

久留米椿「正義」からの酵母の分離と焼酎醸造

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	満生,慎二 古屋,和樹 山崎,努 中山,俊一 大場,孝宏 末永,光 小田,淳史 中島,康夫
発行元	日本醸造協会
巻/号	107巻10号
掲載ページ	p. 775-781
発行年月	2012年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



久留米椿「正義」からの酵母の分離と焼酎醸造

満生慎二¹・古屋和樹¹・山崎 努¹・中山俊一²・大場孝宏³・末永 光³・小田淳史⁴・中島康夫⁴

(¹九州産業大学, ²東京農業大学, ³福岡県工業技術センター生物食品研究所, ⁴福德長酒類(株))

平成 24 年 2 月 15 日受理

Isolation of yeast from “*Kurume Tsubaki MASAYOSHI*” and application for *shochu* making on an industrial scale

¹Shinji MITSUIKI, ¹Kazuki FURUYA, ¹Tsutomu YAMAZAKI, ²Shunichi NAKAYAMA, ³Takahiro OBA, ³Hikaru SUENAGA, ⁴Atsushi ODA, ⁴Yasuo NAKAJIMA

(¹Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kyushu Sangyo University, 2-3-1, Mastukadai, Higashi-ku, Fukuoka, 813-8503, Japan

²Department of Fermentation Sciences, Faculty of Applied Biosciences, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

³Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, Aikawa-machi 1465-5, Kurume, Fukuoka, 839-0861, Japan

⁴Fukutokucho Shurui Co., Ltd. Arakimachi 1200-1, Kurume, Fukuoka, 830-0063, Japan)

Twenty-six yeast strains were isolated from about 2,000 flowers of “*Kurume Tsubaki MASAYOSHI*” by using a YPD liquid medium (pH 4.0, 5% ethanol concentration). Strain Q 20 was selected for its sugar fermentation ability and productivities of ethyl caproate, isoamyl alcohol productivity, diacetyl, and acetoin. Strain Q 20 was identified as *Saccharomyces cerevisiae* by genetic analysis of the 26S rRNA D1/D2 domain. A celrenin-resistant mutant Q 20-19 derived from Q 20 by UV irradiation was finally selected for rice *shochu* making. The prototype rice *shochu* made with the Q 20-19 strain had a strong *ginjyo* aroma and a mild taste.

Key words : 久留米椿「正義」、花酵母、米焼酎

緒言

近年、若年層の酒離れ、健康志向の高まりなどの要因もあり酒類消費量の低迷が続いている。酒類消費の喚起を促すことを目的として、産官学が一体となって各地で様々な取り組みがなされており、我が福岡県においても、若年層や女性向けの低アルコール向け清酒用の清酒酵母の開発などが行われている¹⁾。このような背景の下、地域から分離した酵母を用いた酒類の開発による活性化の試みが盛んにおこなわれている。特に桜、ナadeshiko、バラ、など花から分離された酵母を

用いた酒類の実用化は、そのイメージの良さも手伝って多くの事例が報告されている²⁻⁷⁾。

本報では平成 22 年 3 月に久留米市で開催された「国際ツバキ会議・全国椿サミット」の盛り上げ事業の一環として、久留米椿を代表する品種「正義」より、醸造適性に優れた酵母の分離と同定を行い、選抜酵母を用いた米焼酎の実用化について検討を行った。

実験方法

1. 使用菌株

清酒用きょうかい酵母 7 号・9 号 (K7, K9), 焼酎

用鹿兒島2号酵母(K2)を使用した。

2. 培地の調製

酵母の培養分離にはYPD培地(1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%グルコース)を用いた。また, 平板培地は各液体培地に寒天を2%加えて調製した。麴エキス培地は, 黄麴米に水道水を加えて55°で4時間糖化を行い, ろ過後にポーメ11となるように水道水を加えて調製した。

3. 酵母のスクリーニング

福岡県久留米市内の久留米椿「正義」の木から無菌的に採取した花を2, 3個ずつ, YPD液体培地(pH 4.0) 100 mlに投入し, 20°Cで約2週間静置培養した。なお, 培地は必要に応じて塩酸にてpH 4.0に調整した。培養液の100 µlを, pH 4.0およびアルコール濃度5% (v/v) に調製したYPD液体培地10 mlに添加し, 25°Cで7日間静置培養した。培地の混濁および気泡の発生が認められ, 産膜の形成が認められない培養液を適宜希釈した後, pH 4.0およびアルコール濃度5% (v/v) に調製したYPD平板培地に塗布し, 25°Cで7日間培養した。肉眼および顕微鏡観察により, 酵母を選抜した。

ポーメ8に調製した麴エキス培地30 mlに, 選抜酵母のコロニーを1白金耳接種し, 30°Cで3日間静置培養した。培養液中のグルコースおよびエタノールの分析を, 高速液体クロマトグラフィー(TOSOH 8010, 使用カラム:Aminex HPX-87C, 検出器:RI)を用いて行い, 高い発酵能を示した株を選抜した。

4. 焼酎小仕込み試験

Table 1の仕込み配合により, 米焼酎の小仕込み試験を行った。市販のミネラルウォーター600 mlに酵母を植菌し, 一晚培養した麴エキス培地10 mlを添加した後, 麴米400 gを加えて22°Cで5日間発酵させた。次に市販のミネラルウォーター1,400 mlと蒸米

Table 1 Proportion of raw materials for small scale *shochu*-making.

	Seed mash	Main mash
Rice-koji	400 g	-
Rice	-	800 g
Water	600 ml	1400 ml

800 gを加えて, 22°Cで10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。

二次もろみ日数10日目を1Lガラス製蒸留器に張り込み, 蒸留缶内圧力80 mmHg, 浴槽温度75°Cの条件で減圧蒸留を行い, 留液アルコール濃度が44%となる時点で蒸留を終了した。

5. 成分分析方法

焼酎の一般分析は, 国税庁所定分析法注解⁸⁾に基づき行った。有機酸量は高速液体クロマトグラフィー(島津有機酸分析システム, 使用カラム:Shim-pack SCR-102H)を用いた電気伝導度法により行った。焼酎の香気成分の測定は, ガスクロマトグラフィー(Hewlett Packard 5890 Series II, 使用カラム:TC-WAX, GL Sciences)を用いたヘッドスペース法・内部標準法にて行った。内部標準液は, カプロン酸メチル(100 ppm)とn-アミルアルコール(2,000 ppm)の混合溶液を用いて, 試料0.9 mlに内部標準液0.1 mlを添加して測定を行った。アセトインおよびジアセチル(ダイアセチル香)の定量は, ガスクロマトグラフィー/質量分析(Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, 使用カラム:TC-WAX, GL Sciences)を用いた直接注入法・内部標準法にて行った。内部標準液としては, 2-ペンタノン(4 ppm)溶液を用いて, 試料0.5 ml, 内部標準液0.5 mlおよび酢酸エチル0.5 mlの混合溶液を2分間振とう抽出した後, 測定を行った。

6. 官能評価

試作焼酎のアルコール濃度を25%に調整後, 対照サンプルとの差を5名のパネラーで評価した。

7. 酵母の同定

糖資化性テスト(Api 20 C AUX, bioMerieux社製), TTC染色, および26S rRNA遺伝子のD1/D2塩基配列解析を行った⁹⁾。26S rRNA遺伝子のD1/D2領域の増幅条件をTable 2に示す。NL1-NL4¹⁰⁾プライマーペアを用いたコロニーPCR法にて増幅したDNAを, PCR Purification Kit (MinElute, QIAGEN社製)を用いて精製を行い, 塩基配列の解析をオペロン バイオテクノロジー(株)に委託し, BLAST検索を行った。

Table 2 Colony PCR condition

(a) Composition of reaction mixture	
2 × PCR Buffer for KOD FX	25 μ l
dNTPs (2 mM)	10 μ l
Primer NL-1 (100 pmol)	1.5 μ l
Primer NL-4 (100 pmol)	1.5 μ l
Zymolyase treated cell solution	2 μ l
SQW	9 μ l
KOD FX (TOYOBO)	1 μ l

(b) PCR condition	
95°C for 5 min	} 35 cycles
95°C for 1 min	
55°C for 1 min	
72°C for 1 min	
72°C for 10 min	

8. カプロン酸エチル高生成株の育種

セルレニン耐性株の育種を Ichikawa らの方法¹¹⁾に準じて行った。すなわち、紫外線を用いて供試菌株を変異処理した後、25 μ M のセルレニンを含む YPD 平板培地に処理菌体を塗布し、生じたコロニーより耐性酵母を分離した。

9. 実用化試験

総米 12 kg (麴米 4 kg, 掛米 8 kg), 汲水歩合 167% で仕込み試験を 22°C の温度監視下で行った。発酵終了後のもろみは、蒸留缶内圧力 80 mmHg, 浴槽温度 75°C の条件で減圧蒸留した。蒸留液を濾過した後、約 1 ヶ月常温で保存し、官能評価を実施した。

実験結果と考察

1. 椿からの酵母のスクリーニング

久留米椿「正義」の約 2,000 の花を分離源とし、耐酸性、アルコール耐性を指標として集積培養を行った。増殖能および顕著な気泡の発生が認められた培養液を平板培地 (pH 4.0, エタノール 5% (v/v)) に塗布して、25°C で 7 日間培養した。その結果、酵母の形態と判断したコロニーを 55 株単離した。単離した 55 株については、サッカロースおよびマルトース発酵能、産膜非形成を指標として 26 株を選抜した。

選抜した 26 株の麴エキス培地での糖・エタノール含量を Fig. 1 に示す。エタノール生成量は、K7 同等の株 (約 6%) からほとんどアルコールを生成してい

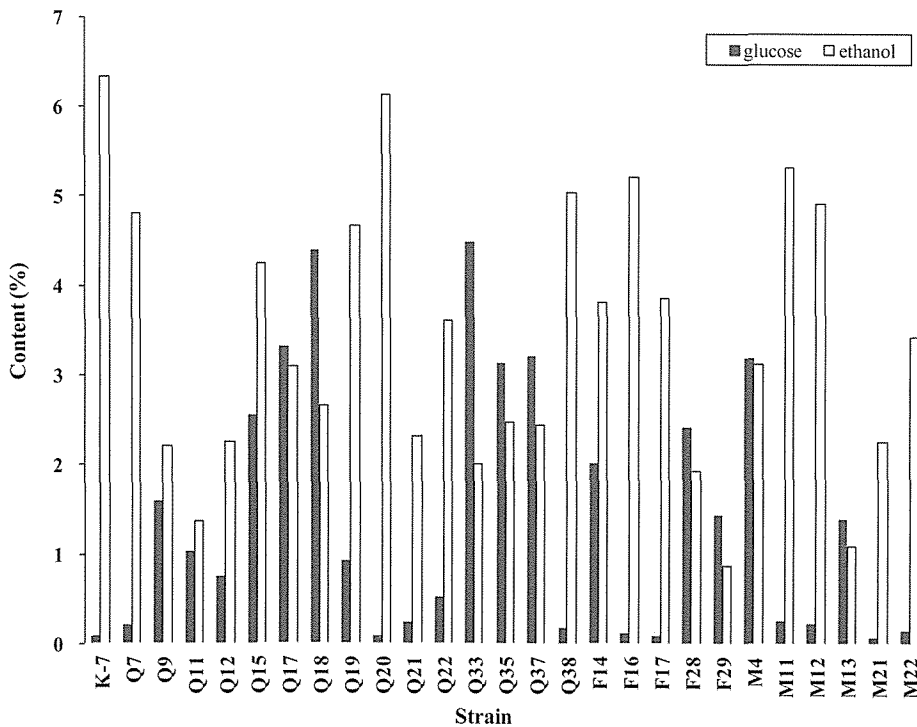


Fig. 1 Ethanol and glucose content in a koji extract medium.

ない株まで様々であった。また、麴エキス培地中の有機酸量測定結果を Table 3 に示す。椿酵母はリンゴ酸とコハク酸が少なく、ピルビン酸と酢酸が多い傾向を示した。エタノール生成量および残糖量の分析結果より Q 20 株および F 16 株を選抜し、以降の実験に用いた。

2. 小仕込み試験

総米 1,200 g の小仕込み試験の結果を Fig. 2 に示す。選抜酵母の発酵経過は K2 と比べて一次もろみの立ち

上りが遅れたものの、二次もろみでは明瞭な差は確認できなかった。最終的なもろみ重量減少量にも大差が無く、アルコール生成量も遜色ないと判断した。

もろみ中の有機酸分析値結果を Table 4 に示す。分離酵母の有機酸組成は K2 と大きく異なっており、特にリンゴ酸についてはその差が顕著であった。

蒸留後の香氣成分の分析を行ったところ、吟醸香の一種であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルは、K2 よりも高い生産能を示した (Table 4)。また、官能評価においても、十分実用化に耐えうるレベルであ

Table 3 Organic acid content in a *koji* extract medium.

strain	phosphoric acid (ppm)	citric acid (ppm)	pyruvic acid (ppm)	malic acid (ppm)	succinic acid (ppm)	lactic acid (ppm)	acetic acid (ppm)	pyroglutamic acid (ppm)
K7	117.1	119.1	97.2	364.7	396.2	87.1	315.5	109.9
Q7	50.2	74.9	344.5	74.7	215.4	112.9	409.4	85.9
Q19	35.4	67.2	377.2	64.8	162.8	70.3	409.4	78.4
Q20	58.8	75.3	395.1	72.2	151.0	72.0	479.7	88.5
Q38	70.4	80.1	388.5	76.7	180.3	80.3	507.8	100.9
F16	95.2	97.8	439.5	104.3	214.5	105.5	583.0	113.8
M11	80.5	93.7	494.2	86.9	221.0	93.8	563.1	117.9
M12	58.7	73.7	382.6	68.6	175.7	73.3	462.9	89.8

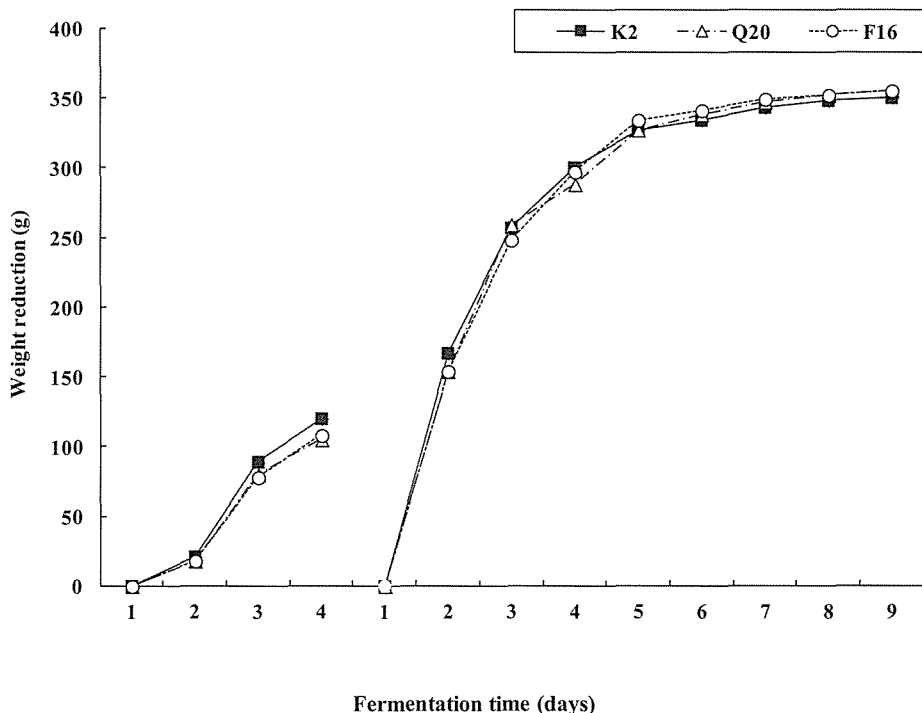


Fig. 2 Fermentation curves in a small scale rice *shochu*.

Table 4 Organic acid and aroma content in a small scale rice *shochu*.

strain	phosphoric acid (ppm)	citric acid (ppm)	pyruvic acid (ppm)	malic acid (ppm)	succinic acid (ppm)	lactic acid (ppm)	acetic acid (ppm)	pyroglutamic acid (ppm)	phosphoric acid (ppm)	citric acid (ppm)
K2	667	3004	ND	229	744	633	169	154	5.9	1.3
Q20	667	3066	ND	533	933	865	79	155	10.6	4.4
F16	670	3019	ND	434	950	864	108	151	11.5	4.0

ると判断した。

オフフレーバの代表とされるダイアセチルおよびアセトインの分析を行った結果、Q20株はダイアセチル濃度が検出限界（0.2 ppm）以下かつアセトイン濃度がK2の1.2倍であったが、F16株はダイアセチル濃度が検出限界以上かつアセトイン濃度がK2の1.5倍であったため、Q20株を最終選抜した。

3. 酵母の同定

選抜したQ20株の酵母についてApiキットを用いた糖資化能を評価したところ、グルコース、マルトース、ガラクトース等の糖資化性を示したが、キシロース、セロビオース、ラクトース等の糖資化能を示さなかった。選抜株のTTC染色を行った結果、全てのコロニーが野生酵母同様に桃色を呈した。26S rRNA 遺

伝子のD1/D2領域を増幅するPCRプライマーペアであるNL-1とNL-4を用いたコロニーPCRにより増幅したDNA断片の塩基配列を基にBLAST検索を行った結果、100%の相同性を示したため、本株を*Saccharomyces cerevisiae*と同定した。

4. セルレニン耐性酵母の分離と選抜

小仕込み試験により選抜されたQ20株を紫外線処理した結果、セルレニン耐性を有する39株を取得できた。これらの酵母について麴エキス培地（30 ml）を使用して、カプロン酸エチル生産能を解析した結果、カプロン酸エチル生成量が2.4 ppm以上であった11株を選抜した（Fig. 3）。この11株について2回に分けて小仕込み試験を行い、もろみ分析および蒸留後の官能評価を行った結果、香味のバランスが良

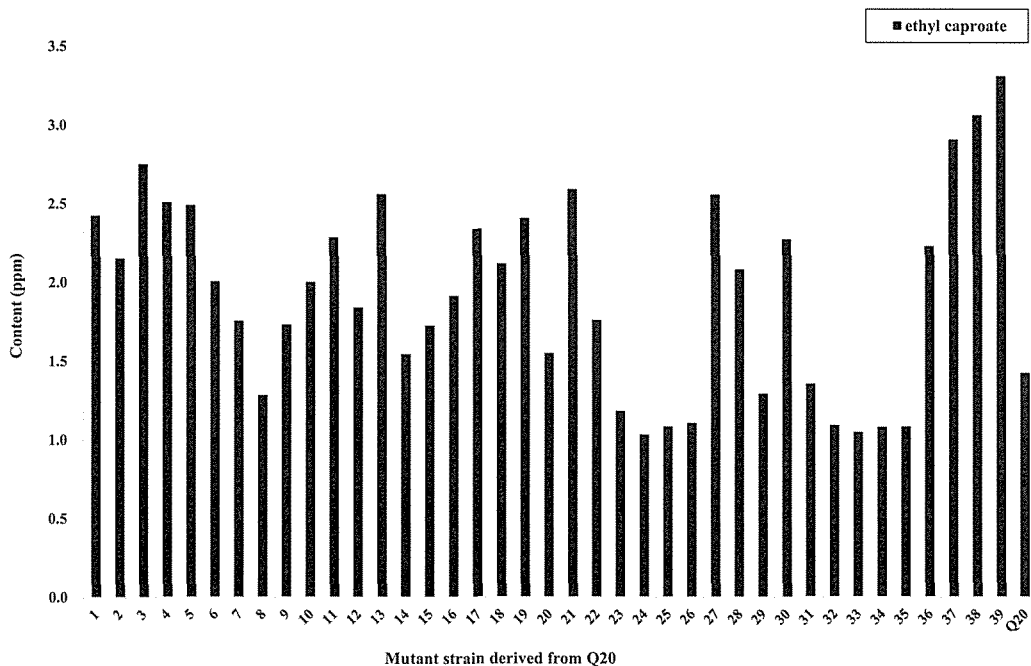


Fig. 3 Ethyl caproate content in a *koji* extract medium.

Table 5a Ethanol and organic acid content in a small scale rice *shochu*.

strain	ethanol (%)	phosphoric acid (ppm)	citric acid (ppm)	pyruvic acid (ppm)	malic acid (ppm)	succinic acid (ppm)	lactic acid (ppm)	acetic acid (ppm)	pyroglutamic acid (ppm)
K9	16.7	545	2407	ND	179	712	656	141	136
Q20	16.6	508	2511	ND	471	961	1060	61	147
Q20-3	16.7	493	2633	ND	505	886	962	47	108
Q20-4	16.6	503	2664	ND	527	910	952	59	144
Q20-5	16.6	504	2711	ND	534	940	867	62	145
Q20-13	16.4	504	2639	ND	531	912	980	59	143
Q20-19	16.6	506	2702	ND	520	902	882	44	90

Table 5b Ethanol and organic acid content in a small scale rice *shochu*.

strain	ethanol (%)	phosphoric acid (ppm)	citric acid (ppm)	pyruvic acid (ppm)	malic acid (ppm)	succinic acid (ppm)	lactic acid (ppm)	acetic acid (ppm)	pyroglutamic acid (ppm)
K9	16.7	433	2387	ND	190	673	631	164	102
Q20	16.6	396	2502	ND	490	983	993	62	163
Q20-21	16.7	385	2623	ND	565	948	960	56	142
Q20-27	16.4	371	2621	ND	554	972	891	46	95
Q20-37	16.5	366	2719	ND	574	1034	806	53	138
Q20-38	16.5	384	2567	ND	554	928	1009	51	128
Q20-39	16.6	358	2640	ND	555	955	915	57	131

好であり、果実様の華やかな香りを特徴とするカプロン酸エチルを高生産する Q 20-19 株を最終選抜した (Table 5a, 5b)。

5. 実用化試験

総米 12 kg の実用化試験を行った。目視による観察において、一次・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 18.5% と K2 の 18.5% と差は無かった。5 名のパネラーにより官能試験を行った結果、K2 と Q 20-19 株で製造した米焼酎は、パネラー全員が識別でき、「吟醸香が高く、まろやかな口当たり」の酒質であった。

本研究により、久留米椿「正義」から焼酎醸造への適応可能な *Saccharomyces cerevisiae* を Q 20-19 株を分離・育種することができた。本菌株を「久留米椿正義酵母」と呼称することにした。

要約

久留米椿「正義」からの酵母の分離および同定、さらにはセルレニン耐性株の選抜により得られた酵母を用いて米焼酎の実用化検討を試みた。

耐酸性、耐エタノール性等の特性を用いて椿生息酵

母の集積培養を試みた。分離した酵母の醸造適性および官能評価から Q 20 株を最終選抜した。この株の TTC 染色および 26S rDNA の D1/D2 塩基配列解析により *Saccharomyces cerevisiae* の野生株であると推定した。セルレニン耐性能を付与して得られた Q 20-19 株は親株 (Q 20 株) の 2 倍程度のカプロン酸高生産能を有しており、ダイアセチル香の生産能も少ないことから、本株を用いた実用化検討を行った。酒質は「吟醸香が高く、まろやかな口当たり」であることから、この酵母を用いた、米焼酎の商品化を行うことにした。

参考文献

- 1) 大場孝宏, 野見山修治, 上田京子, 黒田理恵子, 鈴木正柯: 醸協, **99**, 878-881 (2004)
- 2) 柏木亨: 醸協, **97**, 2-6 (2002)
- 3) 高峯和則, 大山修一, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 鮫島吉廣: 醸協, **105**, 546-555 (2010)
- 4) 岩口伸一, 鈴木孝仁, 松澤一幸, 清水浩美, 大橋正孝, 都築正男, 藤野千代: 生物工学, **87**, 356-357 (2009)
- 5) 佐々木隆浩, 岡本竹己: 栃木県産業技術センター研究報告, **6**, 29-31 (2009)

- 6) 栗林 喬：新潟県醸造試験場報告, 2008, 15 (2008)
 - 7) 木下(小室)友香理, 門倉利守, 数岡孝幸, 穂坂 賢, 中田久保：東京農大農学集報, 53, 100-106 (2008)
 - 8) 注解研修委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
 - 9) C.P. Kurutzman and C. j. Robnett : *Antonie van Leewenhoek*, 73, 331-371 (1998)
 - 10) 関口幸恵, 田中みち子, 高橋 淳, 浅野行蔵：醸協, 103, 125-134 (2008)
 - 11) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, S. Imayasu, *Agric. Biol. Chem*, 55, 2153-2154 (1991)
-