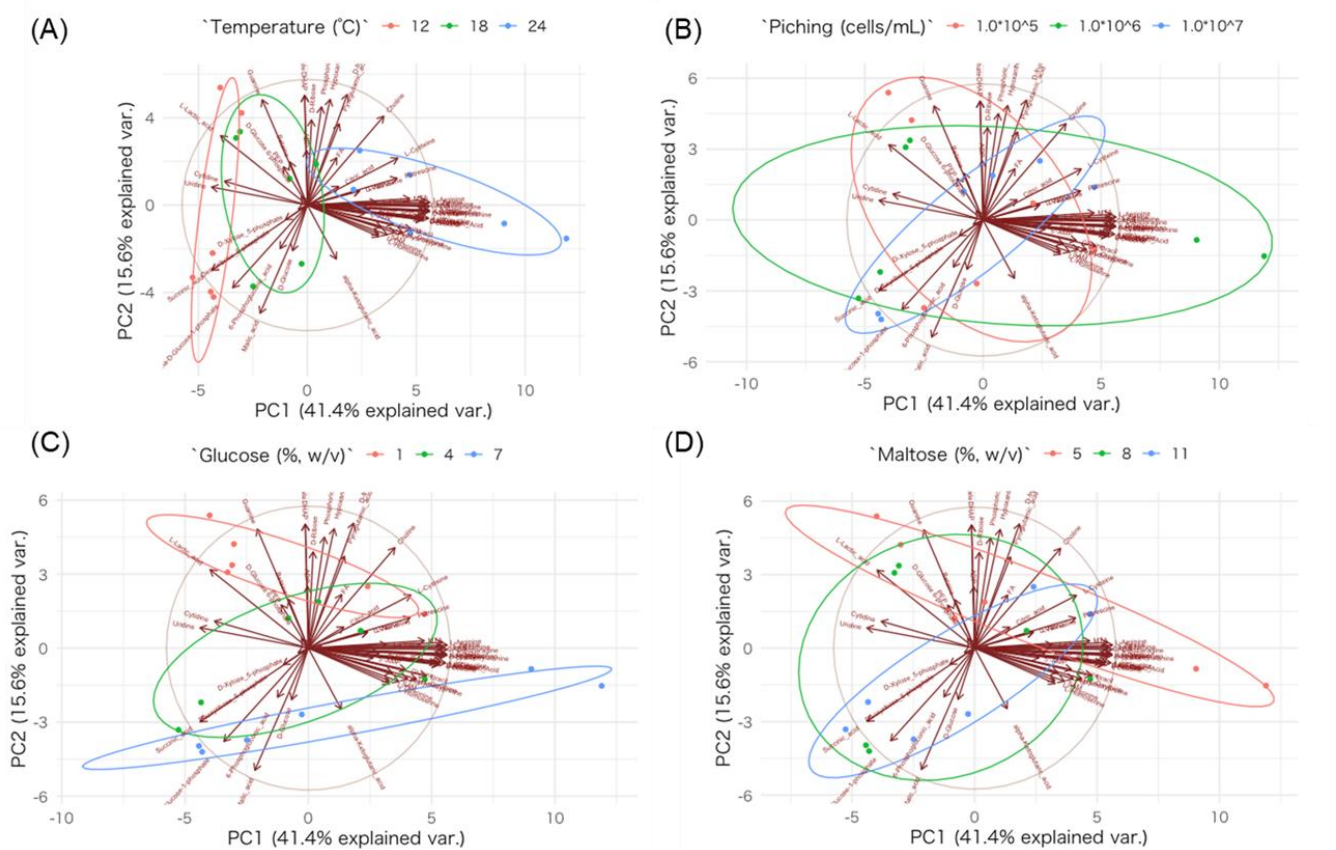


図5 製成ビールの水溶性代謝物を用いたの主成分分析.

この結果については、カプロン酸エチル生成への寄与と同様の結果となっている。つまり、カプロン酸エチル高生成を狙い発酵条件を定めていくと、必然的に他の酵母由来代謝産物の生成も高くなる傾向を示すだろう。その為、カプロン酸エチル高生成を狙って発酵条件を決める際には、その他酵母由来の代謝産物も多くなることを理解し、バランスの取れた発酵条件の探索が必要となることが示唆された。

4. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団並びにご関係の皆様にご心より感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. Kitagaki, H., Kitamoto, K.: Breeding Research on Sake Yeasts in Japan: History, Recent Technological Advances, and Future Perspectives, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **4**, 215–235 (2013)
2. 向井伸彦, 岡田明彦, 他 2 名 : ビール酵母とその他醸造用酵母のビール醸造特性, 日本醸造学会誌, **93**, 967–975 (1998)
3. Maruyama, H., Yamamiya, T., and other 3 authors: Beer Brewed with Sake Yeast Strain Has Unique Sake-like Flavors, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **82**, 150-159 (2024).
4. 三井俊介, 島津武, 他 2 名 : ビール醸造におけるエステル生成制御法としての麦汁通気, 日本醸造協会誌, **90**, 693-698 (1995)
5. Calderbank, J., Hammond, J. R. M.: Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 84-90 (1994)
6. Lagunas, R.: Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, **104**, 229-242 (1993)
7. 畠中治代 : ビール酵母が獲得したマルトース、マルトトリオースを資化する能力, **102**, 616-619 (2024)
8. Lynen, F.: On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 431-442 (1980)
9. 春見隆文 : 微生物の浸透圧ストレスと糖アルコールの生成, 日本醸造協会誌, **105**, 618–627 (1980)
10. Remize, F., Roustan, J. L., and other 3 authors: Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase, *Appl. environ. microbiol.*, **65**, 143–149 (1999)