

[鹿大農學術報告 第32号, p. 69-77, 1982]

甘藷焼酎醸造における酒母、醪中の乳酸菌について*

田邊幾之助・音地龍夫・二石真智子・迫間敬子・志々目義紀**

(応用微生物学研究室)

昭和56年8月10日受理

Occurrence of Lactic Acid-Bacteria in Shubo and Moromi of the Sweet Potato-Shōchū-Brewing*

Ikunosuke TANABE, Tatsuo ONCHI, Machiko FUTAISHI, Keiko SAKOMA,
and Yoshinori SHISHIME*

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

旧式焼酎は南九州の主要な地場産業であるが、その醸造形式は開放系である。このため、旧式焼酎醸造の一般的な図式は製麹に用いられる白麴菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* の生産するクエン酸によって酒母・醪の pH を4.0またはそれ以下とし、雑菌の汚染を防ぎつつ、同時にその生産するアミラーゼによる糖化と焼酎こうぼによるアルコール発酵の並行複発酵が順調に経過するものと考えられる^{10, 11)}。このような場合、順調でしかも安定な醸造経過をいつも得るためににはどうしても酒母・醪の適切な微生物管理が必要である。我々はとくにこの点に着目して、昭和41年来旧式焼酎醸造の微生物学的研究を行って来た^{6, 7, 8)}。

これら一連の研究から、旧式焼酎の酒母・醪の微生物相中、雑菌である乳酸菌がかなりの比重を示すこと、さらには、春から夏にかけて発生する高酸度醪の原因はこれら乳酸菌であると推定されることなど、焼酎醸造の微生物管理上乳酸菌が重要な関係をもつものと判断してきた⁹⁾。今回は、鹿児島県内多数の醸造場の米麹甘藷仕込焼酎の酒母・醪における乳酸菌類の分布、およびそれら乳酸菌の酒母・醪の生態学的要因との関係も併せ検討したので報告する。

材料と方法

1. 試料

表1に示した県内30の醸造場から酒母2日目27点、醪2日目（仕込から7日目）30点を採取した。サンプリングのための酒母・醪の醸造齢は、前報の結果から乳酸菌の検出頻度を考慮して決定した^{6, 7, 8)}。採取した試料は1cm 角の滅菌脱脂綿を入れた滅菌試験管中に1mlを投入して大学へ持ち帰り、直ちに分離した。

2. 分離

分離培地および希釈水の組成は前報のとおりで常法通り希釈平板法によって分離を行った^{6, 7, 8)}。乳酸菌は試料毎にコロニーの形態的特徴でグルーピングし、各グループにつき分離菌株は2株またはそれ以上とした。分離乳酸菌株は178株であったが、さらにL-arabinose, D-xylose, mannitol および sorbitol の利用性で再グルーピング、11グループとし、代表菌株を43株選んだ。これらの代表菌株について常法通り純粋分離を行い、同定・検索に備えた。

3. 同定・検索

同定・検索は常法により BERGEY's manual 8版¹²⁾および北原の乳酸菌の分類体系^{3, 4)}に従って行った。なお、乳酸菌の発酵型式については BOEHRINGER-MANNHEIM 社の D-glucose/D-fructose 定量 F キットで消費糖量を求め、それで乳酸生成量を割った数値が60~90%のものをホモ型、40%附近のものをヘテロ型と判定した。なお、乳酸生成量は、同社の L 乳酸 F キットで L 乳酸量を求め、そのキットの L 乳酸脱水素酵素を D 乳酸脱水素酵素に置きかえて D 乳酸量を定量し

*この研究は日農化関西支部・西日本支部合同大会（岡山大学教養部、岡山市、昭和53年10月14日）で口演した。講演要旨集 p. 25.

**鹿児島県酒造組合連合会

Table 1. A list of the Shôchû-Jôzôjô (Shôchû-distilleries), from which Shubo- and Moromi-samples were collected

醸造場 Jôzôjô	所在地 location	銘柄 brands
本坊酒造	鹿児島市	おはら焼酎
相良酒造	"	兵六
安楽酒造	"	稚児桜
窪田酒造	伊集院町	米の花
大和桜酒造	市来町	大和桜
田崎酒造	"	七夕
白石酒造	"	天狗桜
原口酒造	吹上町	西海の薰
西酒造	"	宝山
桜井酒造	金峰町	松の露
日当山醸造	隼人町	アサヒ
富乃露酒造	"	富乃露
白金酒造	姶良町	白金乃露
さつま司酒造	加治木町	さつま司
中村和治	国分市	玉露
五領酒造	"	七十七萬石
小野広次	"	あけぼの
岩川醸造	大隅町	岩の泉
若潮酒造	志布志町	さつま若潮
鹿児島醸造	"	岩泉
丸西焼酎	有明町	蓬の露
坂井酒造	"	⊖
老松酒造	大崎町	老松
新平酒造	"	大金の露
串良焼酎	東串良町	さつま大海
高崎酒造	西之表市	甘露
久岡産業	"	久耀
河内道雄	"	北晉
上妻酒造	南種子町	南泉
四元酒造	中種子町	さつま大閑

*This list does not follow the order, in which Jôzôjô in Table 4 were arranged.

た両者の和である。旋光性は D(-)・L(+) 乳酸の量比が 20% 以下なら、多い方の旋光性とし、80% 以上なら DL とした。

4. 酒母・醪の分析

酒母・醪の分析は常法によった^{2,11)}。なお、クエン酸の定量は BOEHRINGER-MANNHEIM 社のクエン酸定量用 F キットを使用した。また、乳酸は前項と同様に定量した。

5. 耐性スペクトル

2 倍濃度の液体培地（表 2）を調製し、15 × 150 mm

Table 2. Composition of the double-strength-medium for lactic acid-bacteria

polypeptone	10 g
yeast extract	5 g
beef extract	15 g
glucose	20 g
distilled water	1 l
pH 6.8	

の試験管に 3 ml づつ分注する。別にオートクレーブ (121°C, 15 分) または濾過滅菌した各所定の 2 倍濃度のクエン酸水溶液、乳酸水溶液またはアルコール水溶液 3 ml をこれに無菌的に加える。計 6 ml の培地に洗浄菌体懸濁液 1 滴を接種し、静置培養後経時的に増殖を測定した。所定濃度はクエン酸 : 0.009, 0.027, 0.046, 0.091, 0.137, 0.182, 0.228, 0.273, 0.455, 0.637, 0.910%。乳酸 : 0.04, 0.08, 0.15, 0.23, 0.30, 0.38, 0.51, 0.53, 0.75, 1.13, 1.50%。アルコール : 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17% とした。

結果および考察

1. 分離乳酸菌の同定・検索

分離乳酸菌の同定結果は表 3 の通りである。とくに、この中で多数の試料から検出された *Lactobacillus casei* は L 乳酸、milk 酸性、40°C 生育などで同定されたが、最初、これらの生成乳酸の旋光性を常法で決定した際、DL+L の型式と判断され、*L. acidophilus* と同定していた¹⁰⁾。ところが、表 4 に示すように 5 日～1 週間の培養で酵素法で定量すると、生成乳酸はほぼ L 型とみなされるし、milk の酸性凝固が著しい点などから *L. casei* と判断すべきではないかと思われた。一方、*L. acidophilus* については raffinose ⊕ で DL 乳酸産生のもののみに限った。なお、*L. xylosus* は raffinose ⊖, arabinose ⊖, xylose ⊕, L 乳酸産生をその同定のよりどころとした。ここで注目してよいのは、北原が提案していた *L. sake* は BERGEY'S manual 8 版では *L. plantarum* の synonym との判断でとり上げていないが、焼酎の酒母・醪からは L 乳酸を生成し、lactose ⊖, xylose ⊖, arabinose ⊖ の型が多数分離され、分布の上からも生態的に安定な乳酸菌群と考えられることである。また、北原が提案した系で新種としながらも、命名を後日にまわした菌株は arabinose ⊖, DL 乳酸生成という点で *L. sake* とは異なっていた³⁾。しかし、*L. sake* について分離直後は DL 乳酸生成であったものが L(+) 乳酸生成に移行

Table 3. Characterization of the lactic acid bacteria isolated from the Shôchû-moromi
(Kome-koji-sweet potatoes-shikomi)

strains	Fermentation	Optical activity	lactose xylose L-arabinose raffinose	maltose saccharose mannitol rhamnose galactose mannose sorbitol salicin trehalose dextrin starch glycogen inulin α -methylglucoside glycerin	Milk reaction
<i>Lactobacillus casei</i> 27, 42, 48, 59, 79, 80.	H	L	++--	+++++--++-+++-+±-+±-+	+
<i>L. casei</i> 26, 54.	H	L	++--	+-+-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. casei</i> 37, 49.	H	L	++--	+++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. casei</i> 46.	H	L	++--	+++++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. acidophilus</i> 3, 18, 20, 84.	H	DL	+--+	+++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. acidophilus</i> 13, 41.	H	DL	+--+	+++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. xylosus</i> 45.	H	L	++--	+++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. xylosus</i> 11.	H	L	++--	+-+++-+---+++-+++-+±-+±-	+
<i>L. sake</i> 1, 4, 5, 28, 66, 82, 87.	H	L	--	+++-+---+++-+++-+±-+±-	-
<i>L. sake</i> 53.	H	L	--	+-+--+++-+---+---+---+---	-
<i>L. brevis</i> 21, 33, 36, 38, 70, 75.	He	DL	-++-	++-+---+---+---+---+---	-
<i>L. brevis</i> 14, 39.	He	DL	-++-	+-+---+---+---+---+---	-
<i>L. brevis</i> 17, 19, 40, 47, 51, 62.	He	DL	--+-	+-+---+---+---+---+---	-
<i>L. fermentum</i> 16.	He	DL	++-+	+++-+---+---+---+---	(+)
<i>L. fermentum</i> 22.	He	DL	-+--	+-+---+---+---+---+---	-

*H: homofermentor. He: heterofermentor.

することが確かめられたこともあって⁴⁾、この両者はよく似た性質をもった乳酸菌群と思われる。ここでは、これら乳酸菌群のとり扱いが結論を見るまで、lactose ⊖, 多くは xylose ⊖, arabinose ⊖で生成乳酸は L~DL, 日本の酒類の醪に広く分布する乳酸菌類を一応 *L. sake* 群としてとり扱いたい。

一方、ヘテロ発酵乳酸菌も多数分離されており、これらは arabinose ⊕, 生成乳酸は DL~DL+D, 45°C で生育がないので、*L. brevis* とみなされる。これは北原の系では *L. brevis* β に相当する。生育が培地に

より不安定なので火落菌と同様、生育因子要求も含め生態系依存性が高い菌群かも知れない。

2. 県下醸造場での乳酸菌の分布

分離した乳酸菌の意味についてまだよくわかつてはいないが、醪の後半で乳酸菌が増殖し酸度を上げるいわゆる高酸度醪の問題がある^{9, 10)}。しかし、この高酸度醪についても、功罪相半ばするという報告があって、結論は簡単にはひき出せない⁵⁾。

さて、県下の各醸造場よりの酒母・醪中の乳酸菌の分布をみよう。生菌数の表し方については、コロニー

Table 4. Determination of the fermentation patterns of the Shôchû-lactic acid-bacteria, and the isomers of lactic acid produced by them, using the enzyme-kits

	consumed sugar g/l	isomers of lactic acid, g/l				yield %
		L-L _b	D	D L-L _b %		
<i>L. casei</i>	80-3	11.750	8.914	0.980	11	84
	54-1	22.362	15.506	0.399	3	71
	37-1	19.057	12.897	2.220	17	79
<i>L. xylosus</i>	11	21.830	17.827	1.633	9	89
	45-2	12.542	9.632	1.078	11	85
<i>L. sake</i>	35-1	20.489	10.056	2.057	20	59
<i>L. brevis</i>	19-2	18.617	4.016	3.330	83	40

*Enzyme-kits: BOEHRINGER-MANNHEIM F-kits (for L-lactic acid, and D-glucose/D-fructose), and BEHRINGER-MANNHEIM D(-)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus leichmannii* (for D(-)-lactic acid) were employed.

**L_b: a blank of lactic acid in the test broth, which is derived from muscular lactic acid in beef extract.

計数時にコロニーの形態・大小による類型化が可能な場合は各コロニー型毎に計数し、コロニー型を分けて計数出来ない場合は一括して乳酸菌として計数した。コロニーからの釣菌は各コロニー型または一括して計数した場合は全体からコロニーを2~4個選び実験用の培養を作成した。この計数と同定結果とを組合せる場合は、分離した乳酸菌の培養が試料毎またはコロニー型毎にみて全て同じ種で生菌数が10⁴/ml以上の時のみ+とし、それより少い場合は⊕、また、二種以上の細菌種からなる時は生菌数を案分したものが10⁴/ml以上の時を+、それより少い時を⊕としてそれぞれ表した。ここで、表中、各試料の醸造場の名は伏せたが、これは各醸造場の酒母・醪の特性を見ることが目的ではなく、県下の焼酎の酒母・醪が全体としてはどのようない傾向をもつかを知るためだけだからである。結果は表5に示した。一般的な分布の傾向は酒母で乳酸菌の出現は非常に稀であることがわかった。これは前報でも示したように酒母は通常その使用した麹菌の生産するクエン酸が8~9g/l、酸度で23~26ml、pHが4.0以下になるため、乳酸菌の生育する余地がないと思われる^{9, 10, 11)}。ところが、酒母に物料をかけて醪となるとpHこそ4.0とほとんど変化がないが、クエン酸は0.15g/l、酸度は6~7mlとなって乳酸菌の増殖を阻止しなくなるものと思われる^{9, 10, 11)}。従って、この乳酸菌の存在は各醸造場の環境・製麴・仕込方法等の反映とも考えられ、この面でさらに将来の研究が必要と思われる。

3. 乳酸菌のクエン酸耐性、アルコール耐性および乳酸耐性について

焼酎酵母および醪は白麹菌の產生したクエン酸と酵母の產生したアルコールによって乳酸菌にとってかなり厳しい環境がつくり出されている。従って、この中で生育する乳酸菌群はクエン酸・アルコール耐性でかなり際立った特性を有するものと思われる。焼酎醪で時々発見される高酸度醪との関係を明らかにするためにも、酒母・醪から分離した乳酸菌のこのような特性を検討する必要があろう。

分離乳酸菌のクエン酸耐性についてみると図1のようになる。これはクエン酸濃度に対して乳酸菌のKLETT SUMMERSON 生育度が0になる濃度を黒丸、生育度が対照の2分の1を切るクエン酸濃度を白丸であらわした。菌株の耐性にかなりのばらつきがあるが、クエン酸濃度0.91%では耐性の高いものでも完全に生育出来なくなることが示された。実験に使用した培地はクエン酸を投入したままのpH無調整なのでクエン酸0.46, 0.64および0.91%のpHはそれぞれ4.2, 3.9および3.7となるが、これは通常の酒母・醪などのpHとほぼ同じである。従って、クエン酸の生育抑制はpHが低いためのそれではないことが推定できる。これはクエン酸を1.0278%投入し、カセイソーダでpH 6.5に中和したものでの生育実験でも生育が全くないか、あっても低いものであった(表6)。このことはクエン酸が乳酸菌の生育の始動に何らかの阻害的な効果を示しているということではないかと思

Table 5. Occurrence of the lactic acid-bacteria in the Shôchû-Shubo and Shôchû-Moromi of various Jôzôjô in Kagoshima

Jôzôjô	Shubo					Moromi					
	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. xylosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. xylosus</i>	<i>L. brevis</i>
IA											
IB*								++	++		
IC			+					+	+		
ID							+	+			
IE								+	+		
IF											+
IG*								+	++		
OA								+	++		
OB									++		
OC										++	
OD											+
OE											
OF											+
OG								+			+
OH					+	+	++		++		
SA							+		+		
SB		+							++		+
SC									+		
SD							++				++
SE	+			++		++					
SF								+			+
SG							+				+
SH							+		+		
SI							++	++			++
SJ											
TA							+		+		
TB								+			
TC*									+		
TD					+		++		++		
TE		+					+		+		

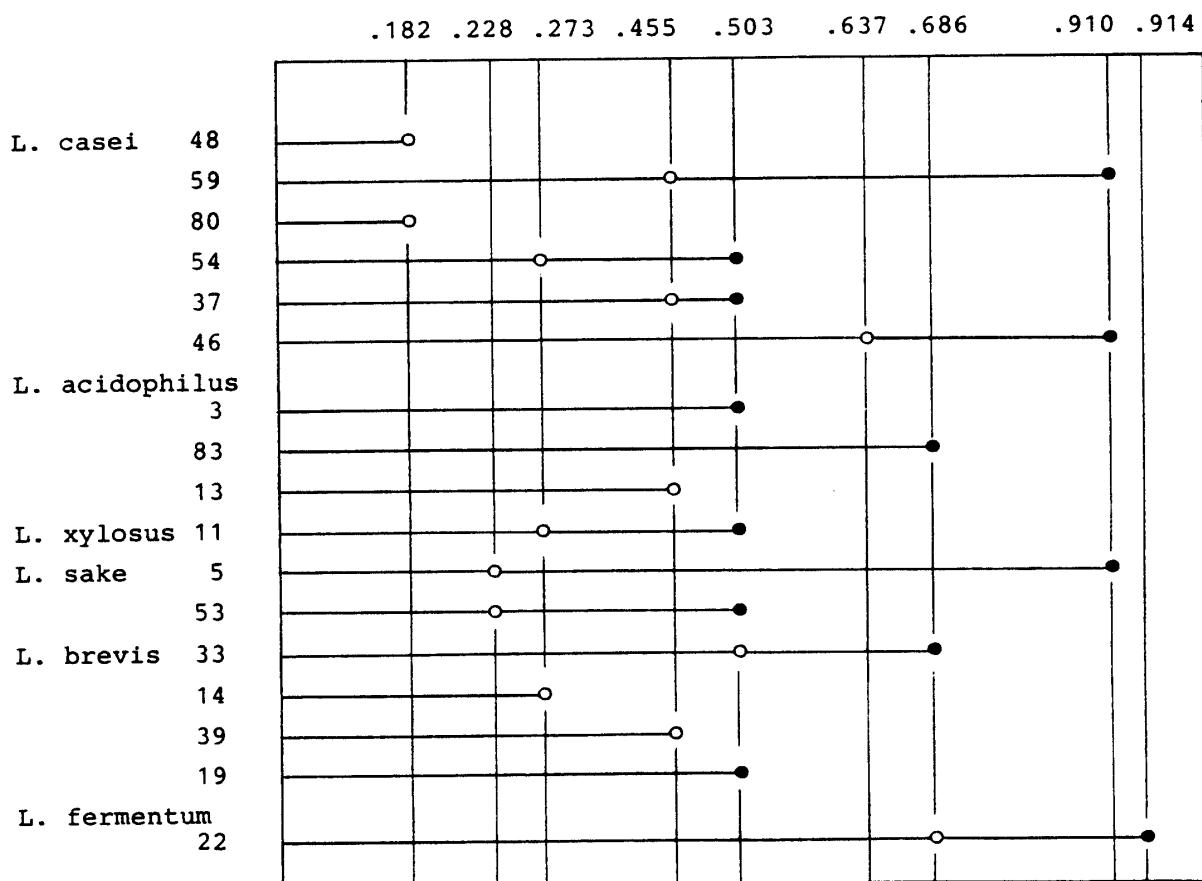
*only Moromi-sample.

われる。

ここで以上の結果を先の乳酸菌の酒母・醪での分布とつきあわせてみると一層醸造との関連が明らかになる。すなわち、酒母でのクエン酸濃度は8~9g/lであり、酒母での乳酸菌の生育は通常はほとんど認められ

ないことがこれで納得いくし、醪のクエン酸濃度が1.5g/lであるので、アルコール濃度の低い間、とくに酒母に物料を掛けた二次仕込の1日目などは、乳酸菌はかなり増殖することが出来ることを示すもので、この関係が一層明確になる。

Fig. 1. Citric acid-acidity-resistance of the Shôchû-lactic acid bacteria.
citric acid-concentration



*Closed circles show the concentration, at which the growth-response could not be observed. Open circles show the concentration, at which at least one-half of the growth-response in the control could be observed.

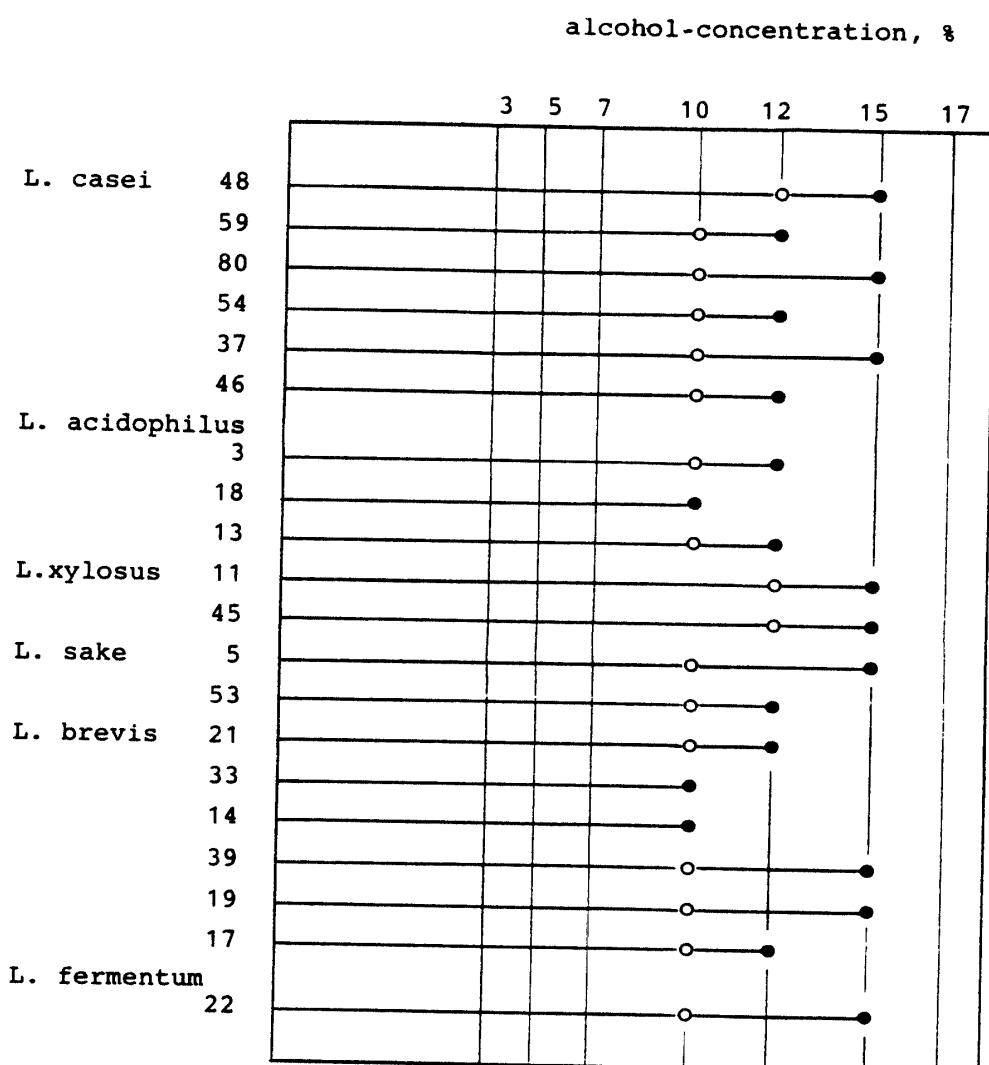
Table 6. Effect of lactic acid and citric acid on the growth of the Shôchû-lactic acid bacteria

	kg' at max. growth	lactic acid free acid: 0.096 g/l				citric acid free acid: 10.278 g/l			
		free acid		Na-salt		free acid		Na-salt	
		kg'	M%	kg'	M%	kg'	M%	kg'	M%
<i>L. acidophilus</i> 3-4	89	—	—	31	66	—	—	—	—
<i>L. casei</i> 80-3	177	—	—	83	50	—	—	—	—
<i>L. xylosus</i> 11	80	—	—	43	62	—	—	—	—
<i>L. sake</i> 53-1	83	9	27	48	89	—	—	—	—
A-2-2	108	—	—	61	57	—	—	32	32
D-a-2	75	—	—	32	45	—	—	34	41
<i>L. brevis</i> 19-2	53	—	—	57	89	—	—	—	—
B-2a-2	25	—	—	32	131	—	—	—	—
B-3a-1	46	—	—	30	202	—	—	—	—
<i>L. fermentum</i> 22-1	38	—	—	38	100	—	—	26	29

*kg' : increases in an optical density at 660 nm in KLETT-SUMMERSON's colorimeter for a day.

M% : percentages of a growth of bacterium to its maximum growth.

Fig. 2. Alcohol-resistance of the Shôchû-lactic acid-bacteria.



*Closed circles show the concentration, at which the growth-response could not be observed. Open circles show the concentration, at which at least one-half of the growth-response in the control could be observed.

乳酸菌のアルコール耐性は酒母・醪ではかなり重要な注目すべき問題である。とくに醪では物料投入(掛)時にアルコール濃度が一時的に下り10%以下になるが、醪で乳酸菌が生育するとすれば結局のところこの時期のみになる。従って、アルコール耐性が高ければより長い生育可能期間をもつことになり、乳酸菌増殖の大きな動機となる。実験結果は図2にまとめた。クエン酸耐と同じような表し方をしたが、菌株間に大きな差がなく、アルコール12~15%で生育は完全に認められなくなる。この点も、醪の物料投入が乳酸菌増殖の引金になるという予測を証明している。

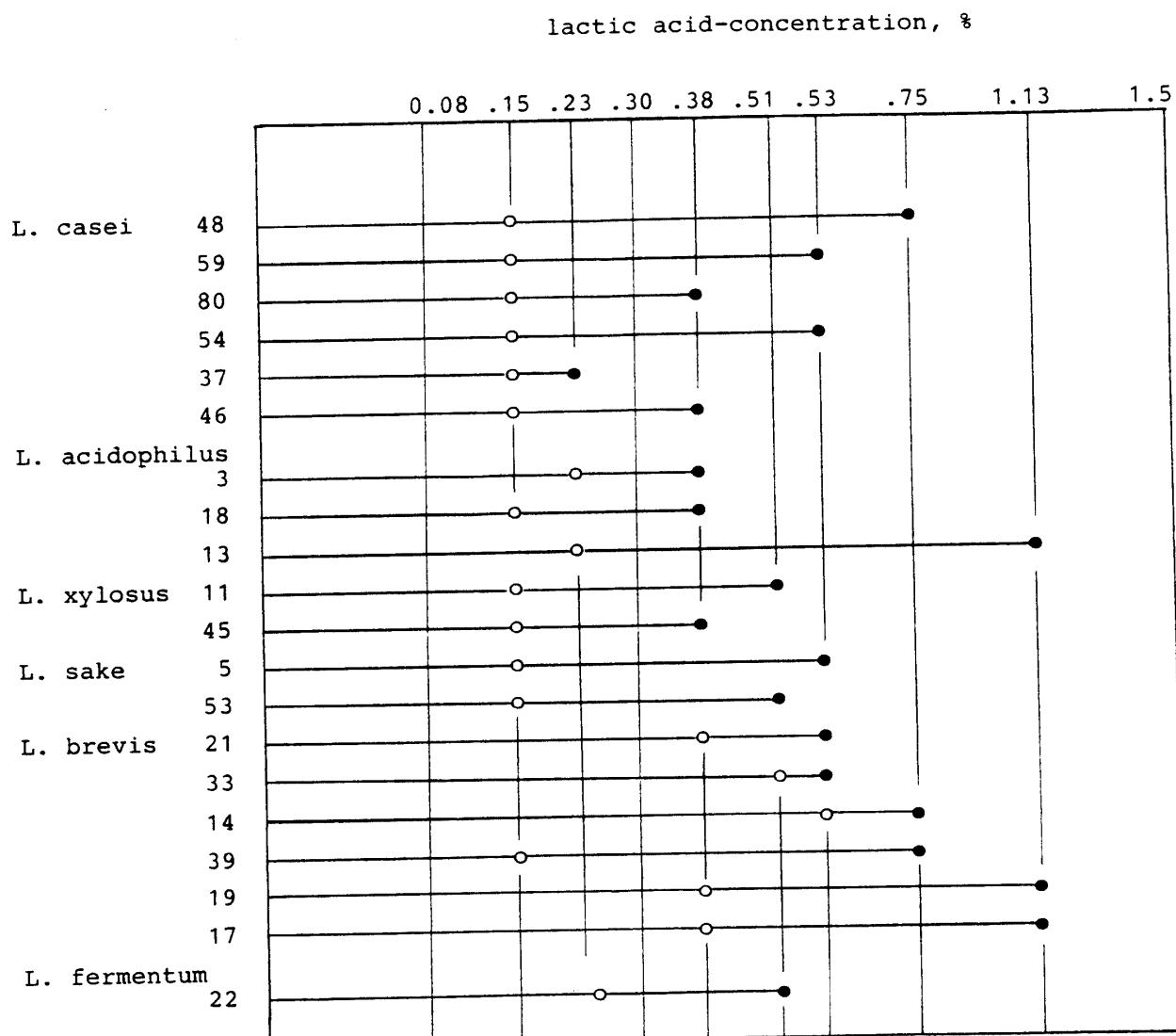
乳酸菌の乳酸耐性については、酒母・醪中の乳酸量は主として乳酸菌の増殖の結果であり、表6にも示す

ように乳酸を中和した場合は乳酸による生育への影響が軽減されるので乳酸そのものよりも先にpHによる生育への影響の方が問題のようでもある。従って、酒母・醪のような環境下では乳酸が乳酸菌の生育の制限因子になっているような状態ということはまざないものと思われる。クエン酸耐性の場合と同じ表し方をすると図3のようになる。この場合も種的な傾向というのがはっきりはつかめないが、*L. brevis* の菌株に高い耐性を示すものが多いようである。

要 約

焼酎醸造の微生物管理上乳酸菌が重要な関係をもつものと考えられるので、鹿児島県内30の醸造場の米麴

Fig. 3. Lactic acid-acidity-resistance of the Shôchû-lactic acid-bacteria.



*Closed circles show the concentration, at which the growth-response could not be observed. Open circles show the concentration, at which at least one-half of the growth-response in the control could be observed.

甘藷仕込焼酎の酒母・醪中の乳酸菌分布とそれら分離乳酸菌の酒母・醪の生態学的要因との関係を検討した。

分離乳酸菌43株の同定の結果、ホモ型ではL乳酸生成の *Lactobacillus casei* 11株、*L. xylosus* 2株、*L. sake* 8株、DL乳酸生成の *L. acidophilus* 6株、またヘテロ型では *L. brevis* 14株、*L. fermentum* 2株であった。

これら乳酸菌の分布をみると酒母では乳酸菌の検出は27試料中6点、とくに *L. casei* が認められないのが特徴的であった。ところが、醪では30試料中28点から乳酸菌が分離され、*L. casei* は11点、*L. acidophilus*

は11点、*L. sake* は15点、*L. brevis* は8点とそれぞれ出現している。このことは酒母・醪の生態学的要因、すなわち、クエン酸やアルコールの存在に対する乳酸菌の対応が関係しているものと思われる。

乳酸菌のクエン酸耐性をみると菌株によりばらつきはあるが、酒母のクエン酸濃度である0.91%では耐性の高いものでも生育は完全にストップする。一方、醪のクエン酸濃度である0.15%附近では多くの乳酸菌の生育はほとんど影響を受けなかった。また、アルコール耐性についても、アルコール12~15%で生育が完全に認められなくなった。このことは醪で物料を掛けた

時に一時的にアルコールが10%以下となると同時にクエン酸濃度は0.15%と低くなれば乳酸菌の増殖する余地が出来るものと思われ、醸造場の乳酸菌分布をこのことはよく説明している。

文 献

- 1) Buchanan, R. E., (editor) : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., the Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 2) 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）
- 3) 北原覚雄：乳酸菌と乳酸酵素，灘酒研究会例会講演，1-16 (1948)
- 4) 北原覚雄：乳酸菌の研究，東京大学出版会，東京 (1966)
- 5) 有間誠之助：見なおされる第三の酒，朝日ソノラマ，東京 (1975)
- 6) 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（第一報）米麹・甘藷仕込過程中的微生物相の変遷，醸協，66, 810-815 (1971)
- 7) 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（第二報）米麹・生白糠仕込過程中的微生物相の変遷，醸協，66, 816-818 (1971)
- 8) 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（第三報）生白糠麴・生白糠仕込過程中的微生物相の変遷，醸協，66, 893-896 (1971)
- 9) 田邊幾之助，有川順子，丸山智之，佐藤平二：高酸度焼酎醪における乳酸菌の蛍光抗体法による検出について，日農化大会講演要旨集，p. 158 (1980)
- 10) 田邊幾之助，音地龍夫，二石真智子，迫間敬子：旧式焼酎醸造過程の乳酸菌について，日農化関西支部西日本支部合同大会要旨集，p. 25 (1978)
- 11) 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，鹿大農学報告 No. 31, 47-52 (1981)

Summary

For the purpose of ascertaining an exact microbiological-control of the Shôchû-brewing, investigations were carried out both on the distribution of lactic acid-bacteria in Shubo and Moromi collected from 30 Shôchû-distilleries in Kagoshima and on their relationships to some ecological factors of Shubo and Moromi.

Of the 43 isolated lactic acid-bacteria the identified composition was classified into: *Lactobacillus casei*, 11 strains; *L. xylosus*, 2 strains; *L. sake*, 8 strains; *L. acidophilus*, 6 strains; *L. brevis*, 14 strains; *L. fermentum*, 2 strains, respectively.

As to the occurrence of lactic acid-bacteria, it was confirmed that of the 27 Shubo-samples lactic acid-bacteria were found only in 6, especially there was no sample having *L. casei*. Of the 30 Moromi-samples various lactic acid-bacteria-strains were found in 28: *L. casei*, in 11 samples; *L. acidophilus*, in 11 samples; *L. sake*, in 15 samples; *L. brevis*, in 8 samples. This fact suggests that such ecological factors as concentrations of citric acid and alcohol in Shubo and Moromi would bring a limit on the occurrence of lactic acid-bacteria in them.

The isolates varied in the growth-response to citric acid, but for any of them it was impossible to grow at the citric acid-concentration of 0.91 percent, which agreed with the citric acid-concentration of Shubo. In case of Moromi at a citric acid concentration of 0.15 percent, the growth was scarcely restricted. Alcohol concentrations of 12 to 15 percent inhibited the growth of Shôchû-lactic acid-bacteria. It is confirmed by this fact that an addition of materials to Shubo reduced the concentration of alcohol to less than 10 percent, and that of citric acid to 0.15 percent, and that some lactic acid-bacteria might have a good chance for growth. This may well explain the occurrence of Shôchû-lactic acid bacteria in the Shôchû-distilleries in Kagoshima.