土壌からの焼酎酵母の分離と分離酵母の実用化

高峯和則¹・大山修一²・吉崎由美子¹・玉置尚徳¹・鮫島吉廣¹

(¹ 鹿児島大学農学部焼酎学講座, ²(有)大山甚七商店)

平成 21 年 11 月 19 日受理

Isolation of *shochu* yeast from soil and its application in *shochu* making on an industrial scale

Kazunori TAKAMINE¹, Shuichi OYAMA², Yumiko YOSHIZAKI¹, Hisanori TAMAKI¹ and Yoshihiro SAMESHIMA¹

(¹Course of Shochu Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065

²Oyamajinshichi Shuzo Co., Ltd. Ibusuki, Kagoshima, 891-0315)

A yeast strain for *shochu* making was isolated from soil. Sweet potato *shochu* production was examined on an industrial scale by using this yeast aiming at the product development with the intent to raise the additional value of the *shochu*. General *shochu* yeast was able to be grown in the YPD liquid medium adjusted to pH3.2 or more and 5% or less ethanol concentration. The *shochu* yeast was able to be isolated from soil efficiently by using the YPD liquid medium (pH3.2, 5% ethanol concentration) made based on this condition. The yeast isolated from soil was judged to be *Saccharomyces cerevisiae* or *S. patorianus* by genetic analysis using 26S rDNA-D1/D though it was evaluated as *S. cerevisiae* by sugar fermentation tests and a carbon source assimilation test. Evaluations of the sweet potato *shochu* made with the yeast had a soft flavor and a full taste on the industrial scale. From these facts, it was concluded that the yeast was very useful for *shochu* production.

Key words : 焼酎酵母, 土壌, 分離, *Saccharomyces cerevisiae*

緒 言

本格焼酎の成分はエタノールと水以外に高級アルコール類, 脂肪酸エステル類, 有機酸, ミネラルなどが含まれており, その合計量は 0.2% 程度といわれている。特に芋焼酎や黒糖焼酎など原料特性やメーカー毎の風味の違いは, これらの成分濃度や組成比によるものといえる。また, 焼酎の消費動向にも影響を与えており, 1980 年代後半から 2002 年頃までは芋焼酎は個性が強いが故に敬遠され需要は横ばいであった。しかし, その後, 原料特性が明確で濃厚な風味のある芋焼酎が急激な需要拡大を遂げた¹⁾。更なる需要拡大のためには, 微量成分に由来する酒質はもとより, ○○産

原料 100% 使用, 無農薬・有機農法作物使用, 甕壺仕込みなど, 原料や製造法に特徴を持たせ視覚や聴覚, 触覚を刺激する情報発信も重要である。これまでに, 海洋環境, 花, 果実など, もろみ以外の分離源から分離した酵母^{2~7)}を用い, 風味の改善と共に差別化できる商品開発が行われてきている。しかし, 土壌から飲食食品製造を目的とした微生物の分離は, パン酵母⁸⁾はあるが, アルコール飲料についての報告は全くない。

そこで, 本報では 2008 年 NHK 大河ドラマ「篤姫」のゆかりの土壌から酵母の分離と本酵母を用いて従来の芋焼酎と比べて柔らかな風味を有する本格芋焼酎の商品化を目的とした。しかし, 土壌には多種多様な微生物が生存するため, 酵母の分離が困難であることが

予想されるので、本研究では土壌から効率よく焼酎酵母を分離する条件を検討し、土壌から集積培養による酵母の分離と同定を行い、当該酵母の実用性について検討した。

実験方法

1. 使用菌株

鹿児島県内の焼酎会社で一般的に使われている鹿児島2号酵母(K2)、鹿児島4号酵母(C4)および鹿児島5号酵母(H5)⁹⁾を使用した。また、河内白麹菌(*Aspergillus kawachii*)を米麹製造に使用した。

2. 培地および前培養

YPD 液体培地は酵母エキス 1%, ポリペプトン 2% およびグルコース 2% になるように蒸留水を用いて調製した。培地 pH の調製は、各成分が 2 倍濃度含まれる YPD 液体培地 2ml と pH の異なる 0.4M の塩酸緩衝液 2ml をそれぞれオートクレーブ滅菌した後混合して行った。YPD 平板培地は 2 倍濃度の YPD 液体培地に 4% になるように寒天を加えオートクレーブ滅菌し 70℃ 程度に冷却後、同様に滅菌した緩衝液と混合し作製した。前培養は YPD 液体培地 5ml に斜面培地から酵母を白金耳植菌し、30℃ で 48 時間静置培養した。

3. 酵母の増殖試験

増殖試験はアドバンテック東洋㈱製の小型振とう培養装置を用いて行った。4ml の YPD 液体培地に前培養液 100 μ l を植菌して 30℃, 20rpm の条件で振とう培養し、濁度を 30 分間隔で自動測定した。また、培養終了後の酵母の生菌数と総菌数はヘマトメーターにより計測した。なお、生菌数はアルカリメチレンブルー染色法¹⁰⁾により求めた。また、本実験は各酵母を 3 回ずつ実施した。

4. 酵母のスクリーニング

篤姫ゆかりの場所である今和泉島津家仮屋敷跡地周辺の土壌を分離源とした。YPD 液体培地の初発 pH3.2、アルコール濃度 5% (v/v) に調製した培地に耳かき一杯程度の土壌を加えて、30℃ で静置培養し経日的に観察した。培地が懸濁し気泡を有する培養液を滅菌水で適宜希釈後、pH3.2 およびアルコール濃度 5% (v/v) に調製した YPD 平板培地に塗抹して、30℃ で 7 日間培養した。肉眼的に酵母の形態と判断したコロニーを、YPD 液体培地に植菌し 30℃ で 2 日間静

置培養した。この培養液 50 μ l、粉末乾燥白麹 2.5g および蒸留水 3.5ml を 50ml 容のプラスチック製チューブに入れてキャップで密栓し、30℃ の恒温水槽中で 5 日間発酵させた。一定時間毎に開栓し炭酸ガスを放出させた後、重量を測定することで発酵経過を追跡した。なお、粉末乾燥白麹は、蒸米に麹菌を接種して常法に従い製麹した米麹を、凍結乾燥させ粉砕機で 500 μ m の篩を通過するまで粉砕したものをを用いた。

5. 小仕込み試験

蒸留水 180ml に前培養液 1.5ml を添加した後、麹米 150g 相当の米麹を加えて 30℃ の恒温水槽中で 5 日間発酵させた。そして、蒸留水 420ml と粉砕した蒸煮サツマイモ 750g を加えて、30℃ で 9 日間発酵させた。発酵経過は、もろみの重量を毎日測定することで追跡した。蒸留は、発酵終了後のもろみ 1kg をガラス製蒸留器に張り込み、蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留法で行い、原酒アルコール濃度が約 38% になる時点で蒸留を終了した。

6. 実用化試験

原料はタイ破碎精米 500kg とサツマイモ (コガネセンガン) 2500kg を使用し、汲水歩合は 67% で行った。蒸留は 2kl のもろみを蒸留機に張り込み、蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留法で行い、留液のアルコール濃度が 10% になる時点で終了した。

7. 酵母の同定

生理性状試験として、糖類発酵性試験、炭素源資化性試験、窒素源資化性試験、ビタミン要求試験、温度耐性試験および薬剤耐性試験は Barnett et al.¹¹⁾ および Kurtzman and Fell¹²⁾ に準拠して培養温度 25℃ で行った。なお、温度耐性試験では 30, 37, 40 および 45℃ で実施した。26S rDNA-D1/D2 の塩基配列の解析による同定試験は、以下の方法で行った。すなわち、DNA の抽出は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)、PCR は puReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, NJ, USA)、サイクルシーケンスは BioDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、NL1, NL2, NL3 および NL4 プライマーを使用し 26S rDNA 遺伝子の D1/D2 領域を増幅した。

反応終了後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, CA, USA) でシーケンスを行い、ChromasPro1.4 (Technelysium Pty Ltd.,

Tewantin, AUS) で塩基配列を決定した。そして、アポロン DB-FU1.0 (テクノスルガ・ラボ社) および国際塩基配列データベース (GenBank/DDBJ/EMBL) を使ってアポロン 2.0 (テクノスルガ・ラボ社) ソフトウェアによって相同性検索および簡易分子系統解析を行った。

8. 分析

もろみおよび焼酎の一般成分分析は国税庁所定分析法注解¹³⁾に従い行った。

焼酎の香気成分は以下の方法で分析した。すなわち、焼酎 10ml と 100mg/l の 1-ペンタノール 1ml をヘッドスペース自動濃縮装置 Entech 7100A (Entech Instruments Inc., USA) の 250ml 専用容器に入れ、30℃の恒温水槽にて1時間保温しヘッドスペースガス 100ml を捕集および濃縮後、GC-MS 分析に供した。ヘッドスペースガスの濃縮は、ヘッドスペースガスを 20℃のガラスビーズにトラップ後、180℃まで加温させて発生したガスを -150℃のシリカにトラップした後、150℃まで急昇させて GC-MS 分析に供した。GC-MS による分析は神渡ら¹⁴⁾の方法を一部改変して行った (Table 1)。成分の同定は、Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーおよび、標準物質の保持時間とマススペクトルパターンとの比較により行った。

9. 官能評価

焼酎のアルコール度数を 25% に調製後、2:2 点識別法¹⁵⁾により、5 名のパネラーで実施した。

Table 1 Conditions for gas chromatography-mass spectrometry to analyze general aroma compounds.

GC	Agilent 5975B inert
Column	DB-WAX 0.25mm × 60m, Film 0.25 μm
Carrier gas	Helium, 1ml/min (constant flow)
Oven	40℃ (5min.) to 230℃ at 3℃/min (hold 10min)
Injection	240℃, Splitless
MSD	Agilent 5973
Ion source temperature	250℃
Ionization method	Electron Ionization
Mass range	Total Ion Monitor: m/z 29 ~ 425

実験結果と考察

1. 酵母増殖に及ぼす培地初発 pH とアルコール濃度の影響

土壌には多種多様な微生物が生存するため YPD 液体培地では酵母を優先的にスクリーニングすることは困難であると予想された。微生物の増殖を抑制するには、培地の pH を可能な限り低く、アルコール濃度をできるだけ高くする必要がある。そこで、一般的に使用される焼酎酵母 K2, C4 および H5 が生育可能な pH とアルコール濃度を求めるために以下の実験を行った。

まず、培地の初発 pH の影響について検討した。その結果、Fig. 1 に示すように初発 pH が低くなるほど増殖が遅れる傾向があり、pH2.3 以下では増殖が認められなかった。K2 は C4 および H5 と比べて pH の影響を受けやすく pH3.6 以下で濁度が弱冠低かった。総菌数は pH3.6 において、K2 の 1.3×10^8 個/ml と比べて C4 および H5 はそれぞれ 1.7×10^8 および 1.9×10^8 個/ml と高かった。また、pH3.2 では K2, C4 および H5 はそれぞれ 1.1×10^8 , 1.6×10^8 および 1.6×10^8 個/ml と K2 が最も pH の影響を受けた。本実験に使用した全ての酵母とも pH4.0 の培地が濁度および総菌数が高い値であり、H5 は 2.2×10^8 個/ml と K2 と比べ 1.5 倍高かった。なお、pH3.2 以上では全ての条件で生菌率は 100% であった。また、前培養液の生菌数はいずれの酵母とも 1.5×10^8 個/ml であった。

次に、培地の初発 pH3.2 でアルコール濃度が 1, 2, 5, 7 および 10% (v/v) の YPD 液体培地を用いて初発アルコール濃度の影響について検討した。その結果、Fig. 2 に示すように増殖速度はアルコール濃度に依存し、アルコール濃度が 5% 以上で明らかに増殖阻害を受け 7% 以上ではほとんど増殖しなかった。志垣ら¹⁶⁾のアルコール 5% 以上で増殖速度が急激に低下し、10 ~ 11% で増殖が停止すると報告したこととはほぼ同様の結果であった。アルコール濃度 2% 以下では、いずれの酵母でも $1.2 \sim 1.7 \times 10^8$ 個/ml、生菌率 100% であった。一方、アルコール濃度 5% では $0.4 \sim 0.7 \times 10^8$ 個/ml とアルコールによる生育阻害を受けたが生菌率はほぼ 100% であった。アルコール濃度が 7% および 10% では全ての酵母において増殖は抑制されたが、生菌率は 90% 程度あった。このことから、培地

Figure 1 Effect of initial pH of the medium on the growth curve.

The YPD medium contained 20g glucose, 20g polypeptone, and 10g yeast extract per liter of a 0.2M HCl buffer adjusted to 2.1(○), 2.3(△), 3.2(×), 3.6(▲), 4.0(□) and 4.6(◆).

The *Saccharomyces* K2(A), C4(B) and H5(C) were incubated at 30°C with a 20-rpm shaking rate in the YPD medium, and the turbidity was measured automatically at 30 minute intervals at a wavelength of 660 nm.

の初発アルコール濃度は5%が妥当であることが分かった。芋焼酎製造において、二次仕込み即下のもろみはpH4.0前後、アルコール濃度4～6%である。上述の結果から、芋焼酎の二次仕込みは焼酎酵母の生育環境としては限界に近い条件で仕込まれていることが分かる。

2. 土壌からの酵母のスクリーニング

焼酎酵母はpH3.2以上、アルコール濃度5%以下で生育が可能であった。そこで、pH3.2およびアルコール濃度5%になるように調製したYPD液体培地を用いて7か所の土壌からの酵母のスクリーニングを行なった。その結果、2本の培養液(No. 6およびNo. 7)が懸濁し気泡の発生が認められた。他の5本の培養液は透明で微生物の増殖が観察されなかった。このことから今回設定した培地条件では土壌微生物の増殖を強く抑制できることがわかった。

No. 6およびNo. 7の培養液をYPD平板培地

(pH3.2, アルコール濃度5%)に塗抹して30°Cで7日間培養した。酵母の形態と判断したコロニーをNo. 6では30株、No. 7は14株を単離してスクリーニングを行った。その結果としてNo. 6-1株～No. 6-30株の中で代表的な菌株の発酵経過をFig. 3に示す。また、No. 7は全ての菌株が72時間後の重量減少量が0.2g以下と発酵が非常に緩慢なため、焼酎製造には使用できないと判断した。なお、対照としてK2を用いて行った。No. 6-1株～No. 6-30株の全てがK2と比べて発酵速度が遅かった。しかし、No. 6-5株の発酵経過はK2と比べて初期は遅れたものの最終的には遜色なく、発酵液はアルコール発酵した一次もろみの香りを有した。

3. No. 6-5株による芋焼酎の小仕込み試験

麴米150g規模の小仕込み試験を行った。Fig. 4に示すようにNo. 6-5株の発酵経過はK2と比べて一次、二次もろみとも立ち上がりが遅れることがわかった。

Figure 2 Effect of ethanol concentration on the growth curve.

The YPD medium contained 20g glucose, 20g polypeptone, and 10g yeast extract per liter of a 0.2M HCl buffer (pH3.2) in the presence of 0(○), 1(▲), 2(□), 5(◇), 7(●) and 10%(△) ethanol.

The cultivation and the turbidity measurement were carried out by the method described in Figure 1.

Figure 3 Fermentation curves of the isolated strain No.6-5(●), No.6-14(▲), No.6-17(◇), No.6-19(△) and No.6-20(■), and *Saccharomyces* K2(○) in seed mash (6g scale).

しかし、最終的なもろみ重量減少量には大差がなく遜色ない発酵経過であった。蒸留して得られた焼酎は柔らかな風味とふくよかな味を持つ芋焼酎であった。

本格焼酎は、主に温暖な地域で造られるため、もろ

みが雑菌に汚染されやすい環境である。しかし、麹菌が生産するクエン酸によってもろみの pH は低く保たれるため、雑菌の増殖が抑えられ耐酸性の高い焼酎酵母が優先的に増殖し健全な発酵が行われている。しか

Figure 4 Fermentation curves of No.6-5 strain (△) and *Saccharomyces* K2 (○) in a 1.5 kg scale of sweet potato shochu.

Figure 5 Effect of initial yeast concentration in seed mash.
 Symbols: ○, *Saccharomyces* K2 (2×10^5 cells/ml); ◆, No.6-5 strain (2×10^5 cells/ml); △, No.6-5 strain (4×10^5 cells/ml); □, No. 6-5 strain (1×10^6 cells/ml)

し、一次および二次仕込み後の立ち上がり、すなわち酵母の増殖が遅れることでもろみの腐造の可能性が高くなることが予想される。そこでNo. 6-5株の一次および二次もろみの立ち上がりの改善について検討した。まず、一次仕込みにおいて、一般的な初発酵母濃度である 2×10^5 個/ml の2および5倍濃度になるように酵母を添加して発酵試験を行なった。その結果Fig. 5に示すとおり、発酵経過は初発酵母濃度がK2と同じ場合、明らかに発酵は遅れたが、2倍濃度添加することでK2と同様の発酵経過となった。

次に二次もろみについて検討した。K2とNo. 6-5

株の一次もろみの総菌数、生菌率およびアルコール濃度についてTable 2に示す。K2はもろみ日数が長くなるほど総菌数は増加するが、No. 6-5株は仕込み後3日経過後と6日後にはほとんど差がなく 1.3×10^8 個/mlであった。また発酵日数が長くなるほど生菌率は低下し6日後には10%となり、K2と比べて1/5以下であった。このことから、No. 6-5株はK2と比べて増殖が弱く、アルコール生産性も低いことがわかった。二次もろみの立ち上がりが遅れる理由として、No. 6-5株の生菌数がK2と比べて1/10以下であることが原因であると考えられた。

Table 2 Cell density of the yeast and alcohol concentration in the seed mash.

Fermentation time	3 days			4 days			6 days		
	Cell density	Viable cell rate	Alcohol	Cell density	Viable cell rate	Alcohol	Cell density	Viable cell rate	alcohol
	$\times 10^8$ cells/ml	%	%	$\times 10^8$ cells/ml	%	%	$\times 10^8$ cells/ml	%	%
<i>Saccharomyces</i> K2	1.4	80	11.5	2.5	75	12.9	2.7	56	14.3
No. 6-5 strain	1.3	62	9.6	1.3	35	10.8	1.2	10	12.0

The yeast cell density in the seed mash was determined by counting in a hamacytometer.

Viable cell numbers were estimated from the methylene blue stain method¹⁰⁾.

以上の結果をもとにして麴米 150g 規模における小仕込み試験において、一次仕込み時に酵母濃度を K2 と比べ 2 倍添加し発酵させ、一次仕込み後 3 日経過したもろみを用い二次仕込みを行った。その結果、一次もろみ及び二次もろみとも K2 と遜色ない発酵経過であった。

4. 実用化試験

麴米 500kg 規模の実用化試験を行った。一次仕込み後 3 日経過したもろみのアルコール濃度は No. 6-5 株は 12.8%, K2 は 14.0% であった。総菌数は 1.1×10^8 個 / ml, 生菌率は 63% と K2 の 1.8×10^8 個 / ml, 76% と比べていずれとも若干低い値であった。しかし目視による観察において、二次もろみの立ち上がりは遜色ない経過を示し、蒸留前のアルコール濃度は 14.3% と K2 の 14.4% と大差なかった。原酒を割水により 25% に調製した焼酎の酸度はいずれとも 1.4, pH4.5 であった。2:2 点識別法による官能試験の結果、K2 と No. 6-5 株で製造した芋焼酎は 5 名のパネラー全員が識別できた。この結果は危険率 5% 以下で有意に識別できることを意味しており¹⁵⁾、風味が明らかに異なることがわかった。その風味の違いとして、No. 6-5 株は蒸芋の柔らかな風味を持つ芋焼酎であると評価された。

GC-MS による香気成分の分析結果を Table 3 に示す。高級アルコールのなかで、イソブチルアルコールと β -フェネチルアルコールは No. 6-5 株が K2 と比べてそれぞれ 0.75 倍と 0.2 倍の生成量であった。その他の高級アルコールには大差がなかった。エステル類は No. 6-5 株は K2 と比べて酢酸エチルと酢酸プロピルは生成量に大差が無かったが、清酒の吟醸香といわれているカブロン酸エチルは 1.7 倍高かった。しかし、その他 4 種類のエステル類は全て No. 6-5 株は K2 と比べて 0.5 ～ 0.8 倍低い値であった。高級アルコール

Table 3 Analysis of volatile compounds in headspace gas of shochu produced in plant scale by *Saccharomyces* K2 and No.6-5 strain.

Volatile compound	<i>Saccharomyces</i> K2	No.6-5 strain
	mg/L	
n-Propyl alcohol	126	125
Isobutyl alcohol	280	209
Isoamyl alcohol	395	397
β -phenetyl alcohol	53	18
Ethyl acetate	93	92
Ethyl isobutanoate	0.17	0.08
n-propyl acetate	0.07	0.06
Isobutyl acetate	0.73	0.45
Isoamyl acetate	2.4	1.8
β -phenetyl acetate	2.5	1.6
Ethyl caproate	0.23	0.39
	μ / L	
Citronellol	42	31
Linalool	108	99
α -Terpineol	143	157
Nerol	N.D.	N.D.
Geraniol	N.D.	N.D.

The volatile compounds of shochu were introduced to the GC-MS by the following headspace methods and analyzed by the analytical condition shown in Table 1.

Headspace methods: The 10ml/ shochu and 1ml/ of 100mg/l 1-pentanol were added into an Entech 7100A Preconcentrator.

N.D., not detected

類とエステル類は主に酵母によって生成¹⁷⁾されるため、生成量に差が生じたといえる。また、高級アルコール類とエステル類は香気成分として焼酎に華やかさを寄与する成分であり、No. 6-5 株で製造した芋焼酎は K2 と比べて、これらの成分が少ないことが官能的に蒸芋の柔らかい風味を感じさせた要因と考えられる。

No. 6-5 株で製造した芋焼酎に含まれるリナロールと α -テルピネオールには大差が無かったが、シトロ

ネロールはK2と比べ0.74倍程度の生成量であった。モノテルペンアルコール類は芋焼酎特有の香りである。発酵過程で麹菌の生産した β -グルコシダーゼと酵母および蒸留過程で酸と加熱により生成される。特にシトロネロールはゲラニオールおよびネロールから酵母により変換されて生成する¹⁸⁾。このことから、本研究におけるシトロネロールの濃度差は酵母による変換効率の違いによるものと推察される。

5. No. 6-5 株の同定

土壌から分離したNo. 6-5株をYM平板培地（酵母エキス0.3%，ペプトン0.5%，麦芽エキス0.3%，グルコース1%，寒天2%）上に25℃で4日間培養した。顕微鏡観察の結果、Fig. 6のとおり栄養細胞は広楕円形であり、増殖は多極出芽によることが確認された。一般的に酵母は酢酸カリウム培地で子嚢胞子を形成するが、No. 6-5株はYM培地上でも子嚢に2～4個の球状の子嚢胞子が観察され永存性を示した。生理的な性状はTable 4に示すように、糖の発酵性においてマルトースとラフィノースを発酵しなかった。また、炭

素源の資化性についてはトレハロースとマンニトールを試験開始後2週間後に急速に資化した。窒素源は資化せず、ビタミン要求性は認められなかった。また、40℃までは生育するが45℃では生育せず、50%グルコース存在下では試験開始後2週間後に急速に生育し

Figure 6 Optical fractography image at a 1500 × magnification.
a, scale bar (10 μ m); b, spore

Table 4 Physiological characteristics of No.6-5 strain.

Fermentation test

Glucose	+	α -Methyl-D-glucosid	+	Melibiose	-
Galactose	+	Sucrose	+	Raffinose	-
Maltose	-	Trehalose	-		

Assimilation test

Glucose	+	α -Methyl-D-glucosid	+	D-Mannitol	L
Galactose	+	Salicin	-	Galactitol	-
D-Glucosamine	-	Melibiose	-	Inositol	-
D-Ribose	-	Lactose	-	D-Gluconate	-
D-Xylose	-	Soluble starch	-	DL-Lactate	-
Sucrose	+	Raffinose	+	Succinate	-
Maltose	+	Glycerol	-	Ethanol	S
Trehalose	L	Ribitol	-		

Nitrogen assimilation test

Nitrate	-	L-Lysine	-	Cadaverine	-
Ethylamin	-				

Tolerance test

Growth at 30℃	+	Growth at 45℃	-	50% Glucose	L
Growth at 37℃	+	Cycloheximide 1 μ g/ml	-	10% NaCl/5% glucose	-
Growth at 40℃	+				

Vitamin requirement test

Vitamin-free	-
--------------	---

S means slow and shows that a positive reaction was gradually recognized after three weeks or more from two weeks after the start of the examination.
L means latent and shows that positive reaction was rapidly recognized two weeks after the start of the examination.

た。シクロヘキシミドおよび 10% NaCl 存在下では生育しなかった。以上の結果は、The Yeast に記載されている *Saccharomyces cerevisiae* と類似した生理的特徴を示した。

No. 6-5 株の 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列を決定し、アポロン DB-FU および国際塩基配列データベースに対する BLAST 相同性検索を行った結果、*S. cerevisiae* の基準株 NRRLY-12632 に対し 100% の相同率を示した。また、BLAST 検索で得られた上位 20 塩基配列をもとに作成した Fig. 7 に示す系統樹において、No. 6-5 株は *Saccharomyces* 属からなる系統群に含まれ、*S. cerevisiae* NRRLY-12632 と同一の系統枝を形成しブーストラップ値は 99% で支持された。しかし、26S rDNA-D1/D2 による塩基配列解析では *S. cerevisiae* による同定に関しては限界があり、少なくとも *S. cerevisiae* と *S. patorianus* は同じであるため、この方法では *S. cerevisiae* とは断定できなかった。今後、更なる詳細な塩基配列の解析による同定を行う必要がある。

本研究において、耐酸性、耐アルコール性を指標として土壌から効率よく酵母を分離することができた。この酵母は分離源が篤姫ゆかりの場所の土壌から分離したことから篤姫酵母と呼称することとした。

要 約

本格焼酎の付加価値を高めるためストーリー性があり、また、従来の芋焼酎と比べて蒸芋の柔らかな風味を有する商品開発を目的として、篤姫ゆかりの地の土壌から焼酎酵母の分離を行い、芋焼酎の製造試験を実用規模で試みた。

焼酎酵母の耐酸性と耐アルコール性の特性を見出し、初発培地 pH3.2 およびアルコール濃度 5% の YPD 液体培地を用いて集積培養した。この培地を用いることで多種多様な微生物が存在する土壌から効率よく焼酎製造に利用できる酵母の分離ができた。この酵母は小仕込み試験の結果、蒸芋の柔らかな風味を持つ芋焼酎を製造できることがわかった。しかし一次および二次仕込み後の発酵経過が遅れた。そこで、一次もろみで

Figure 7 Neighbor-joining tree based on the comparison of the 547 bps in the D1/D2 region of 26S rDNA. The number in parentheses is the accession number of the DNA Data Bank.

は初発酵母濃度を従来の2倍にすること、二次仕込みは一次仕込み後三日経過したもろみを使用することで発酵経過を改善できた。実用化試験では、鹿児島2号酵母と遜色ない発酵経過を示した。酒質は蒸芋の柔らかい風味を持つ芋焼酎となり、カプロン酸エチルの生成量がK2と比べて1.5倍以上高いことがわかった。分離したNo. 6-5株は形態観察、生理性状試験から*Saccharomyces cerevisiae*と推定できたが、26S rDNA-D1/D2塩基配列解析の結果では、*S. cerevisiae*または*S. patorianus*と推定された。この酵母は実用性のある酵母であることが確認でき、芋焼酎の商品化に成功した。

参考文献

- 1) 高峯和則, 鮫島吉廣: 醸協, **103**, (8), 601 ~ 606 (2008)
- 2) 小玉健太郎: 醸協, **94**, (11), 879-883 (1999)
- 3) 柳田藤寿, 小玉健太郎, 篠原隆: 醸協, **97**, (2), 150-161 (2002)
- 4) 柏木亨: 醸協, **97**, (1), 2-5 (2002)
- 5) 谷村健, 濱田明美, 鬼束楠里, 野崎直樹, 甲斐孝憲, 小川喜八郎: 醸協, **100**, (1), 56-64 (2005)
- 6) 小室友香理, 穂坂賢, 中田久保: 醸協, **99**, (10), 743-749 (2004)
- 7) 松田義弘, 上木厚子, 上木勝司: 醸協, **104**, (1), 57-74 (2009)
- 8) 熊谷昌則, 高橋慶太郎, 高橋砂織: 秋田県総合食品研究所報告, **3**, 57-63 (2001)
- 9) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 神渡 巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男: 鹿児島県工業技術センター研究報告, **8**, 1-6 (1994)
- 10) M. Sami, M. Ikeda, and S. Yabuuchi: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 212-216 (1994)
- 11) J. A. Barnett, R. W. Payne and D. Yarrow: *Yeasts, Characteristics and identification*, 3rd edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2000)
- 12) C. P. Kurtzman and J. W. Fell: *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th edition, Elsevier Science (1998)
- 13) 注解編集委員会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京) 39-40, 230-231 (1996)
- 14) 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎: 醸協, **101**, (6), 437-445 (2006)
- 15) 佐藤信: 官能評価入門, (株) 日科技連出版社, 東京, 52-54 (2006)
- 16) 志垣邦雄, 鈴木昭紀, 西谷尚道: 醸協, **67**, (4), 370-372 (1972)
- 17) 醸造物の成分 (財団法人日本醸造協会, 東京) 115-123 (1999)
- 18) 太田剛雄: 醸協, **86**, (4), 205-254 (1991)