

ジャワ島の「酎」醪から分離した酵母

小崎道雄, 季 福臨, Kapti Rahayu KUSWANTO, 飯野久和

On the Yeasts Isolated from "Chu" Moromi- mash in Java Island

Michio KOZAKI・LEE fwu Ling・Kapti Rahaya KUSWANTO and Hisakazu IINO

"Chu" is a traditional Indonesian distilled beverage like Jamaica rum style, especially made from molasses. The fermentation is carried out by natural microorganism and is completely in about 3~5 days, after fermentation Moromi mash is distilled by traditional distiller.

In this paper the microflora in "Chu" moromi mash and alcohol producing yeast have been investigated. A Genus *Shizosaccharomyces* was only employed to the fermentation, therefore this Genus was found to be the dominant yeast during the Moromi fermentation.

7 strains purified from 2 "Chu" factories in Wonogiri central Java, and tested by morphological and physiological methods. All isolates were identified to *Shizosaccharomyces pombe* as Rum fermentation in Jamaica.

熱帯圏のジャワ島には、糖蜜から発酵・蒸留して製造される「酎」工場が幾つかある。とくに中部ジャワは製糖工場が集中しているから、酎工場も多い。しかし、インドネシア国は宗教上酒造は好まれないから、ほとんど農家レベルで蒸留されその製造高は不明である。

その製造法も基本的にはジャマイカのラムと類似し、50~60%の糖分を含む糖蜜を加熱殺菌後、水を加えて約12%程度の糖量にし、pHを5.5~6.0に調整後、醪発酵用のドラム罐（写真1）に移す。ドラム罐は軽く洗うだけで、前の発酵液が残液のまま付着しているから、培養酵母を摂取する必要はない。残存酵母で次の醪発酵は十分に進行する。この操作の繰り返しであるから、酵母は自然に淘汰され優良な株に選択される。7日間位醪発酵を行い、直ちに蒸留するが、蒸留器は写真2のように全く幼稚で素朴な装置のランビキ型である¹⁾²⁾。ジャマイカのラムは自然発酵が主体で、関与酵母は*Schizosaccharomyces pombe*である³⁾。本酵母は最初ボンベ酒や椰子酒から分離されたと言われる⁴⁾。

ジャワ島の酎もラムと同様に糖蜜を原料として蒸留した酒であり、また長期間自然発酵を繰り返しているから、その醪醸造の主要発酵微生物はラムのように*Shizosaccharomycse*であるか、または全く異なる酎醪特有の酵母

であるかを確認するため本研究を行った。

実験方法

酎醪試料：インドネシア国の中部ジャワ、ウオノギリ町の農家レベル酎製造工場の糖蜜発酵醪ドラム罐から、無菌スポイトを用い試料管に約5ml醪液を採り、出来る限り素早くガジャマダ大学食品微生物学研究室に持ち帰った。

微生物分離法：試料は直ちに検鏡し麦芽寒天培地（麦芽3g, 寒天15g, 水1000ml）およびグルコース ペプトン イーストエキス寒天培地（グルコース10g, ペプトン5g, イーストエキス3g; GYP寒天培地）を用い常法に従い平板培養により酵母および乳酸菌の分離を試みた。

酵母の同定：“The Yeasts, a taxonomic study”⁵⁾および“Yeasts: characteristics and identification”⁶⁾の同定項目にしたがい実施し、その結果を“The Yeasts”⁵⁾および“Yeasts Identification PC Program”⁷⁾によって同定した。

形態学的性質：栄養細胞における細胞形態、大きさ、増殖形式および皮膜形式は、YM培地で25℃3日間培養後観察した。

偽菌糸および菌糸はコーンミル寒天培地を用いたDal-

man plateにより25°C 7日間培養後観察した。子嚢胞子形成はYM培地で2日間培養し、菌体をV8ジュース寒天培地、コーンミル寒天培地で15~25°C 4週間培養した。数日毎に胞子形成の有無と形状、胞子数を検鏡により調べた。

糖発酵性：グルコース、ガラクトース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラクトース、セロビオース、ラフィノース、イヌリンおよび可溶性澱粉の10種について発酵性を調べた。すなわち、BTB(bromothymol blue)を含むイーストエキスを0.45%、ペプトン0.75%の培地(pH5.0)を2.0mlずつ分注した試験管に6%濃度の糖液(ラフィノースは12%)を1ml注加し、ダーラム管を内挿して検定用培地とした。

炭素源の資化性：yeast nitrogen base (Difco社) 0.67%に表1に示した24種類の炭素源を0.5%(ラフィノースは1%)の割合で添加した培地を使用した。

YM培地で2日間の培養菌体懸濁液を0.1mlずつ接種し、25°Cで2から4週間培養して生育状態を観察した。

窒素源の資化性：yeast carbon base (Difco社) 1.17%に表2に示した4種類の窒素源を“The Yeasts”³⁾に記載された濃度で添加し、供試酵母の菌体懸濁液を接種後、25°C 7日間培養観察した。生育した菌体懸濁液を別に用意した同組成の培地に接種し、25°C 3週間培養し生育状態を観察した。

その他の諸性質：ビタミン欠培地、高濃度糖培地での生育、37°Cおよび40°Cにおける生育、cycloheximide耐性およびでんぷん試験は“The Yeasts”³⁾に従い検討した。

結果および考察

1. 醗中の酵母生菌数

中部ジャワ、ウオノギリ町の2工場から、数時間ごとに試料を採取し、総菌数を測定しその結果を表3に示した。両工場の糖蜜醗における酵母数は、A工場の場合2日後 10^7 CFU/ml醗であったが、B工場では14時間後既に 10^8 CFU/ml醗とA工場の10倍の酵母数であった。おそらくドラム罐の洗浄および種として発酵終了後の醗を1/30程度、種として加えているからであろう。A工場ではドラム罐の洗浄を適度にし、前の醗の残存をはかっているようであった。また、両工場の醗はともに3日間で十分発酵を終了し、約5~6%アルコール濃度の醗を得ていた。発酵終了醗は直ちに蒸留し数日間から数週間熟成後製品として販売される。

また、醗からの試料を検鏡する限りでは細菌はきわめて少なく酵母のみであり、その酵母も分裂増殖型であって、出芽形態の酵母は全くみられなかった。ココ椰子の多い土地で、糖蜜を原料とするからであろう。

2. 分裂酵母の形態学的諸性質

2工場の醗から代表株7株を分離、数回の平板培養により純化した。表4のように細胞形は楕円もしくは円形であったが、多くはやや細長い楕円である。大きさはほぼ一定し、 $4\sim 7\times 5\sim 12\mu\text{m}$ とやや大型であった。とくに増殖形態は分裂であって何れの供試株も出芽法での増殖は観察できなかった(写真3)。また、糸状形態もとらず全てが酵母型であり、子嚢胞子を形成しその形は球形である(写真4)。しかし、18-1、21-2の両株では子嚢胞子

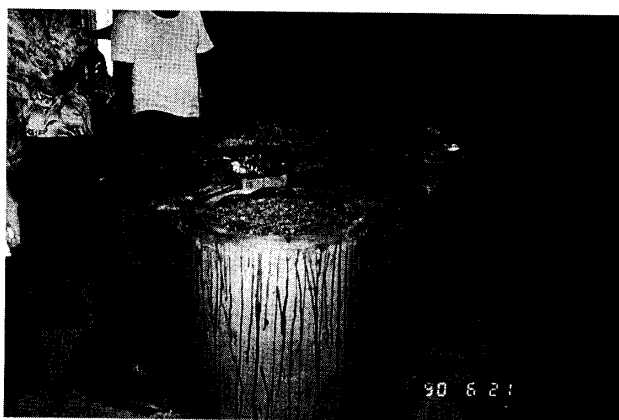


Photo 1 Moromi fermentation of Chu factory

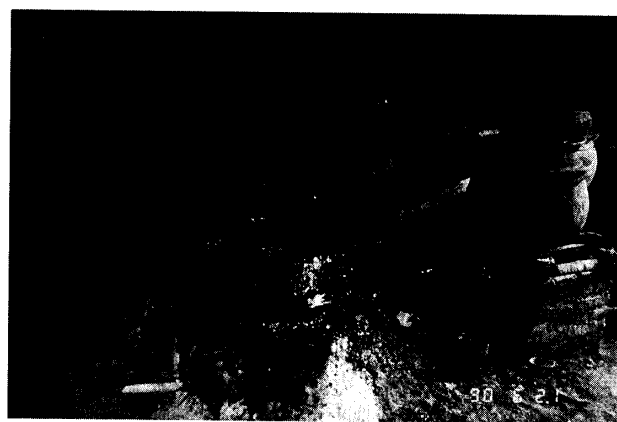


Photo 2 Primitive distillation of Chu factory

Table 1. Fermentation and assimilation of carbon sources of yeasts isolated from Chu moromi mash

characteristics	Isolated strains						
	18-1	20-1	21-1	21-2	21-3	22-1	23-1
fermentation of carbon sources							
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose	-	-	-	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-
cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
raffinose	+	+	+	+	+	+	+
inulin	+	+	+	+	+	+	+
starch	-	-	-	-	-	-	-
assimilation of carbon sources							
D-galactose	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	-	-	-	-	-	-	-
cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
salicin	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-
raffinose	+	+	+	+	+	+	+
inulin	+	+	+	+	+	+	+
starch	-	-	-	-	-	-	-
glycerol	-	-	-	-	-	-	-
erythritol	-	-	-	-	-	-	-
D-glucitol	-	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-
pi-inositol	-	-	-	-	-	-	-
D-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
DL-lactate	-	-	-	-	-	-	-
succinate	-	-	-	-	-	-	-
citrate	-	-	-	-	-	-	-

+ : positive - : negative

Table 2. Physiological characteristics of yeast isolated from Chu mash (2)

characteristics	Isolated Strain						
	18-1	21-1	21-1	21-2	21-3	22-1	23-1
1. Assimilation of nitrogen sauces							
nitrate	—	—	—	—	—	—	—
ethylamine	—	—	—	—	—	—	—
L-lysine	—	—	—	—	—	—	—
Cadaverine	w	w	w	w	w	w	w
2. Growth without vitamins	—	—	—	—	—	—	—
3. Growth at 37°	+	+	+	+	+	+	+
4. Growth at 40°	—	—	—	—	—	—	—
5. 0.01% Cyclo heximide growth	—	—	—	—	—	—	—
6. 50% glucose(w/w) growth	+	+	+	+	+	+	+
7. 60% glucose(w/w) growth	—	—	—	—	—	—	—
8. starch test	—	—	—	—	—	—	—

+ : positive — : negative w : positive weak

Table 3. Yeast cell change and representative isolates during chu fermentation.

factory of fermer level	fermentation(hour)	cell number / 1 ml	representative isolates
A fermer	0	2.0×10^6	18-1
	17	—	—
	14	8.6×10^6	—
	48	7.5×10^7	20-1
B fermer	0	4.2×10^6	21-1, 21-2, 21-3
	7	9.8×10^7	22-1
	14	3.5×10^8	—
	48	8.2×10^8	23-1

Table 4. Morphological characteristics of yeasts isolated from Chu moromi mash in Central Jawa

Strain	Cell Shape	Cell size(um)	Mode of reproduction	mycelia	Shape of Ascospore
18-1	ellipsoidal	$(4-6) \times (5-10)$	fission	—	—
20-1	globose to eleipsoidal	$(4-7) \times (5-12)$	„	—	round
21-1	„	$(4-7) \times (5-12)$	„	—	„
21-2	„	„	„	—	—
21-3	elliposidal	$(4-7) \times (7-12)$	„	—	round
22-1	globose to ellipsoidal	$(4-7) \times (5-12)$	„	—	„
23-1	„	$(4-7) \times (5-12)$	„	—	„

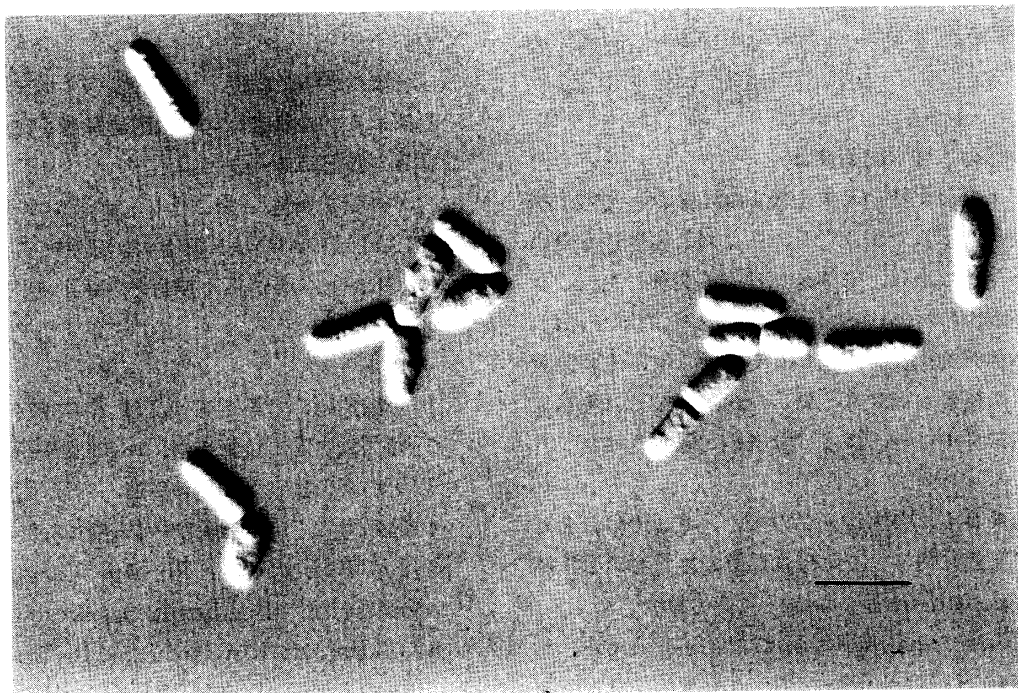


Photo 3 Vegetative cells of Strain No.21-1 on YM-
agar for 4 days at 25°C
bar: 10 nm

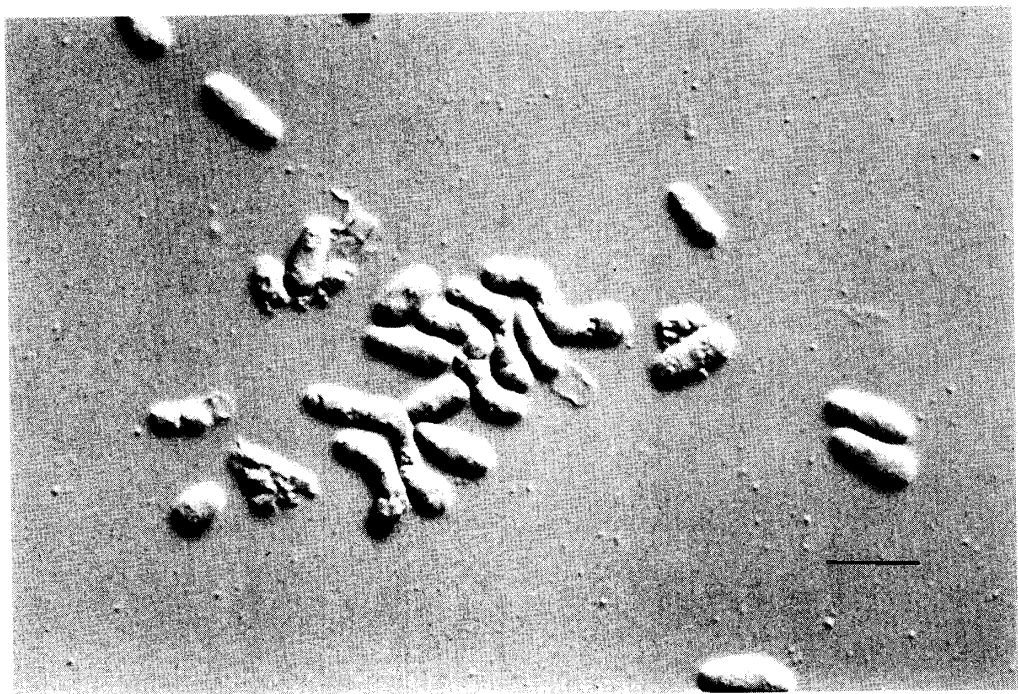


Photo 4 Asci and Ascospores of Strain 21-3 on YM-
agar for 10 days at 25°C
bar : 10nm

形成が認められなかった。したがって、形態学的には7株とも増殖にあたって、細胞はくびれず横断壁が形成され、栄養増殖を行うことから*Schizosaccharomyces*属であると判定した。

3. 分離酵母の生理学的諸性質

糖発酵および資化性の結果を表1に示した。分離7株とも同じ結果を示したが、でんぷんに対し発酵性も資化性もなかった。しかし、イヌリンはよく発酵した。これらの結果から*Schizosaccharomyces pombe*と同定された。また、窒素源の資化性およびビタミン要求性、生育温度などを調べた結果を表2に記載したが、40℃では生育できず、60%のグルコース濃度では増殖が阻止された。

以上の結果から、中部ジャワのウオノギリの町にある酎工場の醪発酵に関与する酵母は類似の性質を示し、結果は*Schizosaccharomyces pombe*と同定された。

現在 *Schizosaccharomyces* 属には *S.japonicus*, *S.malidevorans*, *S.octosporus* および *S.pombe* の4種が認められているが、*S.pombe* 以外の酵母の分離源はブドウ、イチゴなどの果実または酒からである。しかし、*S.pombe* はアラク発酵液、糖蜜、椰子酒などから取得されていて、その生態は他の酵母と異なる。本研究においても、数十

年間友種法を採用した自然発酵の糖蜜発酵醪から *S.pombe* が得られた。これはまた *S.pombe* の特性と考えられる。

今後はさらに中部ジャワの他の工場または東部ジャワ、西部ジャワの農家レベルの酎発酵醪を調べ、この結果の確認の必要があろう。

本研究を実施するに当たり、カジャマダ大学総長MO-CHAMAD ADNAN博士および生物工学部長ZUHEID NOOR博士の心からの援助を感謝する。

文 献

- 1) 小崎道雄：食品と容器，15(2)，1974
- 2) 菅間誠之助：焼酎の話，46-62，技報堂出版 1984
- 3) 野白喜久雄ら：醸造の事典，329，朝倉書店 1988
- 4) 宮路憲二：応用微生物学(実施篇)，370，岩波書店 1942
- 5) N.J.W.Kreger van Rij: The Yeasts, a taxonomic study(3rd. ed.), Elsevier Science Pub., Ams., 1984
- 6) J.A.Barnett, R.W.Payne and D.Yarrow: Yeast Characteristics & Identification, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1983
- 7) J.A.Barnett, R.W.Payne and D.Yarrow: Yeast Identification PC Program, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1987