

オリジナル乳酸菌を用いた酸味に特徴のあるビール 「サワービール」の開発

Development of “Sour Beer” with a Distinctive Sour Taste Using Original Lactic Acid Bacteria

茂 一孝

Shigeru Kazutaka

食品開発研究所 農産食品・菓子グループ

独自性・独自性・地域性をもったクラフトビールの商品開発に貢献するために、鳥取県の農産品等からサワービール製造に適したオリジナル乳酸菌を分離・同定し、乳酸発酵条件を設定した。分離・同定した乳酸菌による試験醸造を行った結果、当該乳酸菌はサワービールに活用できることを確認した。

1. はじめに

近年、クラフトビール（地ビール）の販売数量は年々増加しており、クラフトビール市場は活況である。クラフトビール醸造所数は新規参入などにより全国的に増加しており、県内においては、令和2年度には1社増加し5醸造所となった。

このようにクラフトビール市場が拡大化する中で、その差別化のためには、独自性・地域性をもたせた商品開発が課題であり、県内企業からは、乳酸の酸味が特徴の「サワービール」開発の要望がある。

しかし、サワーモルトや乳酸を多く生産する酵母を用いて製造されているサワービールは、酸味が弱く差別化にあたっての訴求力に欠けるという課題がある。

そこで、本研究では地域の農産品などから、乳酸を多く生産し、酢酸などのオフフレーバー生産が少ない乳酸菌を分離・同定し、試験醸造により酸味を特徴とした「サワービール」に活用できることを確認したので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試素材

2.1.1 供試菌株

培養試験の対照乳酸菌として市販乳酸菌 OYL-605 由来 *Lactiplantibacillus plantarum* K605-7 (Omega Yeast

Labs, LLC) を使用した。酵母は、ビール酵母 No.1056 (中越酵母工業 (株)) を使用した。

2.1.2 モルトエキス

分離源からの集積培養、乳酸発酵試験及びビール試作のため、ババリアンピルスナー (Mich. Weyermann GmbH & Co.KG) を使用した。

2.1.3 乳酸菌用培地

乳酸菌単離用培地は、*Lactobacilli* MRS Agar (Becton Dickinson and Company) を使用し、シクロヘキシミド 10ppm、炭酸カルシウム 1%になるよう添加後、オートクレーブし、平板培地を作製した。また、乳酸菌液体培養は、*Lactobacilli* MRS Broth (Becton Dickinson and Company) を使用した。

2.2 試験方法

2.2.1 乳酸菌の分離

分離源として、県内酒造場の生酏酒母 2 点、梨 2 点 (二十世紀梨) を含む果実 5 点 (いちじく、ぶどう、りんご) を用い、図 1 の方法に従って行った。すなわち、モルトエキスを用いた集積培地 (Brix13%、シクロヘキシミド 10ppm、pH4.0) に分離源を添加し、30℃で 6 日間静置培養し、培養液の酸度を測定した。その後、酸度が増加した試料について、適宜希釈し、炭酸カルシウムを含む平板培地に塗布した後、30℃、2 日間嫌気培養を行った。培養には、嫌

気ジャーを用い、シャーレとともに脱酸素剤（アネロパック）を封入した。培養後、周囲の炭酸カルシウムが溶解している単一コロニー（酸生成）を滅菌楊枝で穿刺し、5ml の MRS 液体培地（シクロヘキシミド 10ppm 含有）に植菌し 28℃ で 2~3 日間培養した。この前培養液 0.3ml を 30ml のモルトエキスを用いた麦汁（Brix15%）に接種し、35℃ で 3 日間静置培養を行った後に、遠心分離により培養液上清を得た。得られた培養液上清について、pH 及び酸度を測定した。酸度の測定は、酒類総合研究所標準分析法²⁾に従って行った。

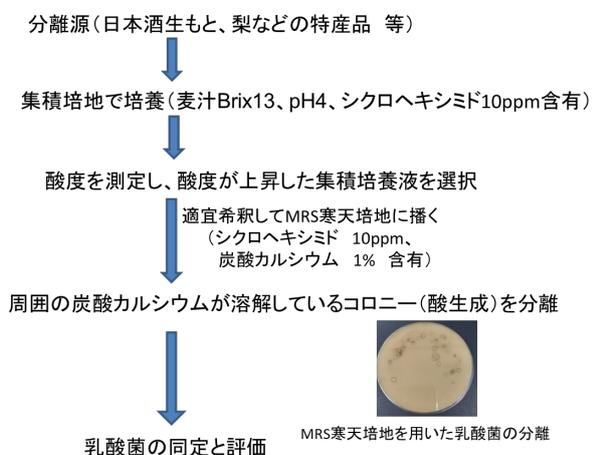


図1 乳酸菌の分離方法

2.2.2 乳酸菌の同定

乳酸菌の同定は、位相差顕微鏡による形態観察及び鈴木³⁾の方法に従い、カタラーゼ試験、ガス生成試験により行った。また、16S リボソーム DNA 配列解析、分子系統解析 (*recA*) 及び生理・生化学的性状試験は、外部機関 ((株) テクノスルガ・ラボ) に委託した。

2.2.3 乳酸発酵試験

分離・同定した乳酸菌について、乳酸発酵評価を行った。分離乳酸菌を 5ml の MRS 液体培地（シクロヘキシミド 10ppm 含有）に植菌し、30℃ で 2~3 日間培養した。この前培養液を設定した添加菌数濃度になるよう 100ml のモルトエキスを用いた麦汁（Brix18%）に接種し、各設定温度で静置培養を行い、経時的に酸度を測定した。酸度の測定は、2.2.1 と同

様に行った。

有機酸組成分析は、ポストカラム法による電気伝導度検出器を用いた高速液体クロマトグラフ ((株) 島津製作所) にて行った。

2.2.4 ビール小仕込み試験

2.2.3 に従い乳酸発酵した麦汁に、ホップ 1g/L を添加し、45 分間煮沸した。冷却後、チューブポンプにより分取し、Brix18% に再調整したのちに約 20℃ まで冷却した。培養酵母 No.1056 を添加し、最高温度を 25℃ に設定し、約 2 週間発酵を行った。その後、瓶詰時にグラニュー糖を添加し、20℃ で 7 日間保持した後に 5℃ で保管し、成分分析、官能評価を行った。尚、成分分析は、酒類総合研究所標準分析法²⁾に従って行った。また、有機酸組成分析は、2.2.3 と同様に実施した。

3. 結果と考察

3.1 乳酸菌の分離・同定

日本酒醸造の生酏 2 点、梨（二十世紀梨）、イチジクより酸を生成する菌株を分離した。各分離源より見出した菌株について、酸の生成量（酸度）、ガス生成の有無、形態を基に、違いがある菌株 8 株を選抜し、遺伝子解析に供した。その後、*recA* 遺伝子解析（菌株 Pe-1）及び生理・生化学的性状試験による判定を行い、ラクトバチルス属に分類される *L. sp.*, *L. paracasei*, *L. plantarum* の 3 種類と判定した（表 1）。

表 1 分離した菌株の判定結果

分離源	菌株	帰属分類群
生酏A (鳥取旭)	KKA-26	<i>Levilactobacillus sp.</i>
	KKA-35	<i>Levilactobacillus sp.</i>
	KKA-40	<i>Levilactobacillus sp.</i>
生酏Y (山田錦)	KKY-27	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
	KKY-33	<i>Levilactobacillus sp.</i>
	KKY-39	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
イチジク	Fi-2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
梨	Pe-1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

3.2 乳酸発酵試験

3.1において、スクリーニング・選抜・同定（属種まで）できた2つの菌株（KKY-39、Pe-1）について、各設定条件における乳酸発酵試験を行った。結果を図2～7に示す。KKY-39（生酏Y）において、設定した添加菌数による酸度（酸生成量）の違いは見られなかった（図2）。また、発酵温度については、35℃において酸度が高く、多く乳酸を生成していると考えられた（図3）。また、比較的高温の40℃においても、生育できることが分かった。乳酸発酵終了時の有機酸組成は、著量の乳酸が主体であり、市販乳酸菌K605-7よりも多く乳酸を生成していた（図4）。

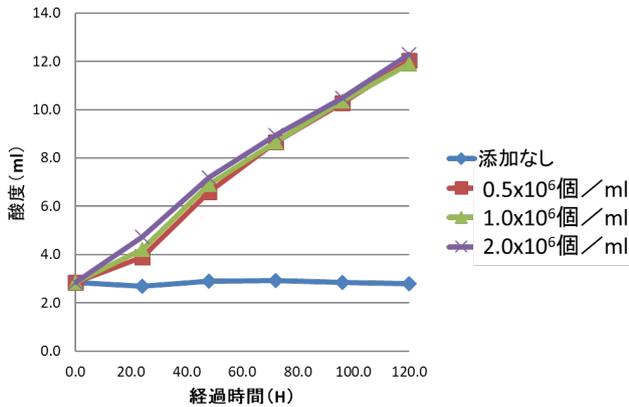


図2 乳酸菌 KKY-39 を用いた乳酸発酵試験（添加菌数）

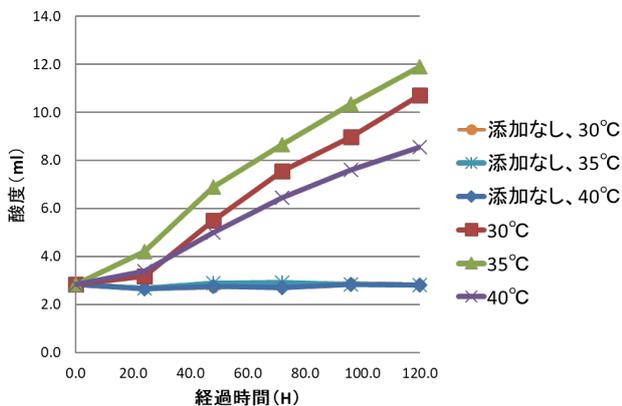


図3 乳酸菌 KKY-39 を用いた乳酸発酵試験（発酵温度）

添加菌数： 1.0×10^6 個/ml

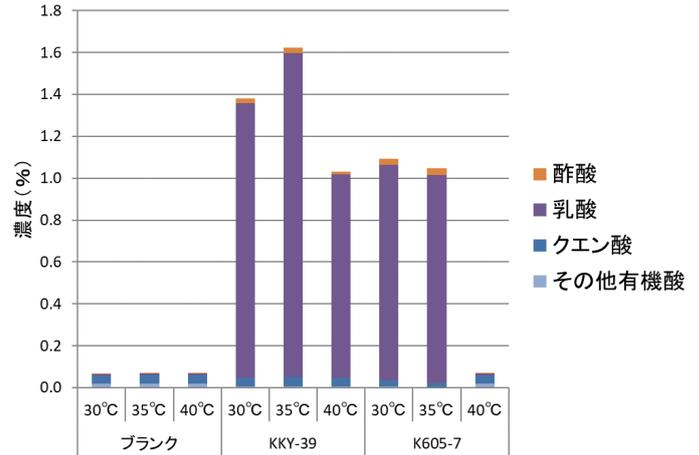


図4 乳酸菌 KKY-39 を用いた乳酸発酵 120 時間後の有機酸組成

ブランク：乳酸菌添加なし

その他有機酸：リンゴ酸、コハク酸、フマル酸の合計

同様に、Pe-1（梨）についても、乳酸発酵試験を行った。設定した添加菌数による酸度（酸生成量）の違いは見られなかった（図5）。また、発酵温度については、30、35℃において酸度が高く、多く乳酸を生成していると考えられた（図6）。また、比較的高温の40℃においても、生育できることが分かった。乳酸発酵終了時の有機酸組成は、著量の乳酸が主体であり、市販乳酸菌K605-7よりも多く乳酸を生成していた（図7）。

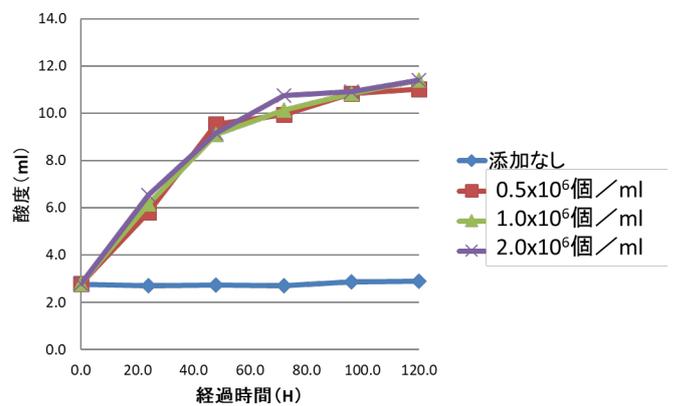


図5 乳酸菌 Pe-1 を用いた乳酸発酵試験（添加菌数）

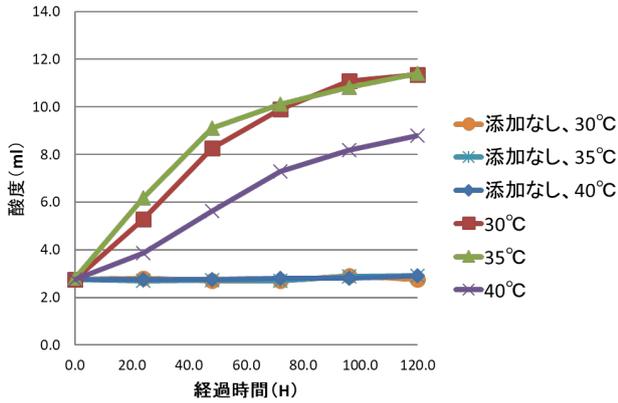


図6 乳酸菌 Pe-1 を用いた乳酸発酵試験 (発酵温度)

添加菌数 : 1.0×10^6 個/ml

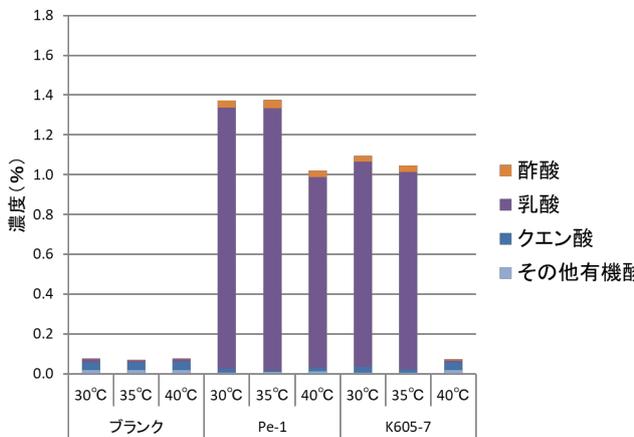


図7 乳酸菌 Pe-1 を用いた乳酸発酵 120 時間後の有機酸組成

ブランク : 乳酸菌添加なし

その他有機酸 : リンゴ酸、コハク酸、フマル酸の合計

3.3 ビール小仕込み試験

小スケールでビール醸造を行った。乳酸発酵の条件設定ができた乳酸菌 KKY-39(生酏山田錦分離株) 及び Pe-1(梨分離株) を用いて、添加菌数は 1.0×10^6 個/ml、発酵温度 35°C、発酵時間 72 時間、初期糖度 Brix18%の条件で乳酸発酵を行った。その後、酵母 No.1056 を添加し、発酵温度 20°Cからスタートし、最高温度を 25°Cとした。乳酸発酵において、順調に酸度(酸生成量)が上昇し、72 時間後の乳酸生成量は、Pe-1、KKY-39、市販乳酸菌 K605-7 の順に多く、Pe-1、KKY-39 の両者とも乳酸を 1%以上生成していた(図8、9)。

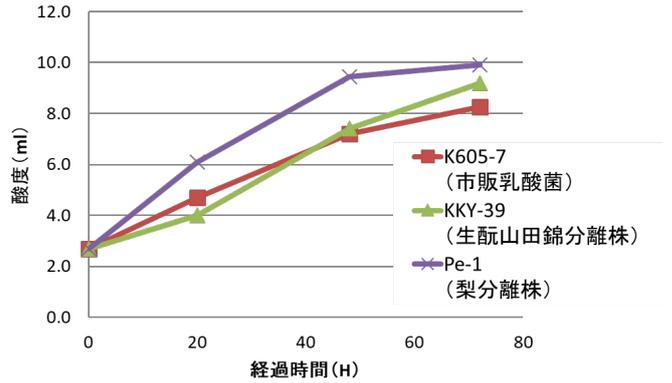


図8 各分離乳酸菌を用いた乳酸発酵試験

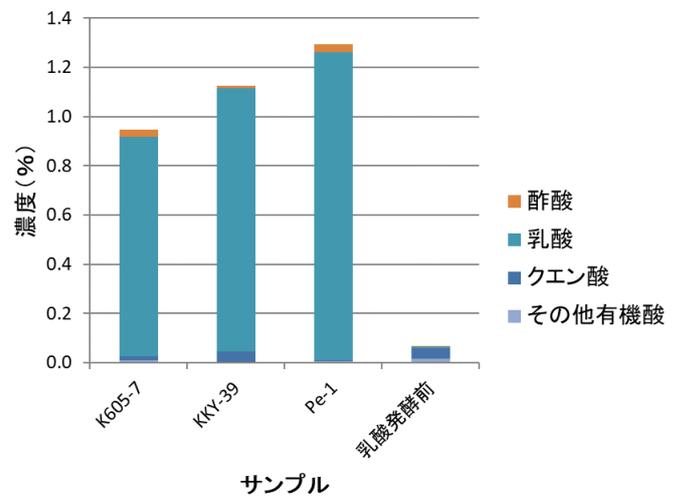


図9 各分離乳酸菌を用いた乳酸発酵 72 時間後の有機酸組成

その他有機酸 : リンゴ酸、コハク酸の合計

その後のビール醸造においては、試験した全区分とも発酵終了時のアルコール度数は 6%程度となり、対照(乳酸発酵なし)より若干低めの値となったが、順調に発酵が進んだ(図10)。

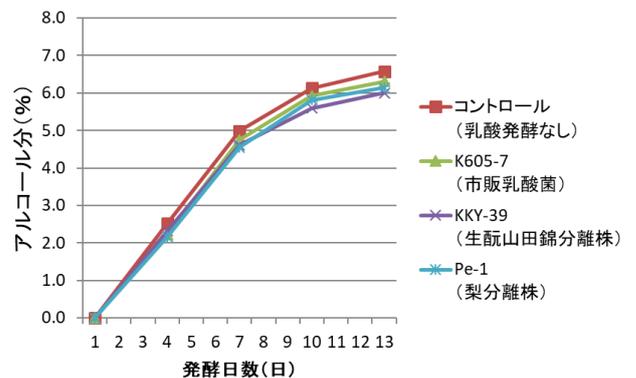


図10 酵母によるアルコール発酵の経過

続いて、試作ビールの成分分析、官能評価を行った。酸度が低いほど、アルコール分が高く、エキス分が低くなる傾向だった（表2）。また、香气成分については、大きな差は見られなかった（データ非掲載）。

官能評価は、クラフトビールメーカーの製造技術者10名、センター担当職員3名の計13名で行った。その結果、3種のサワービールの中で、KKY-39（生酏山田錦分離株）が1位評価のパネラー数が7名となり、高い評価を得た（表2）。

表2 分離した乳酸菌を用いた試作ビールの成分値及び官能評価

ビール番号	試料名	アルコール分(%)	比重(15/4)	エキス分(w/v %)	酸度(ml)	官能評価における1位評価のパネラー数
1	コントロール (乳酸発酵なし)	7.1	1.0158	6.9	4.7	—
2	K605-7 (市販乳酸菌)	6.7	1.0195	7.7	8.7	1
3	KKY-39 (生酏山田錦分離株)	6.4	1.0210	8.0	9.5	7
4	Pe-1 (梨分離株)	6.5	1.0202	7.9	10.0	5

—：順位評価対象外

4. おわりに

今回、地域農産品等から麦汁中で著量の乳酸を生成する3種類の乳酸菌を分離し、その内、同定できた2種類の菌株KKY-39（生酏山田錦分離株）及びPe-1（梨分離株）について乳酸発酵条件を設定することができた。

また、試作ビールの評価において、KKY-39（生酏山田錦分離株）およびPe-1（梨分離株）を乳酸の酸味が特徴であるサワービール製造に活用できることを確認した。

謝辞

試作ビール官能評価について、ご協力いただいた久米桜麦酒（株）、（株）AKARI BREWING 及び倉吉ビール（株）の皆様に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 国税庁; 地ビール等製造業の概況（平成30年度調査分）、令和2年6月公表
- 2) 酒類総合研究所標準分析法注解（標準分析法注解編集委員会 編）
- 3) 鈴木チセ; 4.基本的な実験操作 1) 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作, 平成20年度農林水産省補助事業（食料産業クラスター展開事業）食品機能性評価マニュアル集第III集, 社団法人日本食品科学工業会, p41-48 (2008).