返し仕込みによる焼酎製造に使用する生存能の高い 焼酎用酵母の育種

中川 優・森村 茂・木田建次
(熊本大学工学部物質生命化学科)

平成 8 年 11 月 14 日受理

Breeding of *Shochu* Yeasts with High Viability for *Shochu* Making with Recycling of Post-Distillation Slurry

Masaru NAKAGAWA, Shigeru MORIMURA, Kenji KIDA
(Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Faculty of Engineering,
Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken, 860)

In developing a new production method for rice-*shochu* using its post-distillation slurry in place of the first stage mash, its yeast autolysis would add off-flavor to resultant *shochu*. To minimize yeast autolysis, breeding of *shochu* yeast with high viability was attempted. Thirty four *shochu* yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) underwent 4 rounds of autolysis of which method was developed by Hara, Umetsu, Totsuka and Iimura (1979). Viability of yeast cells was determined by the alkaline methylene blue staining method. Generally 13 to 18 ethanol-tolerant strains were isolated from one parental strain. Although the newly acquired property of high viability was easily lost during subcultures, storing the isolates on 2% YPD medium slants added with 11% ethanol as a final concentration retained high viability and ethanol-tolerance. Eight strains with high viability were evaluated by laboratory-scale *shochu* making tests. Consequently, the strain S 20 E 12 was subsequently examined in a two-liter *shochu* making test. The yeast was 75% viable after 5 days in the first mash even though ethanol content was about 19%v/v and about 90% viable in 8th day of the second stage mash. However, its value dropped to 13% drastically in 11th day. The autolysis was not occurred yet.

Key words : 焼酎蒸留残液, 返し仕込み, 生存能

結 言

焼酎製造の際、排出される蒸留残液量は 1993 年度実績で 380,000 kl にも達しており、蒸留残液の BOD 値及び SS 含量は非常に高く、且つ固液分離が非常に難しいことから、処理しにくい有機性廃水とされている。このため約 50% は海洋投棄により処分されているが、ロンドン条約により海洋投棄量を毎年削減し、2001 年にはゼロにしなければならない。また、欧州連合等が世界貿易機構 (WTO) に提訴していた問題で、WTO の小委員会はウィスキーに比べ焼酎の酒税が低いのは

ガット違反と認定した。このように蒸留残液や酒税の問題は、焼酎業界にとって死活問題であり、製造コストの低減をも含めた蒸留残液の効率的処理法の開発は緊急の課題である。

そこで、酵母を用いた固液分離¹⁻³⁾やメタン発酵を中心とする生物処理⁴⁻⁹⁾に関する研究が多くなされているが、最近では廃棄物のリサイクリングやゼロエミッションといった観点から、蒸留残液を資源として捉え有効利用する研究が多くなされるようになってきた。例えば、酵素生産¹⁰⁻¹²⁾、飼料用麹菌体の生産^{13,14)}、またワイン酵母の生産¹⁵⁾などがあるが、これらの方法では

生産物を回収した後の処理が必要となる。一方、実用化規模で行われた研究としてフィルタープレスで蒸留残液を固液分離した後、その濾液に麴と酒母、蒸米を添加して米焼酎を繰返し製造したものがある¹⁶⁾。これが普及しなかった理由は不明であるが、フィルタープレスの購入に伴う製造コストのアップなどの問題が考えられる。そこで、上田らにより蒸留残液を固液分離することなくそのまま用いて工業用アルコールやみりん様調味料の製造に関する研究がなされた¹⁷⁻¹⁹⁾。この研究において焼酎製造に関する研究がなされなかったのは、酒質が低下するためと言われている。

酒質の低下は、酵母の死滅後、自己消化が起こり、漏出したタンパク質や糖類、脂質が加水分解され、アミンや過酸化物質などが生成されるためと考えられる。そこで、生存能の高い酵母が育種できれば、酒質の低下を招くことなく、蒸留残液から再度焼酎を製造すること（以後、返し仕込みによる焼酎製造と呼ぶ。）が可能と考えられた。原ら^{20,21)}は、清酒酵母についてエタノール耐性株を取得することにより野性型株に比較して生存能が向上すると報告している。そこで、ここでは自己消化法により生存能の高い焼酎用酵母の取得を試みた後、取得した形質の保存法を検討し、一次仕込みにより香気性に優れ、且つ生存能の高い焼酎用酵母を選抜した。そして、選抜株の発酵特性を従来法による小仕込み試験を行うことにより調べたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 使用菌株

熊本県内醸造場から分離した野性型焼酎用酵母 32 株、および清酒酵母協会 9 号 (K 9) との細胞融合により造成した吟醸香生成能の高い焼酎用酵母 SF 3 (旧名 KF 3²²⁾)、またその p-フルオロフェニルアラニン耐性株である SR 16 (旧名 R 16²²⁾) を用いた。

2. 使用培地

2% YPD 培地 (g/ℓ: グルコース, 20; ポリペプトン, 20; 酵母エキス, 10) およびこの培地に寒天を 2% になるように添加した 2% YPD 斜面培地や平板培地を用いた。また、Brix 10 の麴汁培地は、米麴 (*Aspergillus kawachii*) 1 kg に水道水 3 ℓ を加え、60°C の恒温水槽に 12~16 時間浸漬した後、この麴汁を濾紙 (No.1, ADVANTEC) で濁りがなくなるまで繰返し濾過し、

その後 Brix 計を用いて糖度が 10% になるように水道水で希釈することにより調製した。

3. 一次仕込み試験による生存能の評価

滅菌した 300 ml 三角フラスコに入った麴汁培地 100 ml に、2% YPD 斜面培地から菌株を 1 白金耳植菌した。これを 25°C で 2 日間静置培養したものを酒母とした。1.5×10⁸ 個の酵母を蒸留水で 2 回洗浄した後、汲水 117 ml で 300 ml 三角フラスコに洗い込んだ。これに米麴 109 g を加え、三角フラスコの上部に約 10 ml の蒸留水を注入した滅菌済みマイセル管を装着することにより水封した。これを 25°C で 5 日間静置培養し、醪中の生菌数および生成エタノール濃度を測定した。

4. エタノール耐性株の取得

原らの自己消化法^{20,23)} に準じてエタノール耐性株の取得を試みた。すなわち、2% YPD 液体培地で 25°C、2 日間静置培養した菌体を集菌、洗浄した。洗浄菌体 5×10⁸ 個を 1% グルコース含有 0.1 M 酢酸バッファー (pH 4.2) で調製した 20% エタノール溶液 5 ml に懸濁し、15°C で 7 日間放置した。この自己消化後の懸濁液を希釈することなく、また無菌水で 10 倍希釈した後、2% YPD 平板培地に塗布し、25°C で 3 日間インキュベートした。出現したコロニーのうち特に大きいもの 2 つを釣菌し、2% YPD 斜面培地に植継いだ。斜面培地に増殖した菌体を同様の方法でさらに 3 回自己消化させた後、最終的に得られたコロニーをエタノール耐性株とした。

5. 小スケール (約 200 ml) での小仕込み試験

一次仕込みは、マイセル管の代わりにサランラップで三角フラスコの上部を覆う以外は前述した方法で行った。5 日後の発酵醪の 1/4 量を 300 ml 三角フラスコに取り、これに汲水 112 ml と掛米 79 g を加え、三角フラスコの上部をサランラップで覆った。これを 25°C で静置培養し、この発酵醪を二次醪とした。なお、各項目の経日変化を調べるためのサンプリングは、あらかじめサンプリング回数を決定し、同じ株について必要な本数を同時に仕込み、1 回のサンプリングにつき三角フラスコ 1 本分を使用した。

6. 中スケール (約 2 ℓ) での小仕込み試験

操作は、量的なものの以外は小スケールの小仕込み試験と同じである。二次仕込みは、一次醪の全量 355 ml を 2 ℓ 三角フラスコに取り、これを汲水 966 ml と掛米 698 g を加えた後、同様にサランラップで覆い、その後

25°Cで静置培養することにより行った。なお、一次及び二次仕込み期間中1日1回手で攪拌した。

7. 酵素活性及び分析用サンプルの調製

適量の醪を脱脂綿で濾過することにより濾液を得た。この濾液を用いて醪中の総菌数、生菌数を測定したが、これ以外の分析や酵素活性の測定にはこの濾液をスピッツ管に取り、3,000 rpm、5分間遠心分離した上澄液を0.45 µmのメンブレンフィルター（ニトロセルロースフィルター、ADVANTEC）で濾過することにより調製したサンプルを用いた。

8. 糖化酵素の活性測定

醪中のグルコアミラーゼ活性は、上述した方法により調製した測定用サンプルを適当に希釈した後、JIS-K 7001 糖化用 Amylase 試験法²⁴⁾により測定した。ソモギ・ネルソン法²⁵⁾により生成した還元糖量を測定し、その値から酵素力価を算出した。なお、1 U は、1 分間に1 µmol の還元糖を生成する酵素量と定義した。

耐酸性 α-アミラーゼ活性は、調製したサンプルを適当に希釈した後、ヨウ素-デンプン反応²⁶⁾を利用して測定し、酵素活性を次式から算出した。

酵素活性(U/ml) = $\{(T_t - T_0)/t\} \times 12.75 \times \text{希釈倍率}$
上式で T_t はヨウ素溶液の紫色の消失する時の透過率、 T_0 は反応前のヨウ素液の透過率、 t は紫色が消失するのに要した反応時間 (min) である。

9. 分析方法

醪中の総菌数、生菌数の測定は、醪を脱脂綿で濾過した濾液（実験方法 7 参照）を5倍希釈した後、0.01 %メチレンブルー染色液（グリシンバッファー、pH 10.6）を用いて測定した²⁷⁾。

調製したサンプルのエタノール濃度の定量は、サンプルを100倍に希釈した後、この希釈液1 mlに2 g/l イソプロパノール溶液1 mlを加え、FID ガスクロマトグラフ (GC-353, ジーエルサイエンス社製) に直接注入する内部標準法により定量した。使用した分析用カラムはキャピラリーカラム FS-WCOT. OV-101 (length, 50 m; I.D., 0.25 mm, df, 0.5 µl) であり、測定条件はカラム温度 50°C, 注入口温度 180°C, 検出器温度 180°C, スプリット比 1/50 であった。

硫黄濃度は、サンプルを10倍希釈し、硫黄分析計 (ANTEK 7000, ANTEK 社製) に直接注入することにより定量した。なお、サンプルの注入装置であるマルチマトリックスサンプリングシステムの定速注入イ

ンジェクターのスピードは、950 に設定した。

α-アミノ態窒素濃度²⁸⁾ は、調製したサンプルを1,000倍に希釈した後、2 mlを試験管に取り、これを4 %リン酸バッファー (pH 8.2) 2 mlと0.1 % TNBS 溶液2 mlを加え混合した後、恒温水槽中で45°C, 90分間インキュベートした。その後、1 N HCl 溶液2 mlを加えることにより反応を終結させた。そして、340 nmの吸光度を測定し、検量線から α-アミノ態窒素濃度を算出した。

クエン酸濃度は、調製したサンプルを10倍希釈した後、F-キットクエン酸法（ペーリンガー・マンハイム社）により測定した。

有機酸濃度は、高速液体クロマトグラフ (880-PU, 860-CO, 日本分光) を用いて、有機酸分析用カラム (Shim-pack SCR-101 H, 島津) で分離した後、Bromothymol Blue (BTB) 溶液で発色させ、紫外可視分光検出器 (870-UV, 日本分光) によって450 nmで吸光度を測定するポストラベル法で分析した。

減圧蒸留により得られた製品（エタノール濃度、25 % v/v）中の低沸点香氣成分は、微量成分導入装置 (CHROMPACK 社製) を用いた PTI (purge and trap injector) 法により濃縮した後、FID ガスクロマトグラフ (GC-380, ジーエルサイエンス社製) により測定した。分析用カラムは、キャピラリーカラム TC-WAX (length, 60 m; I.D., 0.25 mm, df, 0.5 µm) であった。カラム温度のプログラムは、50 から 60°C まで昇温速度 1°C/min, 60°C で10分間保持, 60 から 160°C まで昇温速度 10°C/min とした。

実験結果及び考察

1. 一次仕込み試験による酵母の生存能の比較

Fig.1 は一次仕込み6日目の生成エタノール濃度とそれぞれの酵母の生存率を示している。清酒酵母 K 9 の生存率が約 40 % と最も低く、また清酒酵母との融合により造成した SF 3 および SR 16 株の生存率も野生型焼酎用酵母と比較して 10 ~ 20 % 低かった。この原因として清酒酵母 K 9 株は、クエン酸耐性がないものと考えられた。野生型酵母の中でも生成エタノール濃度や生存率に違いが見られたので、Fig.1 に示した斜線上の S 4, S 20 および S 22 株を生存能の優れた野生型株とした。そこで、これら3株を用いて従来法による小仕込み試験を行ったが、二次最終醪のそれぞれの生

Fig. 1 Relationship between viability and ethanol concentration in 5-d first-stage fermentation (*ichiji-shikomi*).

Kyokai no.9: *sake* yeast, *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.9

SF 3: *shochu* yeast, *Saccharomyces cerevisiae* SF 3, a fusant
SR 16: *shochu* yeast, *Saccharomyces cerevisiae* SR 16, a fusant
S 22, S 4 and S 20: wild *shochu* yeasts isolated in *shochu* distilleries

Ichiji-shikomi (the first stage mash for *shochu* making) consisting of 109 g of rice for *koji* and 127 ml of water in a 300 ml flask was fermented at 25°C for 5 days.

Viability of yeast cells was determined by the alkaline methylene blue staining method: 0.01 % methylene blue in glycine buffer (pH 10.6) at 25°C for 15 min.

生存率は 18, 22, 19% と低かった。

2. 育種株および野性型株からのエタノール耐性株の取得

上述した野性型株 3 株と育種株 SF 3 および SR 16 の計 5 株から、生存能の高い酵母を取得するためにエタノール耐性株の取得を試みた。4 回の自己消化を繰り返すことにより、それぞれの酵母からエタノール耐性株を 13~18 株取得した。取得した全てのエタノール耐性株の生存能を評価するために一次仕込み試験を行った。一例として SF 3 株とそのエタノール耐性株の一次仕込み試験 6 日目の結果を Fig. 2 に示したが、全てのエタノール耐性株の生存能は親株に比較して向上していた。また、他の株においても同様な結果が得られた。

3. 取得した形質を保持するための保存方法の検討

親株である SF 3 株と、2% YPD 斜面培地で継代培養したエタノール耐性株 SF 3 E 18 の一次仕込み試験を行い、6 日目の生存率を測定し Table 1 に示した。

Fig. 2 Relationship between viability of strain SF 3 and its ethanol-tolerant strains and ethanol concentration after 5 days of the first stage mash fermentation.

Symbols: ▲, SF 3; △, ethanol-tolerant strains derived from strain SF 3

Isolation of ethanol-tolerant strains: strain SF 3 was grown statically in 2% YPD medium at 25°C for 2 days.

The cells were harvested and washed. The washed cells were suspended in a 0.1 M acetate buffer containing 1% glucose and 20% ethanol as final concentrations and left at 15°C for 7 days. After the autolysis, the cells were streaked onto 2% YPD medium slants. This procedure was one round of autolysis. Upon three successive rounds of the autolysis, colonies grown on the plates in the three rounds of the autolysis were regarded as ethanol-tolerant strains.

エタノール耐性株の生存率は親株 SF 3 と比較して約 30% 向上していたが、継代培養を行うことにより低下した。自己消化法によるエタノール耐性株は、エタノールストレス下で取得されたので、2% YPD 斜面培地で継代培養すると取得した形質（エタノール耐性に伴う高い生存能）は欠落したと思われる。そこで、野性型株および SF 3 のエタノール耐性株 22 株を用いて、2% YPD 斜面培地中のエタノール濃度の検討を行い、その結果に基づき 11% エタノール含有 2% YPD 斜面培地で以後保存することにした。この方法で保存したところ、11 回目の保存で増殖できないものが現れた。したがって、11% エタノール含有 2% YPD 斜面培地での保存は、1 週間おきに 10 回植え継いだ後、2% YPD 斜面培地に戻し（1 サイクル保存とする）、再びエタノール 11% 含有 2% YPD 斜面培地に植え継いでいくようにした。1 サイクル保存後のエタノール耐性株を用いて一次仕込み試験を行った。6 日目の生存率の高か

Table 1 Change of viability of ethanol-tolerant strains derived from strain SF 3 during subcultures.

Strain SF3 (parental strain)	Ethanol-tolerant strains		
	Subculture:		
	1st	2nd	3rd
59.2 %	86.9 %	82.8 %	60.3 %

Medium for subculture: 2% YPD medium agar slant consisting of 1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose and 2% agar.
Viability of subculture was determined after 5 days of the first stage mash fermentation.

Table 2 Changes in viability of ethanol-tolerant strains being subcultured on the 2% YPD medium slant added with 11%(v/v) ethanol as a final concentration.

Strains	Viability (%)		Ethanol concentration (%v/v)	
	1st	2nd	1st	2nd
S4E3	71.2	—	17.9	—
E4	78.6	—	16.3	—
S20E9	89.3	82.1	17.6	19.6
E11	85.7	—	16.7	—
E12	78.6	82.4	17.7	19.9
E14	87.8	81.5	18.8	20.3
S22E1	69.4	—	18.9	—
E4	75.0	80.6	18.5	20.2
E8	81.4	81.6	16.5	19.0
E11	72.7	—	17.2	—
E12	75.9	—	18.0	—

—: these strains did not grow following the second round storing.

Sub culture: an ethanol tolerant strain isolated was sub cultured on the 2% YPD medium agar slant added with 11%(v/v)ethanol as a final concentration every week. After 10 successive subculture, the strain was inoculated onto the 2% YPD medium slant. This procedure was the first round storing and repeated for the second round storing. Viability of a subculture was determined after 5 days of the first stage mash fermentation.

った株として S4E3, S4E4, S20E9, S20E11, S20E12, S20E14, S22E1, S22E4, S22E8, S22E11, S22E12 の 11 株を選択した (Table 2 参照)。

4. 小仕込み試験による生存能の高い酵母の選抜

保存方法の検討過程において、野性型及び育種株のエタノール耐性株から生存能の高い株 S20E9, S20E11, S20E12, S20E14, S22E4, S22E8 を取得した。この 6 株と吟醸香に優れた SF3 と SR16 のエタノール耐性株 SF3E37, SR16E2 の計 8 株を用いて小仕込み試験を行い、最優秀株の選抜を行った。

Table 3 は生成エタノール濃度の高かった 5 株の結果を示している。生存率は S20E14 が最も高かったが、官能試験の評価は圧倒的に S20E12 が優れていた。そこで、製品中の低沸点香気成分の分析を行った。酢酸イソアミルはバナナ、リング様の香りがすることから清酒の吟醸香の一つとされているが、Table 4 に示したように S20 のエタノール耐性株 2 株は、酢酸イソアミル高生産株として造成した SF3 や SR16 のエタノール耐性株 SF3E37, SR16E2 よりも製品中の酢酸イソアミル濃度が高かった。しかも、S20E12 株のアセトアルデヒド濃度は低く、そのために青くさい初留臭も弱く、これらの点から最も高い評価を受けたものと思われる。

5. 選抜株の 2 l スケールでの小仕込み試験による性能評価

S20E12 株を用いて麴歩合 33% で小仕込み試験を行った。Fig.3 に示したように、一次仕込みにおいては生成エタノール濃度は急激に増加し、仕込み 3 日後に約 19% に達した。それに伴い生存率が若干低下し、5 日後に 75% になった。しかし、生菌数が増加している時期においても醪中の硫黄、 α -アミノ態窒素およびクエン酸濃度、特に後の 2 成分は急激に増加した。従って、両物質の増加は酵母の死滅によるものでなく、麴の液化によるものと考えられる。逆にグルコアミラーゼ活性や耐酸性 α -アミラーゼ活性は低下し、特にグルコア

Table 3 Evaluation of strains with high viability selected from the 8 ethanol-tolerant strains in the laboratory-scale *shochu* making.

Strains	Viability (%)	Ethanol (%v/v)	Sensory test of <i>shochu</i> (25%v/v)		
			good	satisfactory	bad
S20E12	40.5	20.2	10	6	0
S20E14	71.4	19.5	4	10	2
S22E4	51.6	19.7	5	10	1
SF3E37	16.2	19.1	2	9	5
SR16E2	36.6	20.3	5	4	7

Strain S20E12 was selected for high rating in sensory test and viability. The laboratory-scale *shochu* making consisted of 1/4 volume of the first stage mash, 112 ml of water and 79 g of rice in a flask. It was fermented at 25°C for 8 days.

Table 4 Comparison of flavor compounds of *Shochu** made by using the ethanol-tolerant strains.

Flavor compounds	(unit, mg/l)				
	Ethanol-tolerant strains				
	S20E12	S20E14	S22E4	SF3E37	SR16E2
Acetaldehyde	1.6	4.8	6.1	13.4	11.6
Ethyl acetate	37.1	45.2	46.8	47.1	29.8
n-Propyl alcohol	107.1	133.1	161.0	215.3	287.1
Isobutyl alcohol	114.9	116.7	14.2	150.1	153.1
Isoamyl acetate	4.3	4.5	1.9	3.9	3.3
Active amyl alcohol] Isoamyl alcohol	89.7	106.5	129.0	148.7	238.2

* Ethanol concentration of *shochu* was 25%(v/v).

The *shochu* was made by the conventional method.

Analysis of flavor compounds: *shochu* samples were concentrated by the purge and trap injection method. The concentrates were injected into an FID gas chromatography with a TC-WAX capillary column.

ミラーゼ活性は時間と共に低下し、5日後にその活性は30%強も低下した。これはクエン酸の増加によるpH低下もしくは生成されたエタノールにより阻害されたものと考えられた。

一方、二次仕込みにおいては仕込み1日後にエタノール濃度は13%に達しており、8日目に発酵はほぼ終了しているものと思われた。そのためか生存率は急激に低下し、10日後の生存率は13%に低下していた。この現象は、我々が既に報告した凝集性酵母や液胞欠損株が発酵終了後、エネルギー源でもある炭素源が枯渇した時点で速やかに死滅する結果とよく一致していた^{29,30)}。醪中の硫黄濃度は一次仕込みと比較して上昇

幅が大きかったが、 α -アミノ態窒素濃度の上昇幅は逆に小さかった。しかし、両物質は生菌数が増加している期間中に増加したことから、やはり掛米が液化し増加したものと思われる。一方、クエン酸濃度については一次仕込みと異なりほとんど変化することなくほぼ一定していた。グルコアミラーゼおよび耐酸性 α -アミラーゼ活性は仕込み初期に低下するが、6日目以降はほぼ一定しており、二次仕込み終了後においても高い活性を維持していることがわかった。

また、クエン酸以外の有機酸の経日変化を併せ示した。一次仕込み、二次仕込ともに乳酸が主として生成され、その濃度は約1,900 mg/lに達した。清酒酵母は

Fig. 3 Course of two-liter *shochu* making using strain S 20 E 12

Strain S 20 E 12 was selected on the basis of high viability and high rating in sensory tests.

The laboratory-scale *shochu* making (2 liter) consisted of 355 ml of the first stage *moromi*, 966 ml of water and 698 g of rice. It was fermented in a 2-liter flask at 25°C.

Fig. 4 Effect of *moromi* temperature on fermentation rates and viability of strain S 20 E 12 in the second-stage mash fermentation.

Symbols: ○, ●, 25°C; △, ▲, 30°C; ◇, ◆, 33°C; □, ■, 35°C. Open symbols decrease of fermented mash; closed symbols, viability.

主としてコハク酸やリンゴ酸、乳酸を生成するが、若井の報告³¹⁾では有機酸の最大生産量は、1,500~1,600 mg/ℓとされており、この有機酸生成量はかなり高いも

のと言える。しかし、酢酸がほとんど生成されていないことや顕微鏡観察の結果から、上面酵母や酢酸菌などによる汚染によるものでなく、S 20 E 12 株により生

成されたものと考えられる。

全ての小仕込み試験は25°Cで行ってきたが、焼酎製造現場において発酵温度を25°Cに制御することは不可能である。そこで、発酵温度の異なる二次仕込みを行い、その結果をFig.4に示した。醪減少量から発酵温度としては30°Cが適しているように思われたが、生存率は発酵温度が高くなるほど発酵が終了していないにも拘わらず25°Cに比較して早く低下した。しかし、低下速度は25°Cに比較して緩やかな傾向を示した。特に、12日目以降の生存率は、25°Cに比較して逆に高かったが、これは発酵後期においてもエネルギー源である糖質が残存していたためと考えられる。以上、発酵速度および生存率から本菌株の発酵至適温度は、実験した範囲内で25~30°Cと考えられる。

要 約

返し仕込みに使用する生存能の高い焼酎酵母の取得を、自己消化法によるエタノール耐性株の取得に準じて行った。また、選抜した生存能が高く、吟醸香生成能に優れた焼酎酵母の発酵特性を小仕込み試験により調べた。得られた結果を要約すると次のとおりである。

(1) 野性株焼酎用酵母および細胞融合により育種した吟醸香生成能の高い焼酎用酵母SF3とSR16からエタノール耐性株を取得した。取得したエタノール耐性株を用いて一次仕込み試験を行った結果、ほとんどの株の生存率は親株よりも向上していた。

(2) 継代培養中に獲得した形質（生存能が高い）が欠落した。そこで保存方法を検討した結果、エタノールを11%含有する2%YPD斜面培地上で保存することにより取得した形質を保持できることがわかった。

(3) 生存能の高かった6株を含めた8株の小仕込み試験を行い、それぞれの性能を評価した。製品の官能試験及び生存率からS20E12株を優秀株として選抜した。

(4) 優秀株S20E12株の発酵特性を明らかにするために、従来法による小仕込み試験(2ℓスケール)を行った。二次仕込みは8~9日目ではほぼ終了したが、生存率は急速に低下した。しかし、11日目においても生存率は13%あり、また糖化酵素活性も仕込み初期に低下するが、6日目以降はほぼ一定していた。さらに、本菌は発酵期間中に乳酸を多く生成することがわかった。

(5) 発酵至適温度は、試験した範囲内で25~30°Cで

あった。

本研究の遂行にあたりご指導、ご助言を賜りました熊本国税局鑑定官室長嶋崎孝行氏、前主任鑑定官白上公久氏および鑑定官室の諸氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究に協力された学生西迫博行君、広渡洋二君、吉田めぐみさんおよび鶴田恵三君に心から感謝いたします。なお、本研究は日本酒造組合と球磨焼酎酒造組合、熊本大学工学部物質生命化学科との共同研究で実施したものである。

文 献

- 1) 高峯和則, 瀬戸口真治, 加世田春作, 浜崎幸男, 武宮重人, 木幡孝之: 醸協, 89, (4) 315 (1994)
- 2) 鈴木 修, 下飯 仁, 家藤治幸, 飯村 稔, 木幡孝之: 醸協, 89, (4) 321 (1994)
- 3) 木幡孝之: 醸協, 89, (5) 349 (1994)
- 4) 木田建次, 森村 茂, 園田頼和, 大部正明, 種村公平: 醸協, 85, (9) 651 (1990)
- 5) K. KIDA, Y. SONODA: *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 235 (1993)
- 6) K. KIDA, Y. NAKANO, Y. SONODA, T. NORIMURA, Y. TOMITA: *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 304 (1993)
- 7) K. KIDA, K. TANEMURA, Y. SONODA, S. HIKAMI: *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 90 (1994)
- 8) K. KIDA, S. MORIMURA, N. ABE, Y. SONODA: *Process Biochemistry*, 30, 125 (1995)
- 9) 木田建次, 森村 茂: 醸協, 90, (4) 255 (1995)
- 10) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. YAKITA, Y. SONODA, H. MYOGA: *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 329 (1991)
- 11) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. SONODA: *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 129 (1992)
- 12) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. SONODA: *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 183 (1994)
- 13) 森村 茂, 木田建次: 醸協, 90, (3) 173 (1995)
- 14) S. MORIMURA, K. KIDA, M. NAKAGAWA, Y. SONODA: *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 160 (1994)
- 15) F. C. YANG, H. L. TUNG: *Process Biochemistry*, 31, 617 (1996)
- 16) 技術情報: 熊本県工業技術センター, 7, (2), 6 (1986)
- 17) S. UEDA, Y. TERAMOTO, R. OHABA, T. UEKI, K. KIMURA, S. SHIOTA: *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 270 (1991)

- 18) Y. TERAMOTO, T. UEKI, K. KIMURA, S. UEDA, S. SHIOTA : *J. Inst. Brew.*, 99, 139 (1993)
- 19) Y. TERAMOTO, N. TATSUMI, S. UEDA : *J. Inst. Brew.*, 100, 65 (1994)
- 20) 原 昌道, 佐々木雅晴, 小幡孝之, 野白喜久男 : 醸協, 71, (4) 301 (1976)
- 21) 原 昌道, 梅津正敏, 戸塚 昭, 飯村 穰 : 醸協, 74, (9) 629 (1976)
- 22) 八幡紀美, 木田建次, 中川 優, 西村賢了, 園田頼和 : 醸協, 88, (9) 701 (1993)
- 23) 渡辺誠衛, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉沢 淑 : 醸協, 83, (11) 757 (1988)
- 24) 日本工業標準調査会 : JIS - K 7001-1990. (1990)
- 25) M. SOMOGYI : *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)
- 26) 国税庁所定分析法注解 : 第四回改正, 西谷尚道 (監修), 醸日本醸造協会, 222 (1990)
- 27) M. SAMI, M. IKEDA, S. YABUCHI : *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 212 (1994)
- 28) R. FIELDS : *Methods in Enzymol.*, 25, 464 (1972)
- 29) K. KIDA, D. GENT, J. C. SLAUGHTER : *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 284 (1993)
- 30) Z. Y. LING, S. MORIMURA, K. KIDA : *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 204 (1995)
- 31) 若井芳則 : 醸協, 83, (9) 579 (1988)