清酒醪における生酸菌の酵母増殖活性に及ぼす影響

稲橋正明¹・戸塚堅二郎²・岡崎直人¹・石川雄章¹・佐藤和夫²

(¹ 日本醸造協会, ² 東京農業大学)

平成 24 年 11 月 5 日受理

Effects of lactic acid bacteria (acid producing bacteria) on the growth rate of yeast in sake main mash.

¹Masaaki INAHASHI, ²Kenjiro TOTSUKA, ¹Naoto OKAZAKI, ¹Takeaki ISHIKAWA and ²Kazuo SATO

(¹Brewing Society of Japan, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114-0023, Japan, and ²Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1 Sakuragaoka 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan)

We studied the relation between sake yeast and lactic acid bacteria (acid forming bacteria) with a focus on the influence on the formation of excessive acid in the main mash of sake brewing. Our experiments confirmed the following results: The fermentation progress varies if growth rate (doubling time) of the yeast differs even though the ratio of yeast's living cells (CFU/total cells) may be more than 80% and their fermentability (nanogram carbon dioxide generated by alcohol fermentation with one yeast cell for one hour: ng/hr/cell) hardly shows any difference. The reason for this was that their growth rates, namely, the time when yeasts reached the maximum cell number (ca. 2×10^8 /ml) differed.

Though the invasion of lactic acid bacteria can not be avoided in sake main mash as the mash is fermented in an open vessel without special sterilization, the growth and activities of lactic acid bacteria are suppressed because the necessary doubling time of the sake yeast is shorter than that of the bacteria under the conditions in the main mash. However, the use of yeast with a growth rate lower than 60% of the usual one enhanced the competitive growth of the lactic acid bacteria; as a result, the period for the main mash was prolonged, and its acidity increased abnormally.

When using yeast with a decreased growth rate, two days of odor should be taken to multiply the number of yeast cells (ca. 2×10^8 /ml) sufficiently in a three-step mashing of sake brewing.

Key words : 酵母の活性, 乳酸菌, 生酸菌, 二日踊り

緒 言

生醗系酒母は、清酒酵母の増殖に先立ち、乳酸菌を増殖させ、生成する乳酸とそれによる pH 低下により野生酵母や雑菌、最終的には乳酸菌も死滅させることで清酒酵母のみを純粋に集積させるものである。しかし、実際には生醗系酒母による清酒醪から乳酸菌が分離されることもあり、醪中に存在する乳酸菌に注目する必要がある。また、最近では乳酸生成と pH 低下を目的として *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus*

sakei といった乳酸菌を生醗系酒母へ添加することが報告されている¹⁾。

ところで腐造乳酸菌の醪での動向に関する報告は、その多くが 1960 年代前半のもの^{2~4)}であり、清酒酵母の活性が生酸菌の増殖にもたらす影響についての報告は見あたらない。そこで、醪における清酒酵母の活性と乳酸菌の相互作用、とりわけ醪の腐造との関係を解明することを目的に本研究を行った。

実験方法

1. 使用菌株

(1) 生酸菌 2008 年度に清酒醪から分離された生酸能力が高く、アルコール耐性及び乳酸耐性の高い No.8 株⁵⁾を用いた。この No.8 株は、*Lactobacillus paracasei* と同定されたが、性質等については、別報で詳しく述べる予定である。また、標準生酸菌株として *Lactobacillus casei* RIB8450 (S-4 株として酒類総合研究所が保存している菌株、以下 S-4 株と称する。) を対照株として用いた。

(2) 清酒酵母 貯蔵期間の異なるきょうかい酵母 1001 号の 2 種類の乾燥酵母を用いた。すなわち、製造後 1.5 年以上を経て使用期限の過ぎた菌株 K1001-1 (3. に示す方法で求めた生菌率は 80% 以上であった。)、及び製造後間もない使用期限内の菌株 K1001-2 を用いた。また、比較対照株としてきょうかい 701 (K701) 及び 901 (K901)、いずれも使用期限内のものを適宜用いた。なお、乾燥酵母は 1g 当たり酵母が 3×10^{10} 個存在する。また、乾燥酵母の復水等の使用方法は常法⁶⁾どおりおこなった。

2. 培養方法

生酸菌は、下記に示す生酸菌検出培地 (以後 BCG 培地) を試験管に 10 ml 分注し、生酸菌をそれぞれ 1 白金耳ずつ接種し、28℃ で 6 日間培養した。

BCG 培地：酵母エキス 10 g、ポリペプトン 5 g、グルコース 24.8 g、硫酸マグネシウム 0.1g、硫酸マンガ 0.0025g、硫酸第一鉄 0.0025g、アクチジオン 0.005g、窒化ナトリウム 0.005g 及びプロムクレゾールグリーン 0.01g を 1L の蒸留水中に溶かし、pH を 5.2 に調整したもの。これを 115℃、10 分間滅菌して使用した。

酵母は、以下に示す TTC 下層培地及び YM 培地にて 30℃、3 日間培養した。

TTC 下層培地：酵母エキス 1.5g、ポリペプトン 2g、グルコース 10g、硫酸マグネシウム 0.4g 及びリン酸二水素カリウム 1.0g を蒸留水 1L に溶解し、pH5.2 に調整したもの。

YM 培地：酵母エキス 3g、ポリペプトン 5g、マルツエキス 3g 及びグルコース 10g を蒸留水 1L に溶解したもの。なお、両培地とも、121℃、10 分間滅菌して使用した。

3. 酵母及び生酸菌数の測定

国税庁所定分析法⁷⁾221-11 に従って、トーマ氏血球計数器を用いて計測した (全菌数)。酵母の生菌数の測定は、前述の TTC 下層培地に寒天 20g を加えたものを使用し、生酸菌の生菌数の測定は、前述の BCG 培地に炭酸カルシウム 10g 及び寒天 10g を加えたものを用い、生育するコロニー数を計測した。なお生菌率は酵母、生酸菌ともに次式により求めた。

$$\text{生菌率 (\%)} = (\text{生菌数} / \text{全菌数}) \times 100$$

4. 酵母の活性度測定方法

上記 TTC 培地のグルコース濃度を 20% としたもの 100 ml に、乾燥酵母を用いる仕込み方法と同様の初発酵母数 ($1.8 \times 10^7/\text{g}$) になるように乾燥酵母 0.1g を添加して 15℃ にて培養し、一定の培養時間内における炭酸ガス発生量を比較することによって、便宜上「酵母の活性度」とし、「酵母の発酵性」を酵母菌体 1 個が 1 時間あたりアルコール発酵によって発生する炭酸ガス量 (ng/hr/cell) と定義した。

5. 小仕込み試験

A 麹 (アルコール脱水麹) と掛米として α 米を用いた酒母廃止一段仕込みと三段仕込み、さらに麴米及び掛米に蒸米を用いた一段仕込み及び三段仕込みをおこなった。A 麹と α 米仕込みに加えて蒸し米仕込みも行なったのは、醪初期における溶解が異なることを想定したためである。それぞれの仕込配合を Table1 にまとめて示した。なお、A 麹及び α 米 (岡山県産あけぼの) は徳島製麹 (株) 製を用い、また蒸米仕込みでは、麴米には美山錦 (精米歩合 70%)、掛米にはこしいぶき (有機米、精米歩合 70%) を使用した。醪における乾燥酵母の添加量は、一段仕込みにおいては、酵母菌数が $2 \times 10^5/\text{ml}$ になるように添加し、三段仕込みでは、添時に $1.8 \times 10^7/\text{ml}$ になるように添加した。生酸菌の添加量は、一段仕込みにおいては酵母と同数の $2 \times 10^5/\text{ml}$ になるように添加し、三段仕込みでは、麴 1g 当たり 2×10^5 個になるように添、伸及び留麴にそれぞれ添加した。また、三段仕込みにおいては、酵母の増殖の影響を考え、二日踊りを取る方法も実施し、通常の一 日踊り仕込みと比較した。仕込み温度は、一段仕込みにおいては、15℃ 一定で行い、三段仕込みでは、添 15℃、伸 12℃、留 10℃、留後 1 日 0.5℃ ず

Table 1 The formulae of raw materials for sake brewing

(1) One-step mashing with α -rice* and A-koji**		(3) Three-step mashing with α -rice and A-koji			
			Hatsuzoe	Nakazoe	Tomezoe
Total rice (g)	150.0	Total rice (g)	30.0	63.0	107.0
α -rice (g)	115.0	α -rice (g)	21.3	48.4	89.6
A-koji (g)	35.0	A-koji (g)	8.7	14.6	17.4
Water (ml)	270.0	Water (ml)	68.0	117.0	174.0
Lactic acid (ml)	0.2	Lactic acid (ml)	0.272	—	—
		Dry yeast (g)	0.06	—	—
					0.06

(2) One-step mashing with ordinary rice and koji		(4) Three-step mashing with ordinary rice and koji			
			Hatsuzoe	Nakazoe	Tomezoe
Total rice (g)	150.0	Total rice (g)	30.0	63.0	107.0
Steamed rice (g)	115.0	Steamed rice (g)	21.3	48.4	89.6
Koji (g)	35.0	Koji (g)	8.7	14.6	17.4
Water (ml)	210.0	Water (ml)	50.0	85.0	128.0
Lactic acid (ml)	0.2	Lactic acid (ml)	0.2	—	—
		Dry yeast (g)	0.06	—	—
					0.06

* α -rice, alphanized (pregelatinized) rice.

**A-koji, rice koji dehydrated and sterilized with absolute ethanol.

Mashing temperature : (1) and (2) are 15℃

(3) and (4) are 15℃ at Hatsuzoe (first addition), 12℃ at Nakazoe (second addition) and 10℃ at Tomezoe (third addition), and maximum temperature of the moromi (main mash) was 12℃.

つ温度を上げ、最高温度 12℃ の条件で行った。

結果及び考察

6. 一般分析

1) pH

堀場製の pH メーターにより測定した。

2) 酸度, アミノ酸及びアルコール濃度

国税庁所定分析法⁷⁾3-4 ～ 6 に従って測定した。

3) 残糖濃度

発酵液を 100 ～ 200 倍に希釈して、希釈液のグルコース濃度を和光製のグルコース C II テストワコーを用いて比色定量し、残糖濃度とした。

7. 発酵液の有機酸濃度の測定

HPLC を用いて行った。

分析条件は以下の通りである。

ポンプ：LC-5A, カラム：Shim-pack SCR-102H (7.9mmφ30cm) 2 本連結, 移動相 0.85% リン酸：水 (7：97v/v), カラム温度：50 及び 65℃, 流速：1.0 ml/min, 注入量：ポアサイズ 0.45μm のマイクロフィルターを用いてろ過した発酵液 15μl, 検出器：UV 210 nm, 測定：peak height 法によった。

1. 酵母の発酵性と菌数との関係

実験方法 4. によって求めた各供試酵母の培養時間における炭酸ガスの積算発生量（発酵曲線）と発酵液の分析結果をそれぞれ Fig.1 及び Table.2 に、また培養初期の酵母数の変化を Fig.2 に示す。この期間、すなわち培養開始 30 時間前後から培養約 70 時間までの間の炭酸ガス発生量は、K-1001-1 と他の酵母間に差が認められるが、この期間は Fig.2 に示すように、K701, K901, 及び K1001-2 では酵母数の最大値である約 1.0×10^8 /ml に至るまでの期間であり、一方、K-1001-1 では培養 70 時間後でも約 6×10^7 /ml にすぎず、その増殖速度は他の酵母の約 60% であった。K-1001-1 は、データは示さなかったがその後も増殖を続け、菌数が 1.0×10^8 /ml に至るのは、培養後 96 時間（4 日）以上経てからである。ちなみに Fig.2 から計算したこの培養条件における各酵母の倍增時間は、K-701, K-901 及び K-1001-2 が約 39.4 時間、K-1001-1 が 61.9 時間であった。発酵が安定し、酵母の菌数がほぼ一定になるいわゆる定常期（発酵 96 ～ 100 時間目、4 ～ 4.5 日以降、ただし、K1001-1 では未だ菌数

Fig. 1 Time course of fermentation by the dry yeasts tested.

● ; K-701, ○ ; K-901, ▲ ; K1001-1 and
△ ; K1001-2

Table 2 Results of analysis of Culture broth

	Alcohol (%)	Acidity (ml)	pH	Glucose (%)	CO ₂ generated
K701	9.6	1.95	3.16	0.45	9.85
K901	9.9	2.15	3.24	0.06	10.15
K1001-1	8.7	1.65	3.34	4.18	8.07
K1001-2	9.5	1.45	3.35	1.82	9.32

Cultivation conditions : 13 days at 15°C.

が増加し続けている。)の発酵曲線を Fig.1 から抜き出して Fig.3 に示すと、直線近似したそれぞれの酵母の発酵曲線(直線)の勾配がほぼ等しいことから、K-1001-1を含め、各酵母の発酵性には大きな差がないことがわかった。ところで、使用した各酵母の発酵性は約 0.31 ~ 0.29 ng/hr/cell と計算され、K1001-1を含め、各酵母間に大きな差はないことが裏付けられた。

使用時の各酵母の生菌率は、K1001-1 が 89%、K1001-2 は 88% で差はなく、K-701 と K-901 の生菌率もそれぞれ 88%、87% であったが、生菌率や発酵性にはほとんど差がないにもかかわらず、発酵(炭酸ガス発生量)に差が認められる理由は、生菌率よりも酵母の菌数であり、その値が最大になるまでの時間、すなわち増殖速度が大きな影響を与えることが明らかにな

った。つまり、増殖速度が小さい酵母、換言すれば、いわゆる活性度の低い酵母を使用した場合、醪が異常に長期化するなど、発酵に支障を及ぼすことが考えられた。

2. 生酸菌共存下における酵母の増殖速度が発酵に及ぼす影響

(1) A 麴とα米を用いた一段仕込み

Table 1 (1) に示す仕込配合にしたがい、増殖速度の異なる 2 種類の酵母、K1001-1 及び K1001-2 をそれぞれ初発菌数が 2×10^5 / g になるように添加し、さらに生酸菌(Na.8 及び S-4)は、全国の酒造場から収集した麴 20 点に夾雑する生酸菌の平均値(未発表データ、別報で報告を予定。)に基づき、麴 1g あたり 2×10^5 になるよう添加して発酵させた。結果を、Ta-

Fig. 2 Time course of yeast cell numbers at an early time (0 ~ 70 h) of cultivation. The symbols are the same as those for Fig. 1.

Fig. 3 Relationship between CO_2 generation by fermentation and cultivation time.

The straight lines are regression lines in the fermentation curve of the yeasts tested. The equations of regression and regression coefficients are shown :

- ; K701, $y = 0.668X + 0.913$, $R^2 = 0.998$
- ; K901, $y = 0.684X + 1.099$, $R^2 = 0.994$
- ▲ ; K1001-1, $y = 0.587X - 0.127$, $R^2 = 0.998$
- △ ; K1001-2, $y = 0.667X + 0.464$, $R^2 = 0.997$

ble 3 及び Fig.4 に示した。、生酸菌を添加した醪（仕込み No.5 ~ 10、ただし、S-4 による仕込み No.7 と 8 の発酵曲線は Fig.4 への記載を省略した。）でも、醪日数は生酸菌を添加しないものに比べ数日長くなる傾

向はあるが、製成酒のアルコール度数には大きな差はなく、最終的に 17% を超えた（仕込み No.5 のみ 16.7%）ことは興味深い。

仕込みから 3 ~ 5 日目までは、K1001-1（仕込み

Table 3 Analysis of sake brewed by one-step mashing using A-koji and α -rice.

No.	Yeast strain	Lact. bacteria strain	Lactic acid addition ¹⁾	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	pH	Extract (%)	Fermt. period (Day)	Lact. bacteria (/ml) ²⁾
1	K1001-1	—	—	— 3.0	18.1	3.5	2.25	3.97	6.3	25	—
2	K1001-1	—	+	0.0	18.7	3.3	2.15	4.01	5.8	23	—
3	K1001-2	—	—	1.0	18.5	2.7	2.05	4.25	5.6	18	2.4×10^6
4	K1001-2	—	+	2.0	18.8	3.3	2.00	4.22	5.5	18	8.5×10^5
5	K1001-1	No.8	—	1.0	16.7	14.3	2.50	3.38	5.1	26	1.2×10^9
6	K1001-1	No.8	+	4.0	17.4	13.6	2.60	3.41	5.0	26	9.3×10^8
7	K1001-1	S-4	—	5.5	17.3	12.7	2.55	3.45	4.6	26	2.0×10^9
8	K1001-1	S-4	+	6.0	17.3	12.0	2.50	3.47	4.6	26	1.4×10^9
9	K1001-2	No.8	—	3.0	17.4	12.2	2.70	3.48	6.1	25	9.9×10^8
10	K1001-2	No.8	+	4.0	17.1	11.7	2.80	3.50	6.2	25	8.4×10^8

1) Lactic acid was added to prevent contamination by micro-organisms. See Table 1 (1).

2) The number of lactic acid bacteria on the 8th day of fermentation.

Fig. 4 Fermentation time course of sake main mash.

 Fermentation No. 1 ; —●—, No. 2 ; …●… , No. 3 ; —○— ,
 No. 4 ; …○… , No. 5 ; —▲— , No.6 ; …▲… ,
 No. 9 ; —△— and No.10 ; …○… .

Refer to Table 3 for the fermentation number.

No.1, 2) と K1001-2 (仕込み No.3, 4) とでは、立ち上がりに差が認められるものの、5～15日目頃までは、発酵曲線の勾配から両者の発酵速度には差がほとんどないものと推定した。しかし、生酸菌添加醪では発酵8日目の生酸菌数が $8.4 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^9$ / ml となり、生成される酸の影響と思われるが、15日目以降は発酵速度が低下した。さらに、製成酒の成分では、増殖速度の小さい K1001-1 の方が K1001-2 に比べて

酸度が高くなる傾向にあった。また、No.5, 6 と No.7, 8 とを比較すると、生酸菌として No.8 株の方が S-4 株より生酸力が高いと推察され、以後の実験には生酸菌として No.8 株のみを使用した。以上から、酵母の増殖速度、すなわち菌数が最大値になるまでの時間の差異が醪の成分、特に酸度に影響を与えることが明らかになった。これは、酵母の増殖が遅れると、Fig.5 に示すように、その間に生酸菌が旺盛に増殖し、最大

Fig. 5 Time course of cell numbers of lactic acid bacteria during sake main mash fermentation. Sake main mash fermented with yeasts having different growth rates, K1001-1; ▲ and K1001-2; △.

菌数に約 5.5 倍の差が見られることに起因すると考えられた。

仕込み配合 Table 1 (1) による A 麹と α 米をそれぞれ蒸米に代えた場合 (仕込配合 Table 1 (2)) でも、酵母の増殖速度の違いによって酸度の上昇及び仕込み結果に影響が表れることを確かめたが、結果は A 麹及び α 米を用いた場合と同様の傾向であった。

以上の結果から、生酸菌を大量に添加した発酵試験では、酵母と生酸菌は互いに影響を受けながら増殖するため、酵母の活性度が低いと、酵母菌数が不足し、アルコールの生成が遅れるため生酸菌の生育が抑制されにくく、結果的に多酸醪になるが、酵母の最大菌数には大きな影響を及ぼすことはないため、醪日数は長くなるものの、製成酒のアルコール度数への影響は少ないという結果を得た。百瀬ら⁴⁾は、乳酸菌と酵母を混合培養すると、酵母の乾燥菌体あたりの発酵能 ($\text{QCO}_2\text{ul/mg/hr}$) は培養時間とともに著しく低下するが、これは栄養源の欠乏、特に窒素飢餓により酵母の死滅が著しく増加するためであるとし、酵母の生菌あたりの発酵能はむしろ増大するとしているが、我々の実験では酵母の著しい死滅は認められなかった。また、乳酸菌と清酒酵母との凝集³⁾についても見られなかった。これらの現象が認められなかったのは、供試した乳酸菌 (生酸菌) の性質が百瀬らの供試乳酸菌

(*L. plantarum*) と異なるためと考えられるが、くわしい理由については、さらに検討する必要がある。

(2) 実際の清酒醪を想定した生酸菌添加発酵試験

実際の醪を想定し、初発酵母密度は実際の乾燥酵母仕込みと同等にし、生酸菌 No.8 を添、仲及び留麹それぞれに麹 1g あたり 2×10^5 個添加して、A 麹及び α 米使用による総米 200g の三段仕込み (仕込配合 Table 1 (3)) をおこなった。また、酵母数を増やす方法として二日踊りの効果についても検討した。なお、対照株には乾燥酵母 K701 を用い、結果とともに Table 4 に示すように、計 12 本の小仕込みをおこなった。

活性度の低い酵母 (K1001-1) を使用した仕込み (仕込み No.7, 踊り 1 日) では、Fig.6 に示すように、他に比べて発酵に大幅な遅れを生じ、酸度も高くなった (Table 4)。しかし、二日踊りを採用 (仕込み No.10) ことにより、醪における発酵の遅れは改善され (Fig.6)、酸度の上昇も抑えられた。また、生酸菌数を測定した結果は、Fig.7 に示すように明らかに二日踊りの方が少ない菌数で推移していることがわかった。この結果から、二日踊りをとることによって、酵母の増殖に時間的な余裕が与えられる一方、生酸菌の増殖が抑えられるため、結果として醪の汚染を抑えることができる可能性が示された。

蒸米を用いた三段仕込み (仕込配合は、Table 1

Fig. 6 Fermentation time course of sake main mashes.

●; K1001-1, ○; K1001-2, and period of *odori* —; 1 day, ---; 2 days.

Table 4 Analysis of Sake brewed with *Lactobacillus paracasei* No.8.

No.	Yeast strain ¹⁾	<i>L. paracasei</i> addition	<i>Odori</i> ²⁾ (Day)	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino-acidity (ml)	pH	Extract (%)	Fermt. period (Day)
1	K1001-1	—	1	— 2.0	16.7	2.8	1.0	4.3	5.7	28
2	K1001-2	—	1	4.5	18.2	2.5	1.1	4.2	5.0	25
3	K701	—	1	3.0	17.8	2.6	1.0	4.2	5.2	25
4	K1001-1	—	2	3.0	17.8	2.8	1.2	4.2	5.2	25
5	K1001-2	—	2	7.0	18.4	2.5	1.1	4.1	4.6	25
6	K701	—	2	7.0	18.7	2.8	1.0	4.1	4.7	26
7	K1001-1	+	1	2.0	17.7	3.5	1.0	4.1	5.2	28
8	K1001-2	+	1	4.0	17.8	2.4	1.1	4.2	5.0	25
9	K701	+	1	6.0	18.2	2.5	1.0	4.2	4.8	26
10	K1001-1	+	2	— 1.5	17.7	2.7	1.3	4.2	5.5	26
11	K1001-2	+	2	9.0	18.4	2.5	1.1	4.2	4.3	26
12	K701	+	2	6.0	18.0	2.5	0.9	4.0	4.7	25

Each sake was brewed with α -rice and *A-koji*.

Formula of raw materials for sake brewing are given in Table 1 (3).

1) Yeast used was *Kyokai dry sake yeast*. K701 was used as for reference.

2) The day following *Hatsuzoe*, the mash is kept stationary. This resting stage is called *Odori*.

(4) による。)でも、 α 米を用いた試験と同様の結果を得た(データの記載は省略した)。醪における生酸菌数は、踊り1日の仕込みでは、K1001-1の場合、 10^7 /mlを越えて推移したが、K1001-2では 10^5 /ml程度に止まった。また、踊り2日仕込みでは、K1001-1及びK1001-2仕込み共に踊り1日仕込みの場合の菌数を越えることがなかった。(Fig. 7)

以上の結果から、酵母の活性度が高く、酵母数が速やかに 10^8 /mlに達すると、生酸菌の増殖に勝り、その後の発酵は順調に推移する。たとえ、酵母の活性度が正常の60%程度と低くても、踊りを2日とすることでK1001-2のように通常の増殖速度を示す酵母と同様の酵母数、約 2.0×10^8 /mlを確保できればその後の発酵は順調に推移する。これは、生酸菌の増殖

Fig. 7 Growth curve of Lactic acid bacteria No. 8 in sake main mash. Fermentation by yeast K1001-1 and 1 day *odori*; ●, 2 days *odori*; ○, K1001-2 and 1 day *odori*; ▲, and 2 days *odori*; △.

が共存する酵母の増殖速度の影響を受けることにより異なり、この条件下では Fig. 7 から計算した生酸菌の倍增時間 (Doubling time) が、K1001-1 との共存下では 87.5 hr で、一方 K1001-2 との共存下では 367.7 hr と推定され、酵母の倍增時間、K-1001-2 が約 39.4 時間、K-1001-1 では 61.9 時間 (前項 1. 参照) に比べて極端に長いためであると考えた。

以上の諸結果を総合すると、三段仕込みにおいて、添 (約 12℃)、伸 (約 10℃)、留 (6～8℃) それぞれの仕込み時に酵母数が $1.7 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8$ / ml 確保されていれば、新たに麴、蒸し米、及び汲水が添加され、酵母数が $7.5 \times 10^7 \sim 8.5 \times 10^7$ / ml と希釈され、雑菌の活動を抑制するため酒母から持ち込まれる乳酸の濃度が添、伸、及び留仕込みによって順次 2.8 倍、6.9 倍、14.2 倍に希釈されていくにも拘わらず、仮に麴から 2.0×10^5 / g 程度の No.8 株のような生酸菌が持ち込まれたとしても、翌日には酵母数が 2.0×10^8 / ml に回復するので、その後の発酵は順調に推移する。しかし、増殖速度が約 60% に低下している K1001-1 では、踊り 1 日後 (伸仕込み直前) でも 9.5×10^7 / ml に留まり、生酸菌に旺盛な増殖の機会を与えることになる。しかし、伸仕込みを 1 日延ばして、踊りを 2 日間にすれば伸仕込み時の酵母数は $2.0 \times$

10^8 / ml に達することから、正常な酵母の場合とほぼ同じ酵母数になり問題は解決する。すなわち、活性度の低い酵母を使う場合には、その増殖速度が約 60% 程度までの低下なら、2 二日踊りをとることは醪を正常な発酵に戻すことができる有効な手段であると考えられる。ちなみに本実験における K1001-2 の添、伸、留時の倍增時間はそれぞれ 16.2 hr、24.0 hr、及び 24.9 hr と計算された。しかし、醪のこの時期における酵母の発酵速度については実測していないので、二日踊りによるその後の醪の発酵遅滞解消には、アルコール生成による生酸菌の抑制による効果も否定できないと思われる。

以上の知見から、生醪系酒母の製造においては、麴や器具などから持ち込まれる乳酸菌の性質や酵母の活性度 (増殖速度) に留意することと、醪における踊りの状ぼう (発酵状態) をよく観察し、適切な対応をとることがその後の発酵を正常に導く上で重要であると考えた。

3. 生酸菌の存在が製成酒の成分に与える影響

酵母の活性度や二日踊りによって生酸菌の増殖が抑制されても、生酸菌の存在が製成酒の成分に何らかの影響を与えている可能性が考えられるので、有機酸の

Table 5 Results of analyses of organic acid of the sake

No.	Citrate	Pyruvate	Malate	Succinate	Lactate	Fumarate	Acetate	Pyroglutamate
1	145	6	329	478	477	7	45	32
2	111	11	276	444	430	6	44	28
3	137	4	344	471	456	8	38	34
4	140	67	243	471	473	4	44	36
5	145	2	70	454	802	0.2	45	36
6	116	4	244	410	430	5	44	31
7	128	3	112	471	683	5	56	31
8	157	47	202	471	466	3	67	36

The numerical values are ppm.

組成を分析し、結果を Table 5 に示した。活性度の低い K1001-1 使用仕込みでは、リンゴ酸が減少し、乳酸が増加した。これは、生酸菌がリンゴ酸を分解し、乳酸に変換する、いわゆるマロラクティック発酵が生起していることが考えられた。この現象の解析については、別報で詳しく検討する予定である。

要 約

活性度の低い酵母を使用した時の生酸菌の動向を調べた。酵母の増殖速度が正常の約 1/2 程度に低下した酵母、いわゆる活性度の低い酵母を仕込みに用いた場合、醪初期の酵母数が不足 (1×10^8 / ml 以下) することにより、アルコール生成も遅れることから、生酸菌はもろみで旺盛に増殖を始め、その結果として酸度が高くなり、醪は酸敗する。しかし、二日踊りを使って酵母数を充分確保することができれば、活性度の低い酵母を用いても、もろみの酸敗をかなりの確率で防止できることを明らかにした。

参考文献

- 1) 恩田 匠：醸協，**98**, 148-151 (2003)
- 2) 外池良三，百瀬洋夫：醸協，**56**, 628-632 (1961)
- 3) 百瀬洋夫，土井清太郎，外池良三：醸協，**63**, 682-685 (1963)，百瀬洋夫，外池良三，岡崎直人：醸協，**63**, 686-688 (1963)
- 4) 小泉隆司，百瀬洋夫，外池良三：醸協，**63**, 871-873 (1963)
- 5) 戸塚堅二郎：卒業論文（東京農業大学）(2010)
浅野行蔵，富永一哉，吉川修司，田村吉史，柿本雅史，北村秀文，森本良久，津村 弥：醸協，**94**, 338-345 (1999)
- 6) 浅野行蔵，富永一哉，吉川修司，田村吉史，柿本雅史，北村秀文，森本良久，津村 弥：醸協，**94**, 338-345 (1999)
- 7) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解，p.233, p.14-23 (財) 日本醸造協会，東京 (2006)