もろみ中における酵母の増殖に及ぼす乳酸

クエン酸及び温度の影響

泡盛酵母の特性 (第 2 報)

中田久保・大沢 忍・長野雄人・安河内 毅・坂井 勲

(東京農業大学醸造科)

昭和 56 年 12 月 7 日受理

Effect of Lactic Acid, Citric Acid and Temperature on

Growth of Yeasts in Mash

Characteristic of Awamori Yeasts (Part 2)

Hisayasu NAKATA, Shinobu OHSAWA, Takehito NAGANO,

Takeshi YASUKOUCHI and Takashi SAKAI

(Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of Agriculture)

Number of sake yeast cells were predominant than other industrial yeasts, after incubation at 25° for 6 days in the mash used lactic acid.

Number of awamori yeast cells were predominant than other industrial yeasts, after incubation at 30° for 6 days in the mash used citric acid.

Dyeing with 0.1% methylene blue of awamori yeasts were lower than other industrial yeasts, after incubation at 35° for 6 days in the mash used citric acid.

Awamori yeasts have favorable characteristic to high incubation temperature.

緒 言

清酒もろみ、焼酎もろみ、ワインもろみから分離した *Saccharomyces* 属は各々独自の type¹⁾ であり、それぞれに異なった性質を示す。

筆者らは前報²⁾で S 55 BY における沖縄本島の 5 酒造場の泡盛こうじ各 1 点から 21 株、それらのこうじの集積培養液から 25 株、それぞれの工場のもろみ各 1 点から 25 株、計 71 株の *Saccharomyces cerevisia* を分離し、これらの酵母の性質について調べたところ 69 株が Yeastcidin の抵抗性一、*Lactobacillus casei* との凝集性 +、高泡の形成 +W~+、クエン酸カリウム除去ビタミン欠培地での増殖一と泡盛酵母の特性を示したことを報告³⁾した。そこで本報では何故泡盛酵母により泡盛もろみが支配されるかにつき、この要因を追求すべく実験を進めた。まずこの要因と考えられた泡盛もろみの環境、即ち黒こうじ菌を使用することによるもろみ中のクエン酸の存在、高温期である夏にも仕込みが行なわれるもろみの高温、さらに連醸仕込みである点に着目し、乳

酸、クエン酸存在下におけるそれぞれの酵母の増殖に及ぼす温度の影響につき検討した。

実 験 方 法

1. もろみの配合

乳酸添加もろみの配合は、蒸米 180 g、乳酸 (75%) 1.4 ml、グルク 100, 72 mg、汲水 200 ml とした。クエン酸添加もろみは蒸米 180 g、水飽和クエン酸 0.8 ml、KCl 200 mg、グルク 100, 72 mg、汲水 200 ml とすべて酵素剤仕込みとした。なお使用蒸米はすべて 75% 精米の白米を用いた。

2. 仕込み方法

500 ml の容綿栓殺菌三角フラスコに蒸米 180 g を加えた後、それぞれ乳酸、クエン酸、酵素剤、KCl を予じめ汲水に溶解しておきこれを各々に 200 ml ずつ添加した。

3. 酵母の添加方法

各々の醸造酵母を Balling 10° こうじ汁に 30°, 72 時間培養し、もろみ容量に対して 2.0×10^5 /ml となるよう仕込むと同時に添加した。

4. 一般分析

国税庁所定分析法注解によった。

5. 酵母数の測定及び死滅率

各々のもろみを 100 ml 容ビーカーに 10 g 秤量し，40 ml の水を加えて十分に攪拌後，その懸濁液 1 ml を試験管に採り 0.2% メチレンブルー液 1 ml を加えてよく混和して試料とし，ヘチマチトメーターにて酵母細胞数を測定すると同時にメチレンブルーに染色された細胞数をも測定し死滅率とした。

結果及び考察

1. 25°，6 日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分

乳酸を添加した 25°，6 日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分ならびに酵母細胞数及び死滅率を Table 1, A に示し，同じくクエン酸を添加したものを B に示した。

乳酸添加 25° のもろみでは酵母数で清酒酵母群が $1.2 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^8/\text{ml}$ とワイン酵母，パン酵母，ビール酵母群の $3.0 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^7/\text{ml}$ ，泡盛酵母群の $7.7 \times 10^7 \sim 9.0 \times 10^7/\text{ml}$ を上まわる結果であり，また一般成

分では清酒酵母の酸度が 5.8～6.4 と他の醸造酵母群の 6.4～7.5 と比較し酵母数が多いにもかかわらず低い値を示した。アルコールは清酒酵母群の 9.2～13.0% が他の醸造酵母群の 7.3～12.2% を上まわる値であった。

クエン酸添加 25° のもろみでは，清酒酵母群が他の醸造酵母群とくらべ乳酸添加の場合同様酸度は低く，アルコールは高い結果を得た。しかし酵母細胞数で清酒酵母群が $1.1 \times 10^8 \sim 2.8 \times 10^8/\text{ml}$ と乳酸添加とほぼ同じ数値を示したのに対し，泡盛酵母群が $1.6 \times 10^8 \sim 2.7 \times 10^8/\text{ml}$ と乳酸添加にくらべきわめて多くなり清酒酵母群との差異が見受けられない数値に達した。

すでに筆者らは清酒酵母群の microflora の形成要因の追求^{3,4)}で報告しているが，清酒酵母は乳酸存在下においての高濃度仕込みの環境下に適した酵母であるとの見地を得ており，本報でもこの点同様の結果を得た。さらに本報における結果より泡盛酵母群はクエン酸存在下の環境に適した酵母であるものと考えられる。

なお死滅率は清酒酵母群と泡盛酵母群の間にはほとんど差異が見受けられなかったが，ビール酵母群，ワイン酵

Table 1 Analytical values in mashes after incubation at 25° for 6 days

A	(Used lactic acid)								
	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
A21	4.4	6.9	0.6	5.4	3.4	8.5×10 ⁷ /ml	14.2	12.2	
C 1	5.5	7.2	0.5	7.2	3.2	8.2×10 ⁷ /ml	1.0	8.5	
C(F) 1	4.8	7.5	0.6	7.5	3.2	9.0×10 ⁷ /ml	1.9	8.7	
C(M) 1	5.0	7.2	0.4	7.2	3.2	7.7×10 ⁷ /ml	2.2	8.0	
(Sake)									
Kyokai No.6	2.8	5.8	0.6	5.0	3.4	2.5×10 ⁸ /ml	7.0	9.2	
Kyokai No.7	3.9	6.4	0.6	3.6	3.4	1.8×10 ⁸ /ml	4.6	9.8	
Kyokai No.8	5.0	5.8	0.5	5.8	3.45	1.9×10 ⁸ /ml	1.9	9.9	
Kyokai No.9	4.0	6.2	0.7	5.4	3.5	1.2×10 ⁸ /ml	2.1	13.0	
IFO 2000 (Brewer's)	9.4	6.4	0.6	13.4	3.1	3.3×10 ⁷ /ml	14.8	7.3	
IFO 2045 (Baker's)	6.2	6.7	0.6	7.3	3.25	3.3×10 ⁷ /ml	6.25	8.7	
IFO 2220 (Wine)	6.0	6.7	0.5	7.9	3.5	3.0×10 ⁷ /ml	25.0	8.0	

Each yeast was precultured at 30°C for 72 hours in koji extract medium (Balling 10°).

Yeast cells were inoculated into mashes at a concentration of $2.0 \times 10^5/\text{ml}$.

Analytical values in mashes after incubation at 25° for 6 days.

B	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	(Used citric acid)	
								Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
	A21	4.7	4.7	0.5	5.1	3.6	2.7×10 ⁸ /ml	5.3	11.3
	C 1	8.4	6.4	0.5	9.1	3.3	2.3×10 ⁸ /ml	6.6	8.4
	C(F) 1	8.3	6.4	0.5	8.4	3.3	1.6×10 ⁸ /ml	2.4	8.4
	C(M) 1	7.3	7.4	0.6	8.0	3.25	2.7×10 ⁸ /ml	0.9	9.0
(Sake)									
	Kyokai No.6	5.9	5.0	0.6	4.9	3.6	2.8×10 ⁸ /ml	2.6	10.9
	Kyokai No.7	5.0	4.7	0.5	5.0	3.5	1.1×10 ⁸ /ml	3.2	11.4
	Kyokai No.8	6.2	4.5	0.5	5.7	3.55	2.2×10 ⁸ /ml	3.1	10.8
	Kyokai No.9	7.2	4.6	0.5	7.8	3.5	2.5×10 ⁸ /ml	2.0	9.3
	IFO 2000 (Brewer's)	7.4	5.2	0.5	8.6	3.6	4.4×10 ⁷ /ml	15.7	9.8
	IFO 2045 (Baker's)	7.3	5.4	0.5	5.9	3.5	1.4×10 ⁸ /ml	2.6	9.5
	IFO 2220 (Wine)	6.7	4.6	0.6	7.3	3.9	3.4×10 ⁷ /ml	47.3	10.0

母群は共に乳酸，クエン酸添加共高い値を示した。

2. 30°，6日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分

乳酸を添加した 30°，6日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分ならびに酵母細胞数及び死滅率を Table 2, A に示し，同じくクエン酸を添加したものを B に示した。

乳酸添加 30° のもろみでは 25°，乳酸添加もろみに比較し清酒酵母群の酵母数は $1.4 \times 10^8 \sim 2.1 \times 10^8/\text{ml}$ (25°， $1.2 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^8/\text{ml}$)，酸度 6.8～7.2 (25°，5.8～6.2)，アルコール 9.7～12.7% (25°，9.2～13.0%) とほとんど差異を認めないが，死滅率で 25° では 1.9～7.0% が 30° では 9.5～17.0% と 2 倍以上の高い値を示す結果となった。しかし泡盛酵母群は成分値では 25° の場合と比較しほとんど差異を認められないが，酵母数で $1.4 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8/\text{ml}$ と 25° ($7.7 \times 10^7 \sim 9.0 \times 10^7/\text{ml}$) の場合と比較し，2 倍以上の値を示し清酒酵母群と同じ酵母数になった。さらに死滅率で 3.6～12.1% と 25° (1.0～14.2%) の場合に比較し差異がなく明らかに高温適性のある性質を示している。

他の醸造酵母群は酵母数で $1.9 \times 10^7 \sim 4.8 \times 10^7/\text{ml}$ と清酒，泡盛酵母群に比較して極端に少なく，死滅率も 8.1～34.4% と高くいずれも高温阻害をうけていると考

えられる。

30°，クエン酸添加もろみの結果は Table 2, B で明らかにのように泡盛酵母群の細胞数が $1.0 \times 10^8 \sim 2.4 \times 10^8/\text{ml}$ とその他の醸造酵母群の $3.8 \times 10^7 \sim 9.9 \times 10^7/\text{ml}$ に比較してはるかに高い数値を示し，死滅率でも泡盛酵母群は 2.8～13.2% と他の醸造酵母群の 4.0～23.2% と比較し低い値を示し，ここでも高温適性が考えられると共に，クエン酸の存在が乳酸に比べ泡盛酵母のもろみ中における酵母数の増大を助長していると判断した。しかし酵母数及びその生存率で他の醸造酵母群にまさるにもかかわらずアルコールの生産で清酒酵母におとる結果であった。

3. 35°，6日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分

乳酸を添加した 35°，6日目の各々の醸造酵母使用もろみの成分ならびに酵母細胞数及び死滅率を Table 3, A に示し，同じくクエン酸を添加したものを B に示すが，25°，30° の経過に比べ明らかに高温の影響を受け，酵母細胞数で大部分の酵母が $10^7/\text{ml}$ 台と減少し，死滅率も 50% を越えたものがほとんどであった。しかし酵母数で微差ではあるが泡盛酵母群が他の醸造酵母群に比較してまさり，アルコール生産でも 25°，30° では常に清酒酵母群が高い値を示していたが，35° では泡盛

Table 2 Analytical values in mashs after incubation at 30° for 6 days

A	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	(Used lactic acid)	
								Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
	A21	4.2	7.0	0.9	6.1	3.15	1.5×10 ⁸ /ml	12.1	12.6
	C 1	5.9	8.0	0.6	9.1	2.9	2.2×10 ⁸ /ml	3.6	9.6
	C(F) 1	6.0	7.8	0.6	8.9	3.0	2.2×10 ⁸ /ml	3.7	9.0
	C(M) 1	6.6	7.3	0.7	10.1	3.1	1.4×10 ⁸ /ml	5.4	8.8
(Sake)									
	Kyokai No.6	6.7	7.2	0.6	8.3	3.3	1.5×10 ⁸ /ml	9.5	9.7
	Kyokai No.7	5.5	7.0	0.7	8.4	3.1	2.1×10 ⁸ /ml	11.4	10.0
	Kyokai No.8	3.3	6.2	0.8	4.6	3.3	1.4×10 ⁸ /ml	10.0	11.9
	Kyokai No.9	4.3	6.8	0.7	6.4	3.2	1.4×10 ⁸ /ml	17.0	12.7
	IFO 2000 (Brewer's)	8.1	6.9	0.7	5.8	3.0	1.9×10 ⁷ /ml	13.3	8.5
	IFO 2045 (Baker's)	6.6	6.4	0.8	9.3	3.15	4.8×10 ⁷ /ml	34.4	10.0
	IFO 2220 (Wine)	8.0	86.6	0.8	13.1	3.2	4.6×10 ⁷ /ml	8.1	9.2

Analytical values in mashs after incubation at 30° for 6 days

B	(Uded citric acid)								
	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
A21	3.5	5.8	0.8	3.6	3.7	1.0×10 ⁸ /ml	13.0	12.2	
C 1	7.2	7.8	0.6	8.4	3.2	2.5×10 ⁸ /ml	5.6	8.5	
C(F) 1	7.0	8.6	0.6	7.3	3.1	2.1×10 ⁸ /ml	2.8	8.7	
C(M) 1	7.0	8.8	0.8	8.5	3.2	2.4×10 ⁸ /ml	4.3	8.0	
(Sake)									
Kyokai No.6	4.0	6.0	0.8	3.8	3.7	9.9×10 ⁷ /ml	4.0	11.5	
Kyokai No.7	3.4	6.0	0.7	4.7	3.5	8.4×10 ⁷ /ml	10.4	12.0	
Kyokai No.8	4.8	5.6	1.0	4.5	3.7	8.3×10 ⁷ /ml	13.6	12.4	
Kyokai No.9	3.3	5.8	1.0	3.6	3.7	8.3×10 ⁷ /ml	15.4	13.0	
IFO 2000 (Brewer's)	6.3	5.6	0.8	9.7	3.7	5.8×10 ⁷ /ml	16.4	8.3	
IFO 2045 (Baker's)	6.6	5.8	0.8	5.8	3.4	5.5×10 ⁷ /ml	9.1	8.7	
IFO 2220 (Wine)	6.5	4.6	1.0	8.4	3.9	3.8×10 ⁷ /ml	23.2	8.0	

酵母群がやや高い値を示した。

35°, クエン酸添加のもろみの結果は Table 3, B に示すが，酵母数で泡盛酵母が 25°, 30° クエン酸添加のものに比較し $8.8 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ (25°, $1.6 \times 10^8 \sim 2.7 \times 10^8/\text{ml}$, 30°, $1.4 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8/\text{ml}$) と減少したにもかかわらず，アルコールは 10.2～13.0% (25°, 8.4～11.3%, 30°, 8.0～12.2%) と最も高い値を示した。なお死滅率においても 15.2～38.7% と他の醸造酵母の 33.3～62.6% と比較して最も低い値を示しているところより，泡盛酵母はクエン酸存在下における高温もろみに適合性を有する特徴をもつ酵母であると考えられる。

なお本実験に使用した泡盛酵母の A 21 は乾⁵⁾の分離した菌株であり，C 1, C(F)1, C(M)1 は筆者らが分離し前報³⁾にてその特性を報告している菌株である。C 1, C(F)1, C(M)1 にくらべ A 21 株は乳酸，クエン酸等の酸類にさほどの影響を受けず，また 25～35° の温度範囲で 12～13% のアルコール生産をする安定した特徴をもつ酵母である。

最近玉城ら^{6,7)}が泡盛の醸造にすぐれた酵母を分離し泡盛 1 号酵母と命名，泡盛もろみに添加利用しているが，A 21 株をも含めて筆者らが分離した酵母の特性をさら

に追求し，添加酵母と野生酵母との区別が可能かどうかを明確にしたい。

要 約

25°, 6 日間保温の乳酸使用もろみ中においては清酒酵母群が他の醸造酵母に比較し最も優位に増殖した。30°, 6 日間保温のクエン酸もろみ中になると泡盛酵母群が最も優位に増殖した。また泡盛酵母群は 35° 6 日間保温のクエン酸使用もろみ中において 0.1% メチレンブルーによる死滅率が他の醸造酵母に比較し最も低い値を示し高温適性をもつ酵母であった。

文 献

- 1) 竹田，塚原：農学集報 16 59 (1971)
- 2) 中田，小柳，山田，坂井：醸協 76 (9) 620 (1981)
- 3) 中田，金子，後藤，毛岐，坂井：醸協 75 (11) 915 (1980)
- 4) 中田，金子，後藤，毛岐，坂井：醸協 75 (11) 921 (1980)
- 5) 乾：J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo, 15, 465 (1901)
- 6) 玉城，忍頂寺，今村，原田：醸協 76 (1) 59 (1981)
- 7) 玉城，忍頂寺，高江州，下地，玉那覇：醸協 76 (3) 198 (1981)

Table 3 Analytical values in mashs after incubation at 35° for 6 days

A	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	(Used lactic acid)	
								Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
	A21	12.0	6.7	0.8	26.9	3.3	$2.1 \times 10^7/\text{ml}$	22.0	4.5
	C 1	11.5	6.3	0.8	26.1	3.3	$5.5 \times 10^7/\text{ml}$	63.6	7.0
	C(F) 1	10.2	6.8	0.7	25.5	3.3	$3.9 \times 10^7/\text{ml}$	70.9	7.0
	C(M) 1	11.1	6.4	0.8	24.5	3.3	$5.0 \times 10^7/\text{ml}$	50.0	6.0
(Sake)									
	Kyokai No.6	11.8	6.6	0.9	25.4	3.3	$1.9 \times 10^7/\text{ml}$	73.9	6.2
	Kyokai No.7	10.4	6.8	0.7	21.0	3.3	$4.7 \times 10^7/\text{ml}$	66.1	7.3
	Kyokai No.8	12.3	6.6	0.9	25.7	3.3	$2.3 \times 10^7/\text{ml}$	40.7	5.0
	Kyokai No.9	14.2	5.8	0.9	31.6	3.3	$1.4 \times 10^7/\text{ml}$	60.9	2.8
	IFO 2000 (Brewer's)	12.8	6.1	1.0	27.0	3.3	$1.4 \times 10^7/\text{ml}$	35.2	4.5
	IFO 2045 (Baker's)	15.5	5.6	0.8	35.0	3.3	$8.3 \times 10^6/\text{ml}$	91.3	0.8
	IFO 2220 (Wine)	14.0	5.8	0.8	30.8	3.3	$2.0 \times 10^7/\text{ml}$	91.7	3.0

Analytical values in mashs after incubation at 35° for 6 days

B	Strain	Bé	Acidity	Formal-nitrogen	Direct suger	pH	Number of yeast cells	(Used citric acid)	
								Ratio of dyeing by 0.1% methylen bule(%)	Alcohol (%)
(Awamori)									
	A21	6.0	5.6	1.2	13.8	3.8	9.7×10 ⁷ /ml	38.7	13.0
	C 1	7.2	6.8	0.8	13.5	3.5	9.0×10 ⁷ /ml	20.4	10.2
	C(F) 1	6.2	7.0	1.0	12.7	3.5	8.8×10 ⁷ /ml	21.7	11.0
	C(M) 1	6.4	7.4	1.0	12.1	3.5	1.0×10 ⁸ /ml	15.2	10.6
(Sake)									
	Kyokai No.6	8.2	5.4	1.2	16.6	3.9	8.5×10 ⁷ /ml	51.0	9.7
	Kyokai No.7	6.3	5.6	1.1	12.7	3.9	8.4×10 ⁷ /ml	44.3	8.4
	Kyokai No.8	7.4	4.4	1.2	17.1	3.9	7.2×10 ⁷ /ml	45.3	10.3
	Kyokai No.9	7.3	5.6	1.2	14.7	3.85	8.9×10 ⁷ /ml	62.6	9.6
	IFO 2000 (Brewer's)	11.2	3.8	1.0	22.0	3.9	3.2×10 ⁷ /ml	44.7	6.0
	IFO 2045 (Baker's)	10.3	4.3	1.2	18.6	4.0	7.3×10 ⁷ /ml	36.8	5.6
	IFO 2220 (Wine)	10.1	3.8	1.2	20.4	4.0	4.1×10 ⁷ /ml	33.3	6.7