

# 清酒醸造における微生物学的安定化に関する研究

## —清酒醸造における微生物学的調査—

恩田 匠・樋川 芳仁・柳田 藤寿\*

### The Technical Development on Microbial Control in *Sake*-brewing

#### —Microbiological Investigation on *Sake*-brewing—

Takumi ONDA, Yoshihito HIKAWA and Fujitoshi YANAGIDA\*

#### 要 約

清酒醸造における微生物学的安定化技術を確立する基礎的知見を得るため、山梨県内の1企業で製造されている、生もと仕込の清酒醸造における微生物の生菌数の変化と微生物の分離を実施した。2つの清酒タンクについて調べたところ、両者とも仕込み作業直後から乳酸菌の増殖が認められ、それに伴いpHが低下し、適度な乳酸酸性が達成された。出現した乳酸菌類は、酵母の添加後に死滅したことから、生もと醸造に有用な清酒乳酸菌であることが推察された。

#### Abstract

The microbial investigation was performed on sake-brewing process using 'Kimoto', which is prepared by traditional method, in Yamanashi prefecture. Changes of viable cell counts of general aerobic bacteria, lactic acid bacteria and sake-yeast, and change of pH during sake-making process were measured on the two of sake-fermentation tanks. Lactic acid bacteria grew immediately and pHs were decrease in sake-musts of each sake-fermentation tanks. Lactic acid bacteria isolated from sake-musts were seemed to be useful lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei* and/or *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *sake*, on the basis of their nontolerant property to alcohol.

#### 1. 緒 言

清酒醸造において、健全な発酵を達成するには、多量の乳酸による雑菌の生育防止と高濃度の優良酵母の働きが必要である。この目的達成のため、「酒母(「もと」ともいう)」<sup>1)</sup>が必須とされる。現在の清酒醸造は、この酒母作製時に人工的に乳酸を添加して醸造を行う「速醸」<sup>2)</sup>が主流になっている。

一方、近年古来からの清酒醸造方法である「生もと」<sup>3)</sup>系あるいは「山麴」<sup>4)</sup>系の清酒醸造が注目されており、国内大手メーカーはもとより、本県内でもいくつかの企業で検討されている。しかしながら、これらの醸造方法は長時間を要し、その工程が煩雑であるなどの問題がある。さらに、乳酸菌による多量の乳酸生成が必要であるが、必ずしも微生物学的に安定していない場合があり、従来より高度な微生物学管理が必要になっている。

また最近、アルコール濃度を低く醸造した「低アルコール清酒」の製造が実施されるようになり、この低アルコール清酒醸造はさらに厳密な微生物管理を必要とすることから、清酒醸造における微生物学的な安定化はますます重要

な課題となりつつある。

そこで、生もと醸造の技術的支援、さらに清酒醸造における微生物学的安定化技術の開発を目的とした研究を開始した。本年は、県内1醸造元における「生もと」醸造過程の微生物学的解析を実施した結果を報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 供試清酒試料

研究対象とした清酒試料は、県内1企業で製造されている、いわゆる「生もと」仕込みで醸造されたものを供試した。工場で仕込み作業が終了した直後から、酵母添加後までサンプルを採取した。なお、本清酒醸造には、当然のことながら乳酸菌スターターは添加されていない。この生もと醸造の仕込直後から25日間にわたり、2、3日おきに分析用試料を採取した。

##### 2-2 清酒醸造過程における微生物の生菌数計測と乳酸菌の純粋分離

各分析試料は直ちに、一般生菌数、乳酸菌数、酵母数およびpHの計測を行った。清酒試料10gを、10倍ずつ生理的食塩水で希釈したサンプルを作製した。

\*山梨大学ワイン科学研究センター

一般生菌数の計測は、標準寒天培地（ニッスイ社製）を用いた。乳酸菌数の計測は、MRS寒天培地（pH7.0）を使用した。それぞれ希釈サンプル1ml量をシャーレに分取し、上述した培地を溶解させて50℃前後に調整したものをシャーレに流し入れ、よく混釈し、固化させた。

乳酸菌と想定される酸生成コロニーは、無作為に選択し、白金線を用いて釣菌したものを、寒天培地の上でストリークカルチャーすることにより、純粋分離を行った。3回の純化操作後、得られた単一コロニーを分離株として凍結保存した。

酵母の生菌数は、YM寒天培地を用いて、平板塗抹法により行った。すなわち、上述した清酒試料の希釈サンプル0.1mlをターンテーブルにのせたYM平板培地に分取し、滅菌したコンラージ棒を用いてよく塗布した。

### 2-3 供試菌株の培養法

分離した乳酸菌は、MRS液体培地を用い、30℃18時間静置培養した。

### 2-5 乳酸菌株の簡易同定試験

純粋分離した乳酸菌について、簡易的な属レベルの同定法として、グラム染色、形態観察、細胞の配列様式、カタラーゼ反応、10℃での生育、ならびに10%アルコール下での生育を調べた。

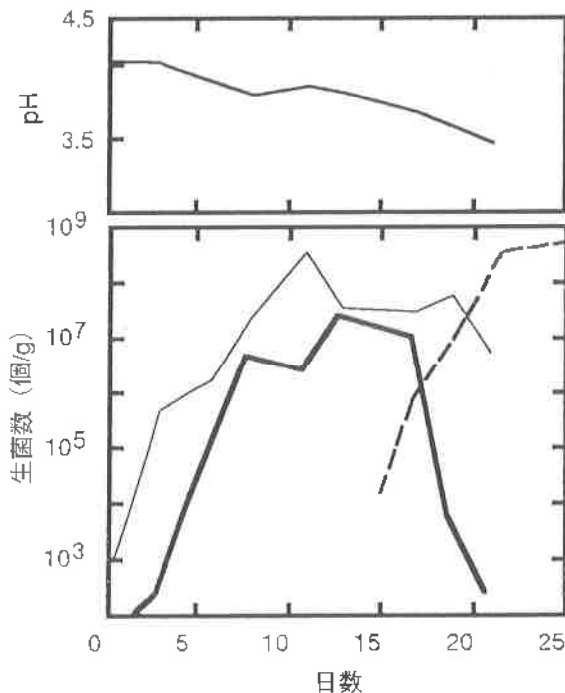


図1 タンクAにおける微生物の生菌数とpH変化

上図：pH

下図：微生物、太実線；乳酸菌（酸生成細菌）、細実線；一般細菌、点線；酵母

### 3. 実験結果および考察

#### 3-1 生もと醸造における細菌類の生菌数変化解析

山梨県内1企業における2つの清酒タンクAおよびBについて清酒醸造過程の乳酸菌数、一般生菌数、酵母およびpHの変化を図1と図2に示した。

##### 3-1-1 タンクAにおける生菌数変化

タンクAでは仕込み後、乳酸菌が急激に生菌数を増やし、一度減少した後、再度増加した。この生菌数の変化パターンには、見かけ上、二つのピークが存在し、異なる乳酸菌菌種の交代が予想された。この乳酸菌の増殖に伴いpHが低下し、適度な乳酸酸性が達成された。その後、酵母添加（2週間後）以降に急速に死滅した。このことから、出現した乳酸菌は、アルコールに対して耐性のない乳酸菌であることが分かった。

一方で、一般細菌は仕込み直後から生菌数を増加させ、一度減少、再度緩やかに増加した後に、徐々に減少したが、酵母添加以降も完全には死滅しなかった。

##### 3-1-2 タンクBにおける生菌数変化

タンクBでも、タンクA同様に乳酸菌が仕込み後急激に生菌数を増やし、一度減少した後、再度増加した。その後、酵母添加（2週間後）以降に急速に死滅した。このタンクBは、タンクAよりも乳酸菌の生育の立ち上がりがかつ

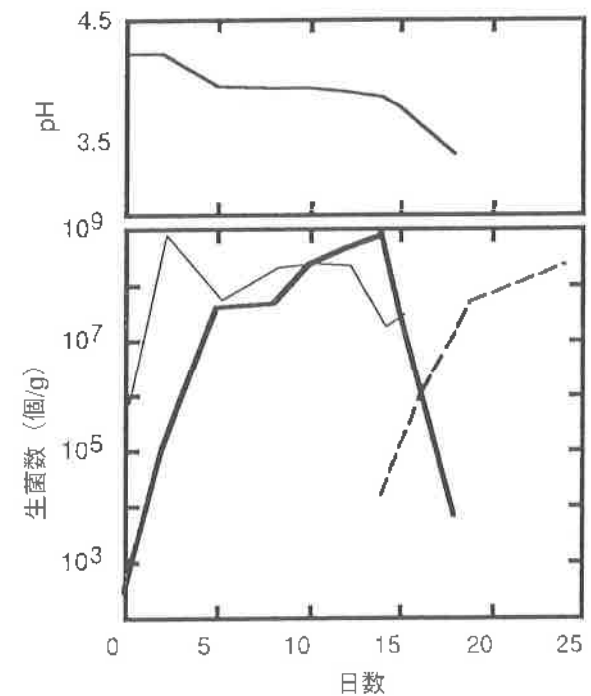


図1 タンクBにおける微生物の生菌数とpH変化

説明は、図1に同じ。

た。タンクBの方が後発に仕込まれたため、環境の温度がやや高かったことと、醸造環境に清酒関連乳酸菌が蓄積されたことなどの可能性が考えられた。このタンクBでも、見かけ上二つのピークが観察された。

これら2つのタンクに出現した乳酸菌はそれぞれ、清酒もろみにおいて、低温下で旺盛な増殖を示し、酵母添加後に急速に死滅した。また、発酵前期のピークを構成した乳酸菌は球状菌が多く、これは有用清酒乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *sake*<sup>3)</sup> であると思われた。一方、後半のピークの多くを構成した乳酸菌は、桿状菌が多く、有用清酒乳酸桿菌 *Lactobacillus sake*<sup>2)</sup> である可能性が高いものと思われた。古くから文献的に伝承されている生もと醸造における微生物の変遷パターン<sup>4, 5)</sup> では、酒のモロミにおいて、乳酸球菌から乳酸桿菌への変遷があることが説明されている。今回の結果からも、乳酸菌の生菌数変化に、見かけ上二つのピークが見いだせたことから、菌種の交代が起こっている可能性が高く、より詳細な同定試験を行う必要が考えられた。

以上の2つのタンクは、異なる微生物の変化パターンを示したことから、品質的な違いが生じている可能性もあり興味深い。2つの乳酸菌変遷パターンの違いは、環境温度や環境の微生物叢、初発乳酸菌の生育活性などのいくつかの要因が影響していると考えられた。

#### 4. 結 言

現在の「生もと」醸造における、細菌類の変遷を明らかにすることができた。「生もと」系の清酒は、「巾のある」、  
「伸びのよい」呈味を有することから、本物・本格志向に適合した製品開発の可能性が考えられた。また、「薄い（フラットな）」印象が指摘されることの多い低アルコール清酒に対しても、呈味性の改善に寄与できる可能性が考えられた。

#### 参考文献

- 1) 石川雄章・梅田紀彦・古市明紀：酒造教本（三盛社、東京）（1998）
- 2) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル；分離から同定まで（朝倉書店、東京）（1992）
- 3) 柳田藤寿：清酒とワイン、乳酸菌の科学と技術、日本乳酸菌学会編、p.252-253（1996）
- 4) 片桐英郎：日農化誌、10、965（1934）
- 5) 大林晃・北原覚雄：日農化誌、33、839（1959）