生存能の高い焼酎用酵母を用いた実験室規模での 返し仕込みによる蒸留残液からの焼酎製造

木田建次, 中川 優, 西迫博行, 森村 茂

(熊本大学工学部物質生命化学科)

平成 8 年 11 月 14 日受理

Production of *Shochu* from Post-Distillation Slurry in Laboratory-scale by a
Newly Developed Recycling Process Using a High Viability *Shochu* Yeast.

Kenji KIDA, Masaru NAKAGAWA, Hiroyuki NISHISAKO, Shigeru MORIMURA

(Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Faculty of Engineering,

Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken, 860)

A newly developed rice-*shochu* making process which reduces waste production and process cost has been studied. The low-waste process involved addition of the post-distillation slurry from the conventional method to *moromi*. In our previous report we bred *shochu* yeasts with high viability and selected from strain S20 E12. In this report, firstly, by using strain S20 E12 we examined various conditions for preparing post-distillation slurry suitable for the newly developed recycling process of *shochu* making. It was found that suitable post-distillation slurry was derived from *moromi* with more than 30% *koji* ratio and 8 to 10 days of second-stage fermentation period in the conventional method. The activity of saccharifying enzymes remained stable and viable cell number was high, being 4.7×10^7 cells/ml after vacuum distillation at -63 cmHg and 45°C for four hours. On the basis of these results, we studied optimum conditions for the newly developed recycling process. *Moromi* consisting of 138 g steamed rice and 175 ml post-distillation slurry without addition of yeasts, rice-*koji*, and water, was fermented at 25°C for 4 different fermentation periods. Viable cell number was 3.7×10^8 cells/ml on the 8th day and 1.1×10^8 cells/ml on the 15th day. But there was a rapid increase of sulfur compounds and α -amino compounds, especially in prolonged fermentation. Distillate of the *moromi* showed increase of acetaldehyde concentration and decrease of flavor compound with longer fermentation time. The results suggest that distillation on *moromi* soon after completion of 8 day fermentation would make good quality *shochu* by the newly developed recycling process.

Key words : 焼酎蒸留残液, 返し仕込み, 生存能の高い焼酎酵母

緒 言

焼酎蒸留残液の海洋投棄が, 2001 年までに禁止される。また焼酎の酒税がウィスキーに比べて低いのはガット違反であると認定された¹⁾。これらは焼酎業界にとって死活問題であり, 製造コストの低減をも含め

た蒸留残液の効率的処理法の開発は緊急の問題である。

そこで, これらの問題点を解決するために返し仕込みによる焼酎蒸留残液からの焼酎製造に関する検討を行っている。返し仕込みによる焼酎製造法とは, 従来法により焼酎製造を行った時に蒸留工程から排出される蒸留残液を用いて焼酎を製造するものである。すな

わち、従来法と返し仕込みを組み合わせたもので、返し仕込みで焼酎を製造した時に初めて蒸留残液が排出されることになるので、蒸留残液量は焼酎製造量に対して半減することになる。しかし、この方法を実用化するためには酒質が低下しない焼酎を製造しなければならないことから、前報²⁾において生存能の高い焼酎酵母の育種を試みた。その結果、自己消化法により取得したエタノール耐性株は、多くの酵母において野生型株よりも生存能が向上することが分かった。そして、この生存能の向上した酵母の中から、官能的にも優れていた S 20 E 12 株を最優秀株として選抜した。

本報では、選抜した S 20 E 12 株を用いて実験室規模での返し仕込みによる焼酎製造に関する研究を、①従来仕込み条件の返し仕込みへの影響、②減圧蒸留中の醪成分、生菌数及び酵素活性の変化、③実験室規模での返し仕込みによる焼酎製造条件の検討、および④焼酎蒸留残液の冷却時間の影響の手順で行い、実用化のための基礎データの取得を試みた。その結果、実験室規模で返し仕込みによる米焼酎製造技術を確立することができたので、報告する。

実験方法

1. 使用菌株

官能試験に於て評価が高く、かつ生存能の高いことから最優秀株として選抜されたエタノール耐性株 S 20 E 12 を用いた²⁾。

2. 使用培地および菌株の保存方法

2%YPD 斜面培地および 11% エタノール含有 2%YPD 斜面培地の調製は、前報²⁾に記載した方法に

より行った。また、エタノール含有斜面培地での保存も前報に従って行った。

3. 従来法による小スケール (200 ml) および中スケール (2 l) での小仕込み試験

前報²⁾に記載した方法に準じて行った。但し、小スケールにおいては麴歩合が 10~40% の条件で行ったので、その時の仕込み割合を Table 1 に示した。

4. 小スケール (約 100 ml) および中スケール (2 l) での返し仕込み試験

前報²⁾に記載した方法で酵母を培養した後、酵母量が 2.0×10^9 個になるように集菌、洗浄後、この洗浄菌体を蒸留残液 65 ml で 300 ml 三角フラスコに洗い込んだ。これに蒸米 51 g (掛米 39.2 g) を加え、三角フラスコの上部をサランラップで覆った後、25°C で静置培養した。仕込み期間中は 1 日 1 回三角フラスコを手で振り混ぜた。但し、この時使用した蒸留残液は上述した麴歩合の異なる最終醪 200 ml を後述する減圧蒸留の方法に準じて行ったものであるが、この時の操作圧だけは -73 cmHg であった。

中スケールでの返し仕込み試験は、麴歩合 33% の二次最終醪 1,600 ml を後述する減圧蒸留法で蒸留した残液を用いて行った。本試験では酒母や麴を一切加えることなく、ただ 2 l の三角フラスコに蒸留残液の 900 ml と蒸米 710 g (掛米 546 g) だけを加え、その後三角フラスコの口をサランラップで覆った後、小スケールと同じ方法にて行った。

5. 減圧蒸留試験

2 l スケールで小仕込み試験をした二次最終醪を減圧蒸留試験に供した。Fig.1 にその減圧蒸留装置を示

Table 1 Proportions of materials for laboratory-scale *shochu* making by the conventional method.

Koji ratio	First-stage <i>moromi</i> fermentation			Second-stage <i>moromi</i> fermentation		
	<i>koji</i> rice	<i>koji</i>	water	rice	steamed rice	water
40 %	24.5 g	27.3 g	29.4 ml	61.2 g	79.6 g	112.0 ml
30 %	19.8 g	22.1 g	23.8 ml	65.9 g	85.7 g	117.6 ml
20 %	14.3 g	15.9 g	17.2 ml	71.4 g	92.8 g	124.2 ml
10 %	7.8 g	8.7 g	9.4 ml	77.9 g	101.3 g	132.0 ml

Total amounts of rice and water were 85.7g and 141.4 ml, respectively, and the ratio of water to rice was 165%.

Fig.1 Diagram of laboratory-equipment for vacuum distillation.

した。2ℓのナス型フラスコに二次最終醪1,600 mlを入れロータリーエバポレーター(S 003, 東京理科機械, 東京)に装着した後, 温度 45°C, 操作圧-63 cmHgの条件で行い, 醪の40%に相当する留出液を得た時点で蒸留を終了した。蒸留期間中エバポレーター内の蛇管及び留出側に設けたリービッヒ冷却管には4°Cの冷却水を常時通水した。但し, 二次最終醪250 mlもしくは700 mlを蒸留するときは1ℓのナス型フラスコを用いた。

6. 分析方法

分析用サンプルの調製, 総菌数と生菌数の測定, 生成エタノール濃度, α -アミノ態窒素濃度, 硫黄濃度, クエン酸濃度の分析, そしてグルコamilラーゼ活性, 耐酸性 α -amilラーゼ活性の測定は前報²⁾の方法に従って行った。

製品中の低沸点香气成分の分析は前報の方法に従って行った。また, 中高沸点香气成分は, ジエチルエーテルで1回抽出した後, ガスクロマトグラフィーにより分析した。すなわち, 300 ml分液ロートに製品50 ml, ジエチルエーテル50 ml, 飽和食塩水50 mlそして400 ppm セチルアルコール(内部標準液)1 mlを加え, 10分間振とうすることにより抽出した後, 直接注入法によるFIDガスクロマトグラフィーにより定量し

た。カラムはエタノール測定用カラムを用い, 温度プログラムは90~250°Cまで昇温速度3°C/min, 250°Cで7分間保持するものとした。注入口温度は250°C, FID温度は250°C, スプリット比は1/50とした。

実験結果および考察

1. 従来仕込み条件の返し仕込みへの影響

返し仕込みで使用する蒸留残液に醪臭の原因となるアミノ態窒素や硫黄分が多く含まれると, 得られる製品の酒質も低下するものと考えられたので, 従来法の仕込み日数と醪中の成分変化について調べた。また, 三枝らは³⁾従来法による焼酎製造において麴歩合が低くなるほど低級脂肪酸エステル生成濃度が高くなると報告している。しかし, 麴歩合が低くなると糖化酵素活性も低下するものと思われたので, 返し仕込みの発酵速度に及ぼす従来法の麴歩合の影響を調べた。

(1) 二次仕込み日数の影響

アミノ態窒素や硫黄分からは酒質にとって好ましくない成分が生成されることが考えられるが, 前報²⁾で発酵経過とともにまず原料由来のアミノ態窒素や硫黄分が醪中に増加することを報告した。ここでは発酵後期において菌体の死滅に伴いアミノ態窒素や硫黄分がさらに増加するかを調べた。

麴歩合 33% で二次仕込み (2ℓ スケール) を 8 日間、10 日間、12 日間、15 日間行い、この時得たそれぞれの最終醪を分析することにより、至適な仕込み日数の検討を行った。Table 2 に示したように、9 日間以降生成エタノール濃度は変化していないことから、前報²⁾同様 9 日目に既に発酵は終了しているものと思われた。そのために生存率は 9 日目から大幅に低下したが、16 日目においても 5% と酵母はなお生存しており、その時の生菌数は 1.3×10^7 cells/ml であった。しかし、死滅が始まった直後ほとんど変化しなかったアミノ態窒素や硫黄分も死滅開始 4 日後の 13 日目に 10~20% 増加した。このことは酵母が死滅した後、数日後に自己消化が起こり、その結果酵母由来のアミノ態窒素や硫黄分が増加したと言える。一方、耐酸性 α -アミラーゼ活性やグルコアミラーゼ活性はほとんど変わらないが、13 日目に約 10% 低下していた。これは、自己消化により漏出したプロテアーゼにより糖化酵素が加水分解され⁴⁾、活性が低下したものと考えられた。

これら 4 種類の最終醪 700 ml を蒸留し、得られた製品の低沸点および中高沸点香氣成分の分析を行った。Table 3 に示したように、吟醸香の一つである酢酸イソアミルは吟醸酒においても最大で約 15 mg/ℓ と言われているが⁵⁾、製品に約 7 mg/ℓ も含まれていた。しかし、香氣成分であるエステル類や高級アルコール類は仕込み日数が長くなるほど減少する傾向を示した。一方、ガス臭の原因となるアセトアルデヒドは仕込み日数が長くなるほど増加した。一般に減圧蒸留でできる良い米焼酎とは、西谷らの報告⁶⁻⁸⁾によると酢酸イソアミルや酢酸 β -フェネチル、カブロン酸エチル等

のエステル類や高級アルコール類が多く、且つアセトアルデヒドが少ないものと考えられる。従って、S 20 E 12 株による従来法での焼酎製造においては仕込み日数が長くない方が好ましいと言える。

発酵期間中の原料由来のアミノ態窒素や硫黄分の増加は、抑えることはできないが、酵母死滅後自己消化により増加する窒素や硫黄分は、二次仕込み日数を発酵が終了する 8~10 日とすることにより抑制できることがわかった。また、返し仕込みでの酒母添加を無くすためにも二次仕込み日数は、発酵が終了する 8 もしくは 9 日間とすることが望ましいと言える。さらに、酒質面からも従来法の仕込み日数は 8~10 日間とすべきである。

(2) 麴歩合の影響

麴歩合 10~40% で従来法による小仕込み試験 (200 ml) をそれぞれ 2 回行った。1 回目、2 回目での経日変化にほとんど差はなかったため、Fig. 2 に二次仕込みにおける醪減少量の平均値を示した。麴歩合 10% では発酵速度が若干低下したが、20% 以上でほとんど変わらなかった。しかし、仕込み 10 日間のエタノール濃度は麴歩合 20% では、16.9% v/v と、麴歩合 30% 以上に比べて約 1.7% v/v 低かった。この原因としては、各麴歩合での 10 日目グルコアミラーゼ活性 0.87, 1.07, 1.39 および 1.46 U/ml から、麴歩合を下げるにより醪中の糖化酵素活性が低下したためと考えられる。

(3) 小スケール (100 ml) での返し仕込み

上述した麴歩合の異なる 11 日目の最終醪 200 ml を実験方法に記載した条件で蒸留し、得られた蒸留残液

Table 2 Effect of fermentation times in the second-stage *moromi* mash on viability and autolysis of the yeast.

Moromi mash	Second-stage fermentation			
	after 8-d	after 10-d	after 12-d	after 15-d
Total cell number (cells/ml)	2.7×10^8	3.4×10^8	2.8×10^8	2.6×10^8
Viable cell number (cells/ml)	1.4×10^8	4.3×10^7	1.7×10^7	1.3×10^7
Viability (%)	51.9	12.6	6.1	5.0
Acid stable α -amylase (U/ml)	8.4	8.0	7.3	7.2
Glucoamylase (U/ml)	3.5	3.4	3.1	3.1
Sulfur compound-S (mg/l)	202.5	201.8	218.4	215.5
α -Amino nitrogen (mg/l)	992.5	1,005.7	1,220.7	1,222.7
Ethanol concentration (v/v%)	19.5	19.7	19.8	19.8

The second-stage *moromi* mash consisting of 355 ml of the first-stage *moromi* mash with 33% *koji* ratio, 966 ml of water and 698 g of steamed rice was fermented at 25℃ for 8, 10, 12 or 15 days.

Table 3 Analysis of flavor compounds in *shochu* made by the conventional method.

(unit, mg/l)

Flavor compounds	Second-stage fermentation			
	after 8-d	after 10-d	after 12-d	after 15-d
Acetaldehyde	4.2	4.9	7.4	8.0
Ethyl acetate	69.6	52.6	48.3	40.9
n-Propyl alcohol	168.1	106.5	83.8	96.1
Isobutyl alcohol	186.5	185.2	176.2	142.4
Isoamyl acetate	7.2	7.3	2.7	4.8
Active amyl alcohol Isoamyl alcohol	412.7	426.6	279.4	305.5
β -Phenethyl alcohol	26.9	29.5	22.6	24.1
Ethyl n-caprylate	1.6	1.1	1.0	0.8
β -Phenethyl acetate	2.0	1.7	1.5	1.4
Ethyl laurate	0.2	0.1	0.2	0.1
Ethyl myristate	0.5	0.4	0.3	0.3
Ethyl linoleate	0.6	0.7	0.5	0.6
Ethyl oleate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ethyl stearate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Acidity	—	0.7	—	0.7
pH	—	4.7	—	4.6

Four kinds of the second-stage *moromi* mash (1,600 ml each) made in Table 2 were vacuum-distilled. The distillate served as a *shochu* sample for the flavor analysis.

を用いて返し仕込み実験を行った。Fig.3 に示したように、麴歩合 10% では、仕込み 11 日目においても醪減少量がデンプン価から算出した理論量 (15.5 g) の約 70% であったが、麴歩合 20% でほぼ理論量に達した。麴歩合 30% 以上では、仕込み 9 あるいは 10 日目で醪減少量は理論量に達していた。一方、仕込み 11 日目の生成エタノール濃度は麴歩合 20% 以上で約 18% v/v に達していた。しかし、麴歩合 10% や、20% では返し仕込み初期では醪粘度が高く、2~3 日後に液化が進みやと粘度が低下した。このような場合 (麴歩合 20%) においても、返し仕込み開始時点で麴を 10% 添加することにより液化は進行し、発酵は無添加の時よりも 1~2 日間短縮され、10 日目に終了した。

以上、返し仕込みの発酵速度および開始時の粘度から、従来法での麴歩合を 30% 以上にすることが望ましい。また、球磨地区の多くの醸造場での麴歩合は 33% であることから、以後の試験では従来法の麴歩合を 33% とした。

2. 減圧蒸留時の生菌数、酵素活性等の変化

上述した蒸留残液は 30 分以内の減圧蒸留により得

られたものであるが、この蒸留残液を用いた返し仕込みでは、特に酒母や麴の添加が必要ないものと思われた。しかし、現場での減圧蒸留は、操作圧 -70 cmHg、温度 30°C (初発)→45°C (最終) の条件で 4~5 時間かけて行われていることから、実験室規模においても 4 時間かけて蒸留を行い、その間で酵素活性や生存率の変化を調べる必要があると考えられた。

そこで、試行錯誤により 4 時間かけて蒸留できる条件を検討し、その結果に基づき実験方法に記載した方法を採用した。Fig.4 は、麴歩合 33% の二次 9 日目の最終醪 1,600 ml を蒸留し、その時の生菌数、酵素活性及び硫黄濃度の経時変化を示している。Fig.4-A は、1 時間毎に常圧に戻しサンプリングし、分析した時のそれぞれの値を示している。酵素活性や硫黄濃度が増加している理由は、上述したようにナス型フラスコ中の液量減少によるものである。そこで、液中のクエン酸濃度から液の減少、即ち濃縮率を算出し換算した値を Fig.4-B に示した。グルコアミラーゼ活性や耐酸性 α -アミラーゼ活性は、蒸留開始 1 時間後に増加しているが、その後一定した。糖化酵素の活性は蒸

Fig. 2 Effect of *koji* ratios on fermentation rates of the second-stage *moromi* mash (*nji-shikomi*) in the conventional method.

These tests were carried out parallel at each condition, and theoretical amount of *moromi* mash decrease was 26 g. The concentration of ethanol produced at a various ratio of *koji* 40% (○), 30% (◐), 20% (◑) and 10% (●) were 18.7, 18.6, 16.9 and 15.2% (v/v), respectively.

留により増加し、従来法の小仕込み試験において低下することから²⁾、あるエタノール濃度以上で阻害されるものと推察された。しかし、この条件下での蒸留においては酵素活性は低下しないことが分かった。また、蒸留に供した醪は9日目のものであり、その時の生存率は55.1%であった。4時間の減圧蒸留により約35%死滅したが、生菌数は 4.7×10^7 cells/mlであった。また、蒸留液中の硫黄濃度がほとんど増加していないことから死滅しても自己消化していないものと考えられた。

以上の結果から、従来法の蒸留工程から排出される蒸留残液は、一次醪および汲水として返し仕込みで利用できるものと期待された。

3. 酒母および麴無添加での返し仕込みによる焼酎製造

現在、球磨地区での醸造場における一次仕込みおよび二次仕込み1日目の生菌数は、我々が行った調査では平均それぞれ 7.5×10^5 , $1 \sim 2 \times 10^7$ cells/mlであった。従って、上述結果から蒸留残液にただ蒸米だけを加えるだけで焼酎製造が可能と考えられた。

Fig. 3 Effect of *koji* ratios used in *moromi* mash of the conventional method on *moromi* fermentation rates of the newly developed recycling process (*kae-shi-jikomi*).

Post-distillation slurry was derived from distillation of the second-stage *moromi* mash prepared with various *koji* ratios shown in Fig. 2. The theoretical amount of *moromi* mash decrease was 15 g. *Koji* ratio applied in the conventional process: ○, 40%; ◐, 30%; ◑, 20%; ●, 10%. Concentration of ethanol after 10-d were 17.8, 18.4, 17.9 and 16.0% (v/v), respectively.

そこで、麴歩合33%の二次仕込み9日目の最終醪1,600 mlを減圧蒸留し、得られた蒸留残液を用いて酒母及び麴を添加することなく返し仕込み試験を行った。Fig. 5に示したように、麴減少量は時間とともに増加し、8日目以降はほぼ一定した。そこで、返し仕込みを9日間で終了し、醪の分析を行った。エタノールおよび生菌数、生存率はそれぞれ18.3% v/v, 3.7×10^8 cells/ml, 59.4%であり、酒母や麴を増加しなくても問題なく発酵できることが分かった。しかし、生存率は返し仕込みにおいて最大でも約70%であった。これは、生菌数から判断して蒸留残液中の死滅酵母が総菌数として加算されたためと考えられる。発酵時間中の顕微鏡観察において雑菌汚染は全く認められなかったが、有機酸を分析するとFig. 5に示したような乳酸やコハク酸、マロン酸、酢酸が生成されており、そ

Fig.4 Changes in viability, saccharifying enzyme activities, pHs, sulfur compound-S and citric acid concentrations in the post-distillation slurry during vacuum-distillation.

The 9th day *moromi* of the second-stage *moromi* mash with 33% *koji* ratio (1,600 ml) was vacuum-distilled at -63cmHg and 45°C.

A: measured values. During distillation, an aliquot of the slurry was taken from the flask at atmospheric pressure for the analysis. Soon after that, the flask was back to vacuum-distillation.

B: calculated values based on the concentration of citric acid in the slurry.

Fig.5 Course of fermentation, viability and aliphatic acids in the *moromi* mash prepared by the newly developed recycling process (*kaeshi-jikomi*) without addition of yeast, rice *koji* and water.

Post-distillation slurry was derived from distillation of the second-stage *moromi* mash with 33% *koji* ratio (1,600 ml).

の増加量はそれぞれ100~200 mg/ℓであった。これらの有機酸については、既に報告したように従来法の二次仕込みで生成されており、乳酸にいたっては仕込み9日目で2,000 mg/ℓに達していた²⁾。酒精酵母は発酵期間中に有機酸を生成と言われていたことから⁶⁾、雑菌汚染によるものではなくS20E12株により生成されたものと考えられる。

以上、減圧蒸留により得た蒸留残液を用いた返し仕込みでは、酒母や麴を添加しなくても全く問題なく焼酎を製造できることがわかった。

4. 返し仕込み日数の製品への影響

麴歩合33%の従来法による二次仕込みを中スケール(約2ℓ)で8日間行い、得られた最終醪1,600 mlを減圧蒸留した。この蒸留残液175 mlと蒸米138 g(掛米106 g)だけを500 ml三角フラスコに添加したものを4本調製し、返し仕込み試験を8日間、10日間、12日間および15日間行った。図示しなかったが、4本の発酵経過は全く変わることなく安定して進行し、少なくとも10日目に終了することがわかった。9日目、

11日目、13日目および16日目で返し仕込みを終了し、それぞれの醪を分析した。Table 4に示したように返し仕込み日数が増えると生存率は低下するが、従来法の二次仕込み終了後のように極端に死滅する²⁾ことはなかった。しかし、発酵終了後、早い時期に α -アミノ態窒素や硫黄濃度は10~20%増加する傾向を示した。このことから、従来法の二次仕込み終了時とは異なり死滅した酵母は、速やかに自己消化していく

ものと思われた。生成エタノール濃度は仕込み日数が長くなるにつれ増加したが、9日目においても18%v/vを超えていた。

これらの最終醪250 mlを約30分蒸留して得た製品の香気成分の分析結果をTable 5に示した。香気成分は、前述したように従来法同様仕込み日数が長くなるほど低下する傾向を示し、特に酢酸イソアミルとn-プロピルアルコールは極端に低下した。しかし、吟醸

Table 4 Effect of fermentation times on viability and autolysis of the yeast in the *moromi* mash prepared by the newly developed recycling process (*kaeshi-jikomi*).

Moromi mash	after 8-d	after 10-d	after 12-d	after 15-d
Total cell number (cells/ml)	6.3×10^8	6.0×10^8	5.3×10^8	5.6×10^8
Viable cell number (cells/ml)	3.7×10^8	3.1×10^8	2.2×10^8	1.1×10^8
Viability (%)	58.7	51.7	41.5	19.6
Acid stable α -amylase (U/ml)	12.3	11.5	10.8	9.5
Glucoamylase (U/ml)	3.9	3.4	3.3	3.3
Sulfur compound-S (mg/l)	311.1	340.7	370.1	359.4
α -Amino nitrogen (mg/l)	843.6	899.8	964.9	1,009.9
Ethanol concentration (v/v%)	18.7	19.5	20.1	20.6

The second-stage *moromi* mash with 33% *koji* ratio was fermented for 8 days. After completion of the fermentation, it was vacuum-distilled, and the slurry was obtained. The *kaeshi-jikomi moromi* consisting of 175 ml of the slurry and 138g of steamed rice in a 500 ml Erlenmeyer flask was fermented for 8, 10, 12 or 15 days.

Table 5 Effect of fermentation times on flavor compounds in *shochu* made by the newly developed recycling process (*kaeshi-jikomi*).

(unit, mg/l)				
Flavor compounds	after 8-d	after 10-d	after 12-d	after 15-d
Acetaldehyde	10.2	14.9	17.4	20.6
Ethyl acetate	49.6	52.6	60.2	61.3
n-Propyl alcohol	178.1	106.5	83.8	53.3
Isobutyl alcohol	192.5	185.2	175.2	111.0
Isoamyl acetate	8.2	6.3	2.7	1.0
Active amyl alcohol Isoamyl alcohol	312.7	317.6	279.4	292.4
β -Phenethyl alcohol	30.7	31.4	26.5	34.1
Ethyl n-caprylate	0.5	0.7	0.7	0.5
β -Phenethyl acetate	2.7	2.7	2.4	2.3
Ethyl laurate	0.1	0.1	0.3	0.1
Ethyl myristate	0.5	0.4	0.4	0.3
Ethyl linoleate	0.8	0.5	0.5	0.3
Ethyl oleate	0.5	0.3	0.4	0.3
Ethyl stearate	0.1	0.1	0.1	N.D.
Acidity	0.6	0.8	0.8	0.9
pH	5.0	4.9	4.9	4.6

After completion of the fermentation shown in Table 4, the four kinds of *moromi* mash were vacuum-distilled for *shochu* production.

香の一つである酢酸イソアミルは返し仕込み9日目の製品に8.2 mg/ℓ も含まれていた。一方、ガス臭の原因となるアセトアルデヒドは、やはり従来法同様仕込み日数が長くなると増加するが、それでも品質が良いとされる米焼酎の値⁹⁾よりもむしろ低かった。減圧蒸留で得られる良い米焼酎の定義から、やはり返し仕込みにおいても発酵終了醪は直ちに蒸留すべきである。

5. 返し仕込みに使用する蒸留残液の放置時間の影響

返し仕込みを実規模で行うことを想定して以下の検討を行った。球磨地区における醸造場での減圧蒸留最終温度は約45℃に達するので、蒸留残液の温度もこの程度と思われる。規模により異なるが、約1,000 ℓの蒸留残液を発酵槽（二次仕込み槽）に入れ、25℃以下に冷却した後、蒸米を添加すると仮定すると、冷却装置がない場合、作業性から当然翌日に蒸米を添加することになる。この場合、雑菌汚染が懸念されるので、実験室規模で約4時間かけて減圧蒸留した蒸留残液をナス型フラスコに残したまま24時間放置し、その蒸留残液を用いて返し仕込みによる焼酎製造に関する検討を行った。まず、24時間放置している間の生存率や有機酸の経時変化を調べた。図示しなかったが、生菌数は若干増減するものの、生存率は35%とほとんど変化しなかった。総有機酸濃度は3,500～3,800

mg/ℓ と若干増加しているが、酢酸濃度は206～229 mg/ℓ とほとんど変化しないこと、酪酸や吉草酸が検出されなかったことから、雑菌による汚染はないものと考えられた⁶⁾。また、放置前後の糖化酵素活性を測定したが、耐酸性α-アミラーゼ活性は21.3から22.2 U/ml、グルコアミラーゼ活性は6.4から6.1 U/mlと全く活性の低下は見られなかった。そこで、この24時間放置した蒸留残液を用いて同様に返し仕込み試験を行った。開始当初はやはり粘度が高かったので、4日目からサンプリングし分析を行った。Fig.6 に示したように、今回の生存率は今まで実験室規模で行ってきたものよりも高かった。また、総有機酸濃度は6日目に若干増加しているが、その後減少し、最終的にはほとんど変化していなかった。糖化活性について返し仕込み日数を検討した時の値（Table 4 参照）と比較すると、9日目における耐酸性α-アミラーゼ活性は約30%低下しているが、グルコアミラーゼ活性は約2倍高かった。この差は、放置前後の両酵素活性が全く変化していなかったことから、実施した仕込み試験により若干変化するものと思われた。

要 約

官能試験結果および生存能から選抜した焼酎酵母 S 20 E 12 株を用いて実験室規模で返し仕込みによる焼

Fig.6 Course of fermentation, viability, aliphatic acid concentration and saccharifying enzyme activities in the *moromi* mash in the newly developed recycling process (*kaeshi-jikomi*) using post-distillation slurry left in a room temperature for 24 hours.

酎製造に関する研究を行った。得られた結果を以下に要約する。

(1) 従来仕込み条件の返し仕込みへの影響をまず検討した。その結果、従来法による二次仕込みでは発酵終了後、酵母は速やかに死滅することから、発酵終了醪は直ちに蒸留される方が酒質面等から好ましいことがわかった。また、返し仕込みの発酵速度および開始時の粘度から、従来法の麴歩合を30%以上とした。

(2) 従来法(麴歩合33%)の二次9日目の醪を-63 cmHg, 45°Cの条件で約4時間かけて減圧蒸留した。蒸留前後における糖化酵母活性は、むしろ増加した。また、この間酵母は約35%死滅したが、蒸留残液中に酵母はなお 4.7×10^7 cells/ml生存していた。

(3) 蒸留残液に酒母や麴を添加することなく、ただ蒸米だけを加え返し仕込み試験を行った。発酵は雑菌汚染することなく、9日目にはすでに終了していた。発酵日数の異なる醪を蒸留し、得られた製品の香気成分を分析した結果、発酵日数が長くなる程、酢酸イソアミルやn-プロピルアルコールは減少し、逆にアセトアルデヒドが増加した。従って、酒質面から従来法同様、発酵終了後直ちに醪を蒸留すべきであることがわかった。

(4) 蒸留残液を室内で1日放置しても汚染の恐れもなく、また生菌数や糖化活性も全く変化しなかった。この蒸留残液を用いて返し仕込みを行ったところ、発

酵や酒質への影響は全く見られなかった。

本研究の遂行にあたりご指導、ご助言を賜りました熊本国税局鑑定官室長嶋崎孝行氏、前主任鑑定官白上公久氏および鑑定官室の諸氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究に協力された学生吉田めぐみさんおよび鶴田恵三君に心から感謝いたします。なお、本研究は日本酒造組合と球磨焼酎酒造組合、熊本大学工学部物質生命化学科との共同研究で実施したものである。

文 献

- 1) 朝日新聞：1996年10月4日付け記事
- 2) 中川優，森村茂，木田建次：醸協，**92**，(9) 651 (1997)
- 3) 三枝維彦，山上昌上，岡村成通，原田倫夫：生化学，**73**，105 (1995)
- 4) Y. YOSHINO, S. HAYASHIDA, *J. Ferment. Technol.*, **56**, 289 (1978)
- 5) 清酒酵母の研究：清酒酵母研究会(編集)，116 (1992)
- 6) 西谷尚道：醸協，**75**，(8) 641 (1980)
- 7) 西谷尚道：醸協，**75**，(12) 944 (1980)
- 8) 西谷尚道，大内弘造，飯村稔，秋山裕一：醸造試験場報告，**154**，15 (1982)
- 9) 若井芳則：醸協，**83**，(9) 579 (1988)