

## 旧式焼酎の高酸度醪のモデル実験について\*

田邊幾之助・金丸 芳

(応用微生物学研究室)

昭和60年8月10日 受理

### Modelling Experiments of Shôchû-Moromi in Possession of High Acidity

Ikunosuke TANABE and Kaori KANEMARU

(Laboratory of Applied Microbiology)

#### 緒 言

旧式焼酎醸造で一月末から梅雨前にかけての甘藷焼酎の端ざかい期に行われる米麴生白糠仕込および米仕込焼酎の醪でおきる高酸度醪については、その醪中出现するグラム陽性細菌が乳酸菌であることを蛍光抗体法によって証明し<sup>4)</sup>、その消長と高酸度が関係のあることを推定して来た。前報では、とくにこれら旧式焼酎醪中から分離した乳酸菌の生態学的性質を明らかにした<sup>6)</sup>。今回はこれら乳酸菌と焼酎こうぼを組合せてモデル実験を行い、実験室レベルの酸敗をおこすことによってこの推定を確かなものとするを意図して実験をおこなった。

#### 材料と方法

##### 1. 使用菌株

こうぼについては酒造組合こうぼおよび球磨焼酎こうぼのそれぞれの単細胞分離株 CP-1 および SH-4 の2株を使用した。乳酸菌については米麴米仕込および生白糠焼酎醪から分離したもの<sup>5)</sup>：*L. sake* 群, 14株；*L. brevis*, 8株；*L. plantarum*, 1株；*L. acidophilus*, 2株；*L. fermentum*, 1株。米麴甘藷仕込焼酎醪から分離したもの<sup>2,7,8)</sup>：*L. sake* 群, 2株；*L. brevis*, 7株；*L. xylosus*, 2株；*L. fermentum*, 1株；*L. casei*, 6株；*L. acidophilus*, 4株を使用した。

##### 2. 混合培養系 I の調製

まず製麴について、元石 50g の米（市販のもの）を1晩水に浸漬した後、1時間水切りし、300ml 三角フラスコに入れてオートクレーブ（121°C 15分）で滅菌した。これに白麴菌孢子（*Aspergillus awamori* var. *kawachii* Kitahara の単胞子分離株 Wk-7 を予め三

角フラスコで製麴したものを種麴とした) を米 1kg に対して種麴 2g の割合で接種し、30°C 48時間培養した (Photo 1)。次に麴に乳酸菌用汲水を 60ml 加え、

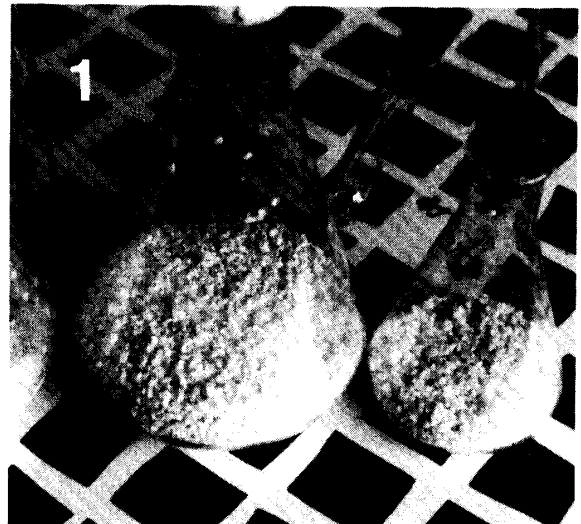


Photo 1. Koji-making in Erlenmeyer flasks, using the white koji-mold, *Aspergillus awamori* var. *kawachii*.

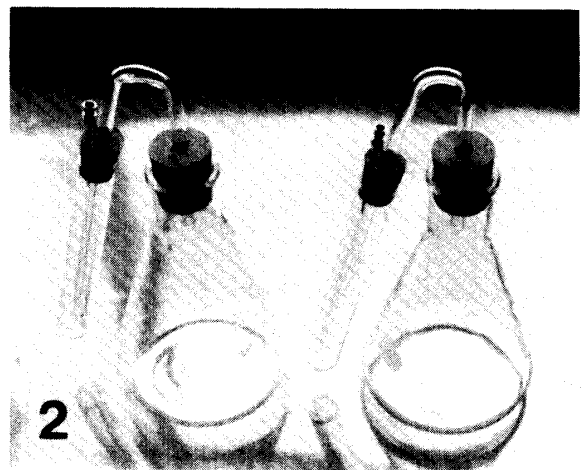


Photo 2. Fermentation flasks fitted with Meissel's stopper.

\* この研究は昭和58年度日農化西日本支部大会（広島女子大学、広島市、昭和58年10月15日）で講演した。講演要旨集 p. 29.

別途予め調製したこうぼ、乳酸菌を接種したのち綿栓を Meissel 栓 (Photo 2) にとりかえ 24°C で培養した (Table 1). 2週間 CO<sub>2</sub> による減量を秤量し、培養終

Table 1. Mixed culture I: preparation and inoculation

Mixed culture	Inoculation		Addition of alcohol, to get a 5% alcohol culture
	Lactic acid bacteria	Shōchū-yeast	
1	+	+	—
2	+	—	—
3	—	+	—
4, blank I	—	—	—
5, blank II	—	—	+

了後は常法により分析した。なお、対照としてこうぼのみ接種のもの、乳酸菌のみ接種のもの他、こうぼおよび乳酸菌を接種せずアルコール5%加えただけのものも用意した。接種用のこうぼはばれいしょぶどう糖培地で 30°C 3日間振盪培養し、洗浄後 1/4-strength Ringer 液に 10<sup>6</sup> cells/ml となるよう懸濁したものを 1ml 用いた。乳酸菌はトマトジュース培地で 30°C 3日間静置培養したものを、洗浄後 1/4-strength Ringer 液に 10<sup>6</sup> cells/ml となるよう懸濁したものを 1ml 用いた (Table 2).

### 3. 混合培養系 II の調製

乳酸菌とこうぼ菌数比と温度条件が結果に及ぼす影響を検討するためトマトジュース・クエン酸培地で 30°C, *L. sake*, F-a-1 は 2日間, *L. brevis*, G-3e-2 と *L. brevis*, B-2a-2 は 5日間静置培養、こうぼは同じく 2日間振盪培養したものを洗浄のち、1/4 strength Ringer 液にそれぞれ 10<sup>9</sup> cells/ml, 10<sup>8</sup> cells/ml となるよう懸濁したものを接種した (Table 3). 混合培養系 II は 200ml のトマトジュース・クエン酸培地に Table 3 の割合に接種したものとした。培養温度は 24°C, 32°C および 37°C で、静置培養した。培養 5-7 日後に醪を常法に従って分析した。

### 4. モデル実験

製麹は精米 200g につき先の混合培養系 I の場合と同様に行った。なお、培養温度に関しては 37°C 24時間培養後 30°C で次の 24時間を培養した<sup>3)</sup>。5l のガラス瓶中 (Photo 3) 麴に一度沸騰させて冷した純水を 300ml 加えこうぼを接種した (一次仕込)。培養 5 日間で酒母が出来上がると、これに生白糠 400g, 汲水 1,230ml を加え (二次仕込)、この際乳酸菌を後述のように接種する。2日間培養してさらに生白糠 250g

Table 2. Culture media, used in a series of investigation on mixed cultivation of yeasts and lactic acid bacteria

#### a) Tomato juice medium (Tj-medium)

Beef extract	3	g
Yeast extract	2	g
Polypepton	10	g
Glucose	10	g
Tween 80	1	g
Ascorbic acid	1	g
Tomato juice	300	ml
Distilled water	700	ml

pH 6.8

#### b) Potato glucose medium (Pg-medium)

Potato, diced	200	g
Glucose	20	g
Tap water	1	l

pH 7.2

#### c) Koji extract-nutrient medium (Kx-B-medium)

Koji extract (Brix 5°)	1	l
beef extract	3	g
yeast extract	2	g
polypepton	10	g

pH 6.8

#### d) Tomato juice-citrate medium (Ci-medium)

Beef extract	15	g
Yeast extract	5	g
Polypepton	10	g
Glucose	20	g
Sodium citrate	1.5	g
Tomato juice	100	ml
Distilled water	900	ml

pH 6.5

#### e) 1/4 strength-Ringer solution

NaCl	0.9	g
KCl	0.042	g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.048	g
NaHCO <sub>3</sub>	0.02	g
Distilled water	400	ml

Table 3. Mixed culture II: preparation and inoculation

Mixed culture	Inoculation		Inoculation ratio of bacteria to yeast
	Lactic acid bacteria	Shōchū-yeast	
1	10 <sup>10</sup> cells	—	10 : 0
2	10 <sup>10</sup> cells	10 <sup>8</sup> cells	10 : 1
3	10 <sup>9</sup> cells	—	1 : 0
4	10 <sup>9</sup> cells	10 <sup>8</sup> cells	1 : 1
5	—	10 <sup>8</sup> cells	0 : 1
6, blank	—	—	(control)



Photo 3. Modelling experiment on the scale of one thousand-five-hundredth of a general recipe of Shōchū-brewing.

Table 4. Modelling experiments: temperature-controlling

Moromi age Experiment	1-ji Moromi (Shubo)	2-ji Moromi	3-ji Moromi
1	32°C	32°C	32°C
2	32°C	42°C	42°C
3	42°C	32°C	32°C
4	42°C	42°C	42°C

を加え（三次仕込）6日間培養した後分析を行った。温度条件については Table 4 のように通常の焼酎醸造の上限温度 32°C と醸造不能な温度 42°C の組合せとした。なお乳酸菌を二次仕込で接種しないものを対照として、通常の管理温度の 32°C で行った (Fig. 1)。

こうぼは麴汁肉汁培地で 30°C 24時間振盪培養したものを、洗浄後、滅菌蒸留水に懸濁して  $10^8$  cells/ml とし、1ml を接種した。乳酸菌は麴汁肉汁培地で 30°C 72時間静置培養したものを洗浄後、滅菌蒸留水

に懸濁して  $10^9$  cells/ml とし、1ml を接種した。

醪の分析は培養終了後、アルコール、揮発性酸および醪の酸度は国税庁所定分析法注解により<sup>1)</sup>、醪中のクエン酸・L-乳酸および D-乳酸は Boehringer-Mannheim 社の食品分析酵素法によって行った。

### 結果と考察

すでに前報<sup>6)</sup>で乳酸菌の生態学的な性質を明らかにしたが、とくにこの中で高酸度醪に関係するとみられる性質として *L. sake* 群の耐高温性と *L. brevis* の耐アルコール性および耐クエン酸酸度があげられる<sup>5)</sup>。これらの性質がこうぼとの混合培養でどのように高酸度醪をひきおこすことに関係するかは均一系での実験結果どうりにはゆかないこともあるので今回は簡単なモデル実験を含めたこうぼと乳酸菌との混合培養系を設定し、検討した。とくに醸造分析値にあらわれたデータから混合培養系で乳酸菌およびこうぼがどのよ

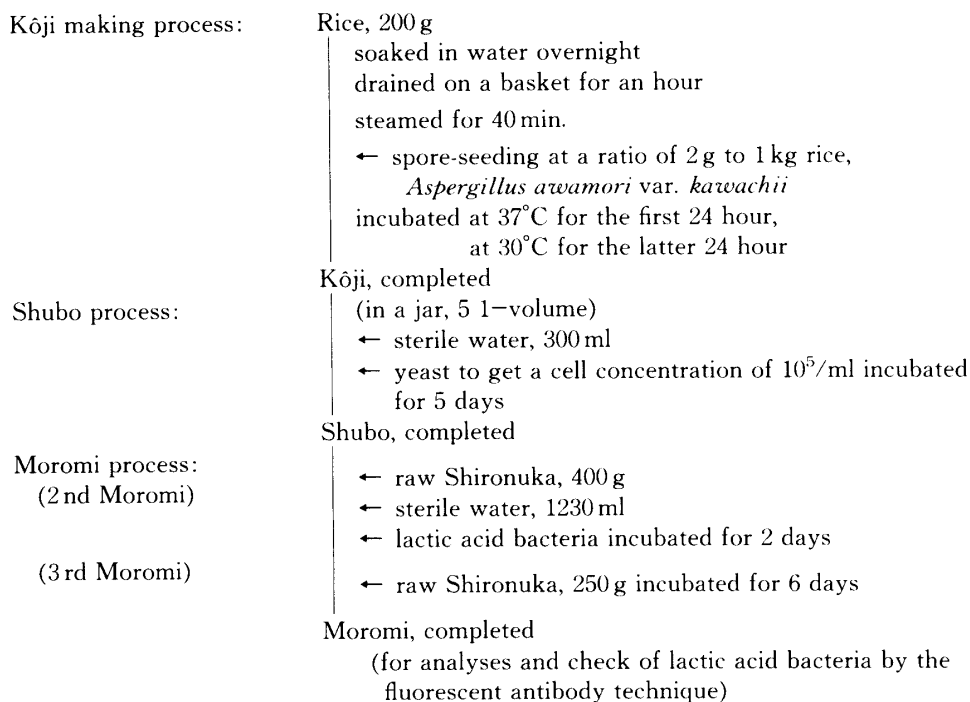


Fig. 1. Preparation of the mixed culture in the modelling experiment.

うな挙動を示し、高酸度醪となるかを推測した。

### 1. 実験条件の検討

Meissel 栓を装着した 300 ml 三角フラスコ (Photo 1) でどのような実験条件の時、実際の焼酎工場タンク内の醪経過を写しとることが出来るかを検討するため、焼酎工場の醸造中の酒母醪を採取し、この装置で炭酸ガス発生にともなう醪の減少を指標として醱酵経過を追跡した。結果は Fig. 2 に示したが、酒母初日の試料を除いて酒母・醪試料全て工場タンクの醪経過とほぼ同じと認められる。培養出発時と終了時のアルコール濃度は図中%で示してある。また、焼酎工場ではタンク内の品温経過は 32°-33°C 以下に保持されるが、小規模の実験系で室温での実験では温度変化が直

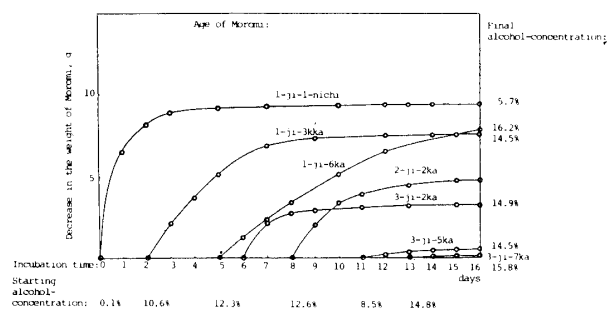


Fig. 2. Time courses of the alcohol fermentation of Moromi samples from Shôchû-Moromi of various ages.

接的なため、恒温室で行うとして、どの温度の恒温室での醪経過がタンク内の醪経過に相当するかを上と同様の装置で検討した。結果は Fig. 3 に示したが、炭酸ガス発生にともなう醪の減少量から判断して 24°C の恒温室で実験を行った場合が実際の醪経過にもっとも近いものと考えられた。以後モデル実験に際し混合培養の実験は Meissel 栓を装着した 300 ml 三角フラスコで 24°C の恒温室で行った。

### 2. 混合培養系 I: 乳酸菌とこうぼの混合培養

次に分離乳酸菌と焼酎こうぼである酒造組合こうぼと球磨焼酎こうぼのそれぞれの単細胞分離株 CP-1 と SH-4 との混合培養実験を行った。結果は Fig. 4 および Fig. 5 に示した。Fig. 4 では CP-1 と分離乳

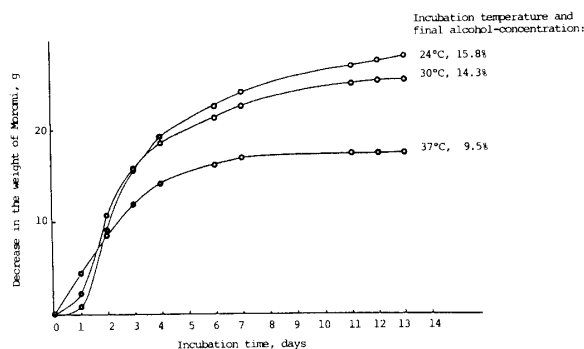


Fig. 3. Time courses of the alcohol fermentation of Moromi samples incubated at various temperatures.

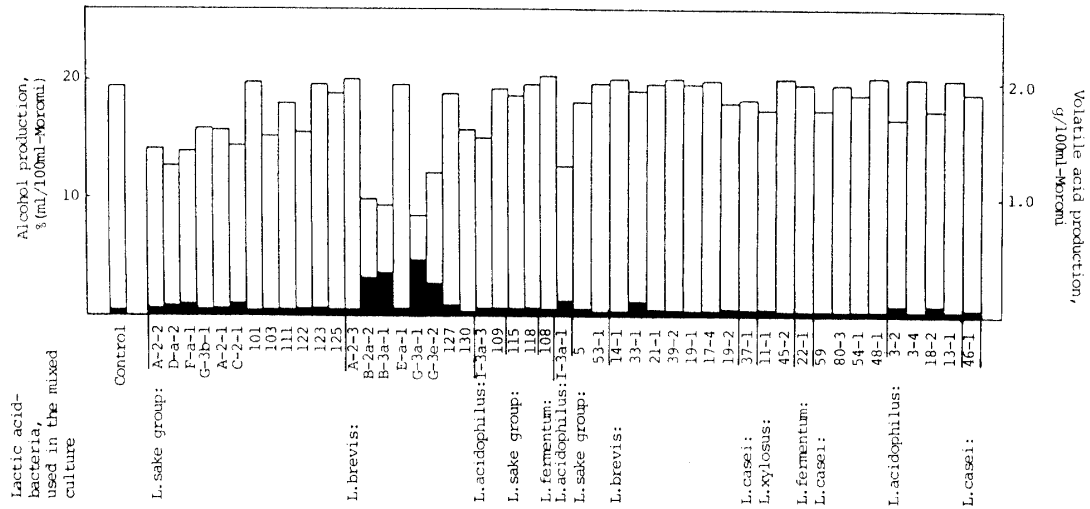


Fig 4. Alcohol and acid productions of the mixed cultures of various rice/Shironuka Shôchû- and sweet potato-Shôchû-lactic acid bacteria and Shôchû yeast CP-1.

Open: alcohol, %. Closed: volatile acid in acidity.

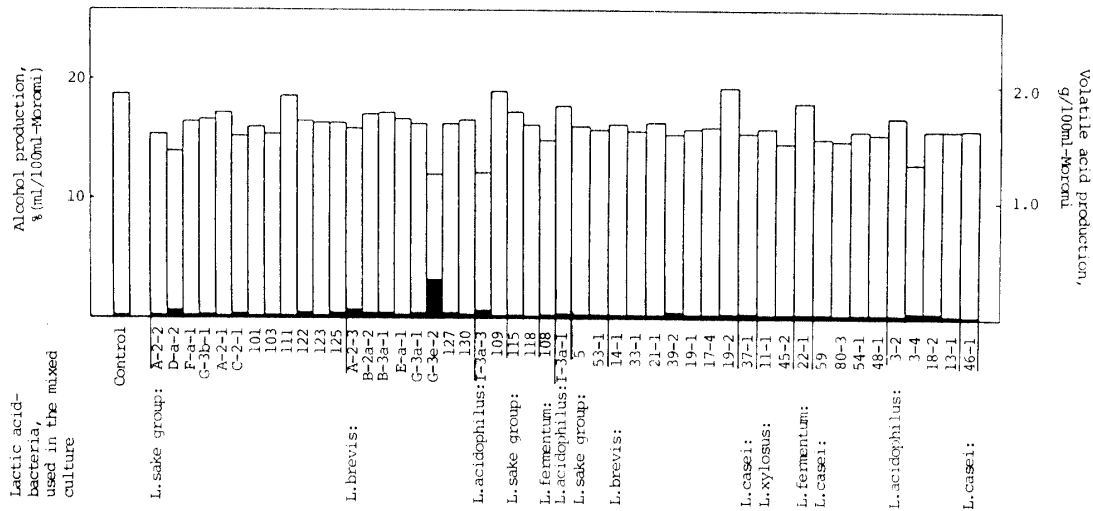


Fig 5. Alcohol and acid productions of the mixed cultures of various rice/Shironuka Shôchû- and sweet potato-Shôchû-lactic acid bacteria and Shôshû yeast SH-4.

Open: alcohol, %. Closed: volatile acid in acidity.

酸菌の組合せであるが対照と比較してアルコール濃度に目立った落ち込みのある組合せが観察できる。とくにその多くの場合に同時に高い揮発性酸量の生成が認められる。とくに *L. brevis* の各菌株とこうぼの混合培養でこの傾向が著しい。全麴醪で乳酸菌のみの培養の場合の揮発性酸産生をみると Table 5 のようになり、混合培養で示された高揮発酸性型醪の結果と似た傾向が得られた。このように白麴菌の全麴醪中では混合培養でも全体として見ると揮発性酸生成型になり、前前報でのタンク醪中での分析結果とも符号する<sup>5)</sup>。これら乳酸菌と SH-4 との混合培養でも Fig. 5 に示

すように CP-1 の場合と同じような傾向が認められた。これから醪中の多量の揮発性酸の検出は醪中に乳酸菌、とくに *L. brevis* の汚染を示す証拠とみなすことができるかもしれない。

### 3. 混合培養系 II: 乳酸菌とこうぼの菌数比および温度条件の高酸度醪化への影響

従来、高酸度醪は米麴米/生白糠仕込で梅雨期前の比較的品温の上昇しやすい時期に発生している。これから高温下、友種やさし酏での醸造をくり返すことによって、工場内ひいては醪中の乳酸菌密度が高くなり易いことと局部的な品温の上昇とが高酸度醪出現に

Table 5. Volatile acid production in the axenic cultures of various lactic acid bacteria

Rice/Shironuka Shôchû strains		Volatile acid mg/100ml	Sweet potato Shôchû strains		Volatile acid mg/100 ml
<i>Lactobacillus sake</i> group	A-2-2	50	<i>Lactobacillus sake</i> group <i>L. brevis</i>  <i>L. fermentum</i> <i>L. xylosum</i>  <i>L. casei</i>  <i>L. acidophilus</i>	5	80
	D-a-2	38		53-1	80
	F-a-1	66		14-1	126
	G-3b-1	50		33-1	36
	A-2-1s	82		21-1	50
	C-2-1	138		39-2	212
	101	118		19-1	194
	103	50		17-4	128
	111	72		19-2	92
	122	82		22-1	548
	123	48		11-1	334
	125	90		45-2	34
	115	100		37-1	70
	118	44		59	88
<i>L. brevis</i>	A-2-3	422	80-3	60	
	B-2a-2	402	54-1	54	
	B-3a-1	210	48-1	54	
	E-a-1	308	46-1	50	
	G-3a-1	110	3-2	92	
	G-3e-2	30	3-4	92	
	127	-	18-2	180	
<i>L. fermentum</i>	130	444	13-1	100	
	108	72			
<i>L. acidophilus</i>	I-3a-3	-			
	I-3a-1	130			
<i>L. plantarum</i>	109	410			

Table 6. Mixed cultures of various Shôchû lactic acid bacteria and Shôchû yeasts, in which multiplications of the yeasts in optical density and total cell counts were followed

Mixed with lactic acid bacteria:	Yeast	temp. °C	Multiplication in optical density (Klett-Summerson)					CP-1/SH-4- axenic	
			(in total counts, $N \times 10^7$ )						
			A-2-2	F-a-1	B-2a-2	E-a-1	G-3a-1	G-3e-2	
CP-1	32°		375	445	330	365	405	390	327
			(3.5)	(4.8)	(7.0)	(5.0)	(6.0)	(5.5)	(10)
		37°	360	410	323	345	345	370	326
SH-4	32°		276	334	85	115	232	200	57
			(1.2)	(0.9)	(0.9)	(1.6)	(1.2)	(1.2)	(1.0)
		37°	375	425	276	355	350	370	244
Lactic acid bacteria- axenic	32°		(4.2)	(2.7)	(3.8)	(4.1)	(2.6)	(3.8)	(8.0)
			337	390	232	264	307	320	185
			(2.8)	(1.7)	(1.5)	(2.7)	(2.5)	(1.5)	(3.2)
Lactic acid bacteria- axenic	37°		268	318	47	81	190	192	35
			(0.3)	(0.9)	(0.3)	(0.2)	(0.4)	(0.4)	(0.4)
		42°	318	346	303	289			
Lactic acid bacteria- axenic	32°		(55)	(53)	(26)	(57)	(57)	(86)	
			266	319	243	216			
			254	290	54	70	170	164	

重要な関係があるものと推測して来た。本実験に先立って混合培養系 II で系全体の濁度とこうぼ菌数を指標として温度条件の検討を行った結果が Table 6 である。こうぼ CP-1 も SH-4 も純粋培養系ではいずれも培養温度が高くなるに従って培養終了時の菌数が低くなる。さらに、混合培養系ではその傾向に拍車がかかる。この結果からも乳酸菌の混在と高温が焼酎醸造の培養系に大きな影響を与えているとの推測は

確かなように思われる。このため接種時の乳酸菌とこうぼの菌数比と品温を設定して実験を行った。結果は Table 7 に示した。混合培養の結果を 32°C でのアルコール生成量で比較してみるとこうぼ SH-4 と *L. sake*, F-a-1 の場合、対照のアルコール生成量の 60% の生成しかなく、温度を変えても傾向は変わらないように思われる。一方、高酸度醗の目安になる酸度について見ると *L. sake*, F-a-1 の場合品温が高いほど

Table 7. Effects of the mixing ratios of starting cell counts of lactic acid bacteria to Shōchū yeast SH-4 and the incubation temperatures on alcohol and acid productions in the cultures

Mixing ratio to yeast	temp.°C	Production*			
		Alcohol, mg/200 ml	Volatile acid, mg/200 ml	Acidity, 0.1 N NaOH ml/10 ml	
F-a-1	10:1	24°	810.2 ( 72 )	48 ( 25)	10.02 ( 63)
		32°	736.0 ( 57 )	45 ( 23)	11.25 ( 70)
		37°	630.2 ( 56 )	63 ( 32)	14.75 ( 91)
	1:0	24°	15.7 ( 1 )	48 ( 25)	12.77 ( 79)
		32°	8.7 ( 0.8)	54 ( 28)	15.50 ( 96)
		37°	4.6 ( 0.4)	66 ( 34)	16.15 (100)
	1:1	24°	790.6 ( 71 )	48 ( 25)	8.58 ( 53)
		32°	667.0 ( 60 )	30 ( 15)	8.90 ( 55)
		37°	736.0 ( 66 )	60 ( 31)	14.75 ( 91)
B-2a-2	10:0	24°	457.4 ( 41 )	93 ( 48)	6.75 ( 42)
		32°	517.5 ( 46 )	144 ( 74)	9.85 ( 61)
		37°	345.0 ( 31 )	135 ( 69)	8.85 ( 55)
	10:1	24°	859.9 ( 77 )	75 ( 39)	3.61 ( 22)
		32°	1000.5 ( 89 )	126 ( 65)	4.75 ( 29)
		37°	776.3 ( 69 )	135 ( 69)	5.00 ( 31)
	1:1	24°	873.0 ( 78 )	102 ( 52)	6.51 ( 40)
		32°	977.5 ( 87 )	132 ( 68)	4.25 ( 26)
		37°	805.0 ( 72 )	141 ( 72)	4.50 ( 28)
G-3e-2	10:0	24°	744.9 ( 66 )	132 ( 68)	9.88 ( 61)
		32°	603.8 ( 54 )	195 (100)	10.00 ( 62)
		37°	431.3 ( 39 )	138 ( 71)	9.50 ( 59)
	10:1	24°	862.5 ( 77 )	96 ( 49)	5.30 ( 33)
		32°	1150.0 (103 )	105 ( 54)	4.50 ( 28)
		37°	948.8 ( 85 )	141 ( 72)	5.25 ( 33)
	1:0	24°	640.4 ( 57 )	165 ( 85)	10.79 ( 67)
		32°	632.5 ( 56 )	189 ( 97)	9.65 ( 60)
		37°	402.5 ( 36 )	123 ( 63)	9.00 ( 56)
	1:1	24°	871.7 ( 78 )	102 ( 52)	4.14 ( 26)
		32°	1155.8 (103 )	102 ( 52)	4.25 ( 26)
		37°	1020.6 ( 91 )	111 ( 57)	4.25 ( 26)
Control:SH-4	24°	867.7 ( 77 )	60 ( 31)	2.41 ( 15)	
	32°	1121.3 (100 )	135 ( 69)	2.85 ( 17)	
	37°	1121.3 (100 )	99 ( 51)	0.50 ( 3)	
Blank		—	39 ( 20)	2.41 ( 15)	

\* The amount of alcohol of Shōchū yeast SH-4 at 32°, the amount of volatile acid of *L. brevis*, G-3e-2 at 32°, 10:0, and the acidity of Moromi inoculated with *L. sake*, F-a-1 at 37°, 1:1 were taken for 100.

醪酸度は高く、また同じ温度ならば乳酸菌の接種菌数が高いほど高い醪酸度を示している。しかも品温が37°Cではほぼ確実に高酸度醪の範疇に入ることが明らかである。この結果、乳酸菌の汚染度が高ければ高いほど、また同じ汚染度なら品温が高いほど、高酸度化の危険が高くなると言える。 *L. brevis* との混合培養ではヘテロ乳酸菌のこともあって醪酸度は一見上昇していないように思われるかも知れないが、実際の醸造では白麴菌の酸度の上に乳酸の生成が認められることと前の実験でも観察されたように揮発性酸量が多く、その生成量は品温に比例しているの、揮発性酸の生成量が多く認められる高酸度醪は *L. brevis* が関係しているものとの判断の一つの裏付けとなる。

#### 4. 高酸度焼酎醪のモデル実験

モデル実験の予備実験として1lの三角フラスコで Meissel 栓を装着して米麴米仕込の焼酎醸造形式の混合培養を行った。結果は Table 8 に示したが、表中、醪酸度の点からも発酵歩合 (fermentation efficiency) の点からも高酸度醪の気配すら感じられない。通常、

麴酸度が3ml以下では変敗の危険が高くなるが、表の実験1の場合はこれに該当する。しかし、小規模の製麴では麴の培養令と培養時間が必ずしも一致していないのでこれとても断定的なことは言えない。ただ、これらの結果を総合的に判断すると製麴と温度管理がうまく行くなれば高酸度醪化の危険は充分遠のくものと言えよう。次に、通常の米麴生白糠仕込焼酎醸造の1500分の1のサイズで、設定した温度条件で醸造を行い、焼酎こうば CP-1 は酒母既立の際に、また乳酸菌 *L. sake*, F-a-1 は二次醪の物料を掛ける時にそれぞれ接種した。結果は Table 9 に示したが、乳酸菌の接種がなければ対照に示すようにこの条件では高酸度醪とはなりえない。一方、32°C 培養でも二次仕込時に乳酸菌を接種すると醪酸度が異常に高くなり、多量の乳酸生成による高酸度であることを示している。また、アルコールの生成もかなり影響をうけていると考えられる。酒母品温を42°C 培養とした場合は酒母の形成はなく、二次醪以降32°C としても回復のきざしはない。当然のことながら二次醪以降も42°C に保

Table 8. Mixed cultures of various Shōchū lactic acid bacteria and Shōchū yeasts in the way of Shōchū making

Mixed with lactic acid bacteria: Analyses	Experiment*1: Shōchū yeast SH-4			Experiment*2: Shōchū yeast CP-1			
	Blank	<i>L. sake</i> , F-a-1	<i>L. brevis</i> , G-3e-2	Blank	<i>L. brevis</i> , B-2a-2	<i>L. sake</i> , F-a-1	<i>L. brevis</i> , G-3e-2
Moromi, weight, g	380.95	385.72	384.62	385.51	384.47	383.92	381.29
volume, ml	390	390	390	385	387	390	385
Materials in Shubo process, g	142.77	145.56	145.29	143.78	144.45	144.37	144.76
CO <sub>2</sub> release in Shubo process, g	12.14	11.77	11.38	15.38	15.24	15.14	15.63
materials in Moromi process, g	421.57	427.10	426.01	421.23	420.46	419.94	417.30
CO <sub>2</sub> release in Moromi process, g	40.62	41.38	41.39	35.72	35.99	36.02	36.01
Alcohol, %	17.00	16.80	16.60	16.20	16.30	16.22	16.31
Fermentation efficiency, %	94.8	93.7	92.6	89.2	90.2	90.5	89.8
Volatile acid, g/l	0.13	0.13	0.14	0.19	0.19	0.15	0.16
Acidity of Moromi, ml of 0.1 N NaOH soln.	6.40	6.10	6.10	9.80	9.65	9.65	9.05

\*1 & \*2:

	*1	*2
Acidity of Koji, ml of 0.1 N NaOH soln.	2.69	6.43
Amylase activity of koji saccharifying ability		
Sa <sup>30</sup>	9.68	12.72
Sa <sup>60</sup>	12.80	26.05
liquefying ability, min	180	120



Table 9. Modelling experiment of Shōchū making : Mixed cultures of Shōchū yeast CP-1 and *Lactobacillus sake*, F-a-1 under various temperature conditions

Analyses	Blank	Temperature conditions*			
		32°-32°	32°-42°	42°-32°	42°-42°
Alcohol, %	16.3	14.7	13.9	2.4	—
Volatile acid, g/l	0.28	0.45	0.30	0.27	0.35
Acidity of Moromi, ml of 0.1 N NaOH solution	12.00	29.00	28.60	16.10	35.00
Citric acid, g/l	0.18	0.58	0.56	0.56	0.56
L-lactic acid, g/l	—	17.5	16.8	7.9	19.8
D-lactic acid, g/l	0.1	1.7	1.6	0.3	1.9

\* Incubation temperatures: Shubo process at the first temperature and Moromi process at the second.

Table 10. Modelling experiment of Shōchū making: Mixed cultures of Shōchū yeast CP-1 and various strain of Shōchū lactic acid bacteria\*

Analyses	Blank	Shōchū lactic acid bacteria			
		<i>Lactobacillus sake</i> , F-a-1	<i>L. brevis</i> , B-2a-2	<i>L. brevis</i> , G-3e-2	<i>L. acidophilus</i> , I-3a-1
Alcohol, %	15.8	13.4	15.0	8.1	15.1
Volatile acid, g/l	0.17	0.18	0.85	2.35	0.38
Acidity of Moromi, ml of 0.1 N NaOH solution	10.10	28.40	15.50	30.30	20.10
Citric acid, g/l	0.26	0.06	0.09	0.10	0.04
L-lactic acid, g/l	—	15.6	1.7	3.5	1.9
D-lactic acid, g/l	0.1	1.6	2.0	9.7	8.1

\* Modelling experiment was carried out at 32°C.

持するとアルコール生成は痕跡的にも認められず完全な乳酸菌醪としかいいようのない状態であった。一方酒母 32°C 培養で充分こうぼを育成し酒母が完成すると二次醪以降で品温が 42°C と高くても決定的な悪影響を示すとはゆかず、この条件では二次醪以降 32°C 経過の場合と同様高酸度醪となったがアルコール生成量はそれにわずかに劣る程度であった。ここで問題と思われるのは、酒母 32°C 二次醪以降 32°C の品温管理でも *L. sake*, F-a-1 がこうぼにせり勝ち高酸度醪となる機会があることである。このため同じ条件で他の分離乳酸菌についても高酸度醪の可能性について検討した。結果は Table 10 に示したが、*L. sake*, F-a-1 は上記の実験とほぼ同じ結果でこの現象に再現性があることが示された。また *L. brevis*, B-2a-2 と *L. acidophilus*, I-3a-1 は醪酸度からは高酸度醪の傾向を示してはいるが、生成アルコール量も対照と比較して変敗というほどではない。しかし、*L. brevis*, G-3e-2 は揮発性酸の生成が著しく、醪酸度も高く、アルコール量は対照の半分である。他の乳酸菌の場合とこの場合の決定的な差はやはり揮発性酸量で先の三角フラスコでの全麴仕込での混合培養の場合でもこの傾向が認められたし、トマトジュース・クエン酸培地

での混合培養では高酸度、低アルコールとはならなかったが 32°C 培養での揮発性酸量が多く、これもこの傾向と符号するものと考えられる。以上から *L. sake* 群による高酸度醪は *L. sake* 群の生成する乳酸により、一般には品温の上昇が高酸度醪化に有利であるが、通常の管理温度である 32°C であっても高酸度醪化の危険率は低くないことがわかった。一方、温度的性質ではむしろ低い *L. brevis* は既報<sup>5,7)</sup> のようにクエン酸耐性 (0.4~0.5%)、アルコール耐性 (10%) および乳酸菌性 (0.5~0.7%) が比較的高いことと麴によって生育が促進されることなどから、二次醪で一時的にクエン酸濃度やアルコール濃度が低められるようなことがあると、それが乳酸菌増殖の引金となって高酸度醪化するものと思われ、その時の高酸度は揮発性酸によるものであることも明らかとなった。

## 要 約

旧式焼酎醸造過程、とくに米麴生白糠仕込焼酎の醪で出現する高酸度醪の発生機構を解明するため、各種焼酎醪から分離した乳酸菌について焼酎こうぼとの混合培養および焼酎醸造のモデル実験を行った。

1. 全麴仕込で焼酎こうぼと焼酎醪から分離した乳

酸菌の混合培養を行ったところ、*L. brevis* との混合培養でアルコール生成が減少し、揮発性酸生成の高いものが多く認められた。

2. 乳酸菌と焼酎こうぼの混合培養を接種菌数比および培養温度について高酸度醗化への傾向および条件を検討した。これによると *L. sake*, F-a-1 での実験では品温が 37°C までで高ければ高いほど高酸度化の危険が高いことが明らかとなった。また、*L. brevis* の場合でも高酸度醗とはならなかったが揮発性酸の生成量が多く、高揮発性酸型の高酸度醗の発生原因となるものと判断できた。

3. モデル実験は通常の焼酎醸造の 1500 分の 1 のサイズで、設定した温度条件のもとで行った。*L. sake*, F-a-1 の場合、通常の醗の管理温度である 32°C 培養でも醗に乳酸菌が接種されるなら、醗酸度が多量の乳酸の生成にともなって異常に高くなり高乳酸型の高酸度醗になることがあるのが明らかになった。

一方、*L. brevis*, G-3e-2 接種のモデル実験では揮発性酸の生成が著しく、醗酸度も高いし、アルコール量は対照の半分である。これは混合培養での結果と同じで、このような高揮発性酸型の高酸度醗が通常の管理温度でもおこりうることが示された。

## 文 献

- 1) 注解編集委員会：第三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 (1974)
- 2) 玉岡寿・田邊幾之助・小林武一・大林晃・松村悦男：旧式焼酎醸造の微生物学的研究 (第 2 報) 米麴生白糠仕込過程中的微生物相の変遷、醸協、66, 816-818 (1971)
- 3) Tanabe, I.: Cooperative Research Project on Alcohol Fermentation for the Securing of Energy Resources and Single Cell Protein Production. Report of Overseas Visits, Southeast Asian Cooperative Program in the Agricultural Sciences, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, April 1981-March 1982, 84-104, 1982.
- 4) 田邊幾之助・有川順子・金丸芳・丸山智之・佐藤平二：高酸度焼酎醗における乳酸菌の蛍光抗体法による検出について、鹿大農学術報告、No. 33, 53-63 (1983)
- 5) 田邊幾之助・二石真智子・迫間敬子・有川順子：旧式焼酎 (米麴生白糠仕込) 醸造における酒母・醗中の乳酸菌について、鹿大農学術報告、No. 33, 47-52 (1983)
- 6) 田邊幾之助・二石大介・金丸芳：旧式焼酎酒母・醗から分離した乳酸菌の生態学的性質について、鹿大農学術報告、No. 34, 45-57 (1984)
- 7) 田邊幾之助・音地龍夫・二石真智子・迫間敬子・志々目義紀：甘藷焼酎醸造における酒母、醗中の乳酸菌について、鹿大農学術報告、No. 32, 69-77 (1982)
- 8) 田邊幾之助・坂田太吉・迫間敬子：旧式焼酎醸造過程におけるジアセチルの生成について、鹿大農学術報告、No. 31, 47-52 (1981)

## Summary

At the process of Shōchū-brewing, especially, in some cases in the rice-koji-raw Shironuka-Shikomi-Shōchū, for the purpose of making clear a mechanism of appearance of Moromi in possession of high acidity, some modelling experiments of Shōchū-brewing, and the mixed cultivations of Shōchū-yeast and lactic acid bacteria isolated from various kinds of Shōchū-Moromi were carried out, with the following results obtained.

1. As the result of the cultivations in which the Shōchū-yeast and the lactic acid bacteria isolated from the Shōchū-Moromi were mixed in a manner of Zen-Koji-Shikomi, it was ascertained that in a lot of cases of the mixed cultivations in which *Lactobacillus brevis* was used, decreasing of alcohol production, and increasing of volatile acid production were observed simultaneously.

2. Investigations were made onto the appearance-conditions for Moromi in possession of high acidity, such as inoculum sizes of microorganism, cultivation-temperatures in the mixed cultures made up with Shōchū-yeast, and the lactic acid bacteria. It was ascertained that there might be a higher possibility of the appearance of Moromi with high acidity; and under a condition in which the temperature is kept less than 37°C, and *Lactobacillus sake*, F-a-1, is used as an inoculated lactic acid bacteria, the higher cultivation-temperature was to be expected. In theory it was assumed that the occurrence of Moromi in possession of high acidity of increasing volatile acid is to be brought forth by inoculating *L. brevis* as a sort of inoculated lactic acid bacteria, however, as far as experiments were concerned, the results were otherwise.

3. In the scale of one thousand-five-hundredth of the ordinary recipe of Shōchū-brewing, and under a fixed temperature, some modelling experiments were carried out. It was ascertained that an

occurrence of the Moromi in possession of high acidity of increasing lactic acid was brought forth; which was assumed to be due to the fact that acidity in Moromi is to be made to become higher, together with an increase in lactic acid production by the working of *L. sake*, F-a-1, even at the temperature of 32°C, the one fit for keeping Moromi at a favorable condition. In the modelling experiment carried out with the use of *L. brevis*, G-3e-2, a big amount of volatile acid was produced, and the amount of alcohol was fixed to be half of the one in the control experiment. This result was considered to be similar to that in case of the mixed cultivation, and it was suggested that occurrence of Moromi in possession of high acidity of increasing amount of volatile acid might be brought forth under an ordinary temperature.