

[醸工 第45卷, 第1号, p. 46~51, 1967]

## 清酒醪の発酵管理に関する研究

(第6報) ピロ炭酸ジエチルエステルによる清酒醪の  
発酵調節および清酒の殺菌

原 昌道・大塚 謙一

(国税庁醸造試験所)

Studies on Fermentation Control of Sake-moromi Mash

(VI) Fermentation Control of Sake Moromi Mash and Sterilization  
of Sake Using Diethylpyrocarbonate

Shōdō Hara and Ken-ichi Ōtsuka

(Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency,  
Takinogawa, Kitaku, Tokyo)

Fermentation control of Sake moromi mash and sterilization of Sake by diethylpyrocarbonate (DEPC) were studied.

1. When DEPC (150 ppm) was added directly to Sake moromi mash in the middle stage of fermentation (Be' 5, alcohol 11%), fermentation was extremely retarded, and Sake obtained was sweeter.
2. When DEPC (300 ppm) was added to Sake moromi mash in the last stage of fermentation (Be' 2, alcohol 17%), yeast in moromi were killed and fermentation stopped. In this way, the Sake of the desireable components can be easily obtained.
3. To purified moromi mash, both  $H_2O_2$  (0.06-0.12%) and DEPC (250-500 ppm) were added at 5°C. After 2 hrs., the purified bacteria and yeasts existing in the moromi were killed completely. Both DEPC and  $H_2O_2$  were almost all decomposed after 6 hrs. Yeasts were next inoculated into the treated Sake moromi at about  $10^8$ /ml. Thus the moromi could be fermented again.
4. Bacteriocidal action of DEPC and  $H_2O_2$  against Hiochi bacteria in Sake (alc. 15.5%) was extremely effective when these disinfectants were added at the same time. Hiochi bacteria were killed completely at the concentrations of DEPC above 300 ppm and  $H_2O_2$  above 0.03%.
5. From the results of organoleptic evaluation, samples of Sake containing DEPC above 400 ppm had a somewhat different flavor and taste from the control.

### 緒論

清酒醪は発酵期間が長く(約25日間),さらに蒸米の硬軟,麹の力価,品温,酵母の種類などにより発酵速度が左右されるので,アル添,上槽の時期がまちまちになったり,予定とする清酒メーターの酒が得られないことが多い。また開放発酵で,なおかつ水または麹を全く殺菌せずに使用するから,時には醪が腐敗することがある。

われわれは清酒醪の発酵速度が酵母の種類および発酵温度により著しく異なり、これを適切に管理することにより発酵速度を調節することが可能なことを前報<sup>1,2)</sup>で報告したが、その他野白は泡のくみ出し<sup>3)</sup>、掛流し法<sup>4)</sup>などによる発酵速度の調節について述べている。また実際には予定とする清酒メーターの酒を造るために各種四段法がおこなわれている。さらに腐造醪の救済には  $H_2O_2$  法、メタカリ法<sup>5,6)</sup>、抗生物質法<sup>11)</sup>などがあるが、かならずしも効果的ではない。他方清酒の殺菌に関しては従来から加熱殺菌(火入法)、サリチル酸添加法がおこなわれているが、外国ではサリチル酸添加酒の輸入は許可されておらず、わが国でもサリチル酸にかわる薬剤の発見が望まれている。この方面については数多くの研究があり、抗生物質<sup>8,9)</sup>、パラオキシ安息香酸<sup>10)</sup>、ハイドロオキシ・アスペルギリック・アシド<sup>11)</sup>、ラウリル酸ソーダ<sup>12)</sup>、ビタミン  $K_3$ ,  $K_5$ <sup>13)</sup>、各種拮抗物質<sup>14~19)</sup>などがあるが火落菌に対しての殺菌力、清酒に与える香味、人体への影響などの面から、最適な殺菌剤はなく、サリチル酸のみが現在使用されている。

われわれは前報でピロ炭酸ジエチルエスチル(DEPC)を使った醸造用水<sup>20)</sup>、麹の殺菌<sup>21)</sup>について述べ、これを実際の清酒醸造に適用できることを報告<sup>22)</sup>したが、本報告では清酒醪に直接 DEPC を添加して発酵速度を調節すること、清酒醪末期に添加して発酵を止め目的とする清酒メーターの酒を造ること、および腐造醪に添加して醪中の腐造乳酸菌を殺菌すること、さらに清酒の殺菌などについて検討したので報告する。

### 実験方法

1. 酪汲み出し試験 協会 7 号、および浦霞酵母でそれぞれ純粋に培養された留後 10 日目の清酒醪 (Bé 5, alc. 11%) を 200 ml ずつ汲み出し 500 ml の発酵栓付三角フラスコに入れ、DEPC を 150 ppm 添加して 15°C でひきつづいて発酵させ、毎日の重量の減量を測定し、留後 34 日目 (DEPC 添加後 24 日目) に上槽して醪の各成分を測定した。

2. 発酵末期に DEPC を添加する試験 総米 50kg 仕込の留後 22 日目醪 (協会 7 号酵母で純粋に培養された醪) を半分にわけ、一方に DEPC を 300 ppm になるよう添加した。他方は DEPC 無添加とし、それぞれひきつづいて 12°C で発酵させた。

3. 腐造醪の救済試験 留後 7 日目の醪 200ml に  $\alpha$  米 75g, アルコール浸漬麹 25g, 水 145ml を添加し、同時に腐造乳酸菌 No. 83 を  $10^7/ml$  になるよう添加した。そしてこれを 15°C に放置し 4 日目に 5°C で DEPC,  $H_2O_2$  を所要の濃度になるよう添加した。3 時間放置後、各区分の醪 1g をとって 150 ml の無菌水に懸濁し、これを前報<sup>1)</sup>のとおり平板培養をおこなって生存酵母数、乳酸菌数を調べた。各醪は 2 時間放置後、協会 7 号酵母を  $10^8/ml$  になるよう添加して、発酵栓をつけ 15°C でひきつづいて発酵させた。各醪は feed 後 22 日目に上槽し内容成分を分析した。なお殺菌直後の醪成分はボーメ 8.7, 酸 2.4, F-N 1.6, Alc. 7.5% であった。

4. 清酒の殺菌試験 火入後の清酒 (アルコール度数 15.5°) に火落菌を  $10^7/ml$  添加した後、 $H_2O_2$ , DEPC を各濃度になるよう添加した。2 時間後、このうちから 1 白金耳を火落菌培地に接種し、30°C で 5 日間接養し、火落菌の増殖を 660mμ の吸光度を測定することによりもとめた。なお火落菌の増殖培地はつきのとおりである。

Sake (15.2%)	70%
Liver autolysate	20%
Yeast ext.	0.5%
Dist. water	10%
pH	4.8~5

5. 火落菌株 つきの 2 種の火落菌を使用した。

- H-1 *Lact. heterohiochi.*  
H-42 *Lact. homohiochi.*

### 結果および考察

1. 清酒醪中期に添加された DEPC の効果 清酒醪の中期、成分としてボーメ約 5°、アルコール 11% の醪に DEPC を直接 150 ppm になるよう添加し、ひきつづいて発酵させた結果は Fig. 1 に示される。このような

条件では酵母を完全に殺すことはできないが、醪の発酵速度は著しく遅くなり、留後34日目の生成酒の成分も対照と比べてアルコールの生成悪く、日本酒度も高くなり甘口の酒となった。この方法は蒸し米が非常に硬かったり、麹の酵素力が弱い場合に 100~150 ppm の DEPC を留後 7~10 日目の醪に添加すると効果的であるが、DEPC の殺菌作用はアルコール度数が高いほど大きく、また直接菌に接触しなければ作用しないから、高泡時に添加してもほとんど効果的でない。またあまり添加濃度が高いと酵母が完全に殺されて発酵が停止することがあるから注意を要する。

**2. 清酒醪末期に添加された DEPC の効果** 留後 22 日目、アルコール度数 16.2、日本酒度 -18 の醪に DEPC を 300 ppm 添加して、ひきつづいて 12°C で発酵させた。結果を Fig. 2 に示す。このような醪末期でアルコール度数も高く、DEPC も 300 ppm とかなり多量に添加したため、酵母は完全に死滅し、発酵は停止した。他方溶解糖化はひきつづいておこなわれているため日本酒度は若干増加した。また DEPC 無添加の対照醪はさらに発酵をつづけている。

この方法は現在おこなわれている各種四段法にある意味ではとて代わりうる可能性があるわけで、予定とするアルコール、または日本酒度に到達した時、醪に DEPC を 200~300 ppm 添加すれば容易に発酵を停止するか、著しく遅らせることができ、目的とする成分の酒を一定日数で造ることが可能となる。

**3. 清酒醪末期に DEPC が添加された醪の生成酒の成分および剣酒結果** 酪末期に DEPC が添加された醪の生成酒の成分を Table 1 に示す。DEPC を 300 ppm 添加して発酵を停止した酒は日本酒度 -21.0, Alc. 16.2 と甘口の酒となった。一方 F-N は対照に較べて増加している。われわれは前報で醪の発酵が停止するか、あるいは遅くなる時期に 15~12°C で数日間放置すると、アルコールは増加しないが F-N は増加することを報告<sup>1)</sup> したが、この試験でも同じ結果となつた。このことはアミラーゼ系の酵素でも云えることで DEPC 添加直後の日本酒度 -16.2 であったのに生成酒では -21.0 と逆に増加した。

剣酒結果では若干対照の方がよかつたが、これは DEPC 添加酒がアルコール度数低く、甘かったためであろう。なお DEPC を添加したための異味異臭は全く感じられなかった。

**4. 廉造醪に添加された DEPC と  $H_2O_2$  の効果** 前報<sup>20, 25)</sup> で DEPC の殺菌作用は乳酸菌に対してはあまり効果的でないが、 $H_2O_2$  と併用すると殺菌力が非

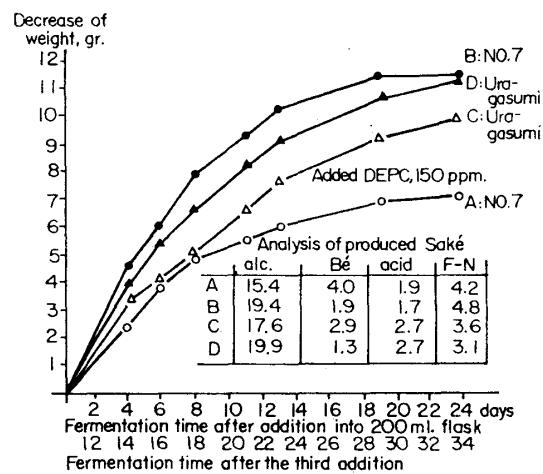


Fig. 1. Effect of DEPC on fermentation of Sake moromi mash in the middle stage of fermentation.  
(—Decrease of weight during fermentation for the taked out Sake moromi mash after 10 days mashing—)

Test conditions: Each 200ml of Sake moromi mash during fermentation after 10 days mashing was added into 500ml flask with a fermentation bug. After addition of DEPC, the moromi mash was fermented at 15°C, and the decrease of weight was measured.

Bé of moromi mash after 10 days mashing:  
7-moromi (cultured purely with Kyōkai No. 7 yeast): 5.0

Uragasumi (cultured purely with Uragasumi yeast): 5.2

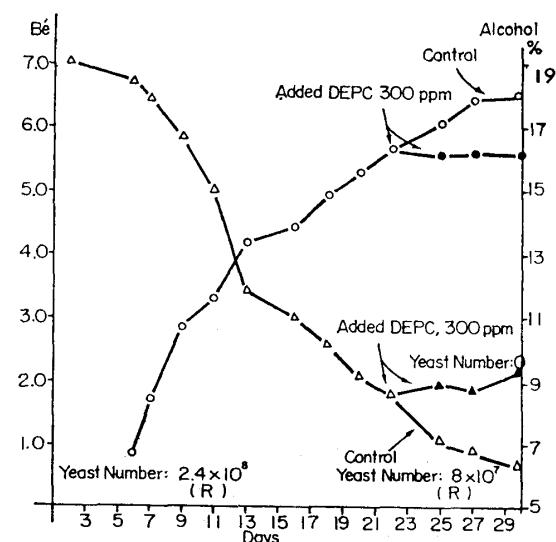


Fig. 2. Effect of DEPC added to Sake moromi mash in the last stage of fermentation on alcohol and Baumé.

Table 1. Analysis of produced Sake.

	Sake meter	Alcohol %	Acidity ml	F-N ml	Color O.D.	$n=18$ Sensory test	
						$\Sigma x_i$	$\bar{x}$
DEPC added	-21.0	16.2	2.1	3.3	0.048	35	1.94
Control	-6.0	18.0	2.3	2.9	0.049	29	1.61

1. Number of panel was 18.
2. Evaluating points of each judge were 1, 2, and 3; 1, 2 and 3 point were good, common and bad respectively.

常に高まることを報告したが、この結果を腐造醪に適用した。腐造醪としては腐造乳酸菌 (No. 83) を実験の部に記した方法によって  $10^7/\text{ml}$  添加し、4 日間増殖させてのち、このモデル腐造醪に対して DEPC および  $\text{H}_2\text{O}_2$  の効果を試験した。結果を Table 2 に示す。DEPC 250 ppm,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.06% で大部分の乳酸菌は死滅したが、DEPC 500 ppm,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.06% または DEPC 250 ppm,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.12% でほとんど完全に乳酸菌を殺すことができた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  単独では 0.12% で 74.3% の死滅率しか示さないから DEPC との併用効果は非常に大きいことになる。

ただしこの方法では酵母も死滅する。しかし DEPC は 5 時間後に、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は 2 時間後に大部分分解して殺菌力は消滅するから、殺菌後 5 時間して酵母を  $10^8/\text{ml}$  になるよう添加して、ひきつづいて発酵させた。22 日目上槽後の酒の成分は表の下欄に示される。DEPC と  $\text{H}_2\text{O}_2$  で殺菌された醪はその後のバクテリヤによる酸の増加は止った。なお乳酸菌との混合培養では酵母の発酵が抑制されるとの報告<sup>24)</sup>があるが、本実験ではアルコールの生成に差は認められなかった。

以上の結果から腐造醪を DEPC と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との併用により救済できることがわかる、この方法の利点はサリチル酸などの殺菌法と違って殺菌後は殺菌剤自身が消滅するところにあるわけであるが、殺菌後の添加酵母量はかなり多量を必要とする。なおこれはモデル小仕込試験であり、今後実際の腐造醪に対して実施したいと考えている。

Table 2. Bacteriocidal action of DEPC against No. 83 lactic acid bacteria in Sake moromi mash.

DEPC ppm	0	250	250	500	500	0
$\text{H}_2\text{O}_2$ %	0	0.06	0.12	0.06	0.12	0.12
Yeast Death ratio	0	93.2	100	99.9	100	63.5
No. 83 %	0	99.8	100	100	100	74.3
Composition of the obtained Sake	Alcohol	17.0	17.4	17.2	17.6	16.8
	Acidity	6.2	3.8	3.8	3.9	4.8
	F-N	2.7	2.8	2.8	2.8	2.9

To 200 ml of Sake moromi mash during fermentation after 7 days mashing,  $\alpha$ -rice 75 g A-Kōji 25 g and water 145 ml were added and then lactic acid bacteria No. 83 was inoculated about  $10^7/\text{ml}$ . After 4 days, DEPC and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added to these small moromi mashes. Sterilizing time was 2 hrs at 5°C. After 6 hrs of DEPC-addition, Kyōkai No. 7 yeast was inoculated about  $10^8/\text{ml}$  to these moromi mashes and fermented at 15°C for 18 days.

A-Kōji: Kōji treated with 80% alcohol.

No. 83: Lactic acid bacteria isolated from putrefied Sake mash and identified as *Lactobacillus casei*.

**5. 火落菌に対する DEPC と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の効果** 実験の部に記した方法により、あらかじめ培養した火落菌を清酒に添加し ( $10^7/\text{ml}$ )、これを  $\text{H}_2\text{O}_2$  と DEPC を併用して殺菌し、2 時間後に火落菌培地に 1 白金耳接種して殺菌効果を試験した。結果を Table 3 に示す。DEPC 単独では 400 ppm でかなり殺菌されるが完全とはいいがたい。ただしこれに  $\text{H}_2\text{O}_2$  が 0.03~0.06% 添加されるとほとんど完全に死滅した。霜ら<sup>25)</sup>は火落菌に対して DEPC はあまり効果的でないとしているが、これは DEPC 単独で使用したためであろう。以上の結果か

Table 3. Bacteriocidal action of DEPC and  $H_2O_2$  against Hiochi-bacteria in Sake.1. H-1 *Lactobacillus heterohiochi*

DEPC conc.	ppm	0	100	200	300	400
$H_2O_2$	0	0.25	0.16	0.13	0.025	0.020
	0.03	0.17	0.073	0.022	0.003	0.002

2. H-45 *Lactobacillus homohiochi*

DEPC conc.	ppm	0	100	200	300	400
$H_2O_2$	0	0.24	0.16	0.13	0.035	0.022
	0.06	0.14	0.053	0.012	0.003	0.002

Test condition      Alcohol concentration in Sake: 15.5  
                             Bacteria number in Sake :  $10^7/ml$   
                             Time of treatment : 2 hrs

After sterilizing treatment, 0.02 ml of each Saka was inoculated to 20 ml of hiochi-bacteria medium and cultured for 4 days. The growth of bacteria was shown by measuring the transmittance at  $660 m\mu$ .

ら DEPC と  $H_2O_2$  を併用することにより火落菌を殺菌することは可能であるが、使用した殺菌剤自身分解し、殺菌力を失う性質があるから、殺菌後は無菌的に貯蔵される必要がある。

6. DEPC を添加された清酒の官能試験      火入清酒 (アルコール度数17.0) に DEPC を各濃度になるよう添加し、30日放置後、呑酒をおこない、DEPC の清酒の香味におよぼす影響を試験した。方法としては 13人の審査員に DEPC を添加したための異味、異臭を感じる酒を指摘してもらう方法をとった。DEPC-A, B は製造会社を異にした DEPC を使ったことを意味する。結果を Table 4 に示す。DEPC 200ppm までは全く感じられなかったが、400 ppm で若干の人が異臭をわずかに感じた。800 ppm では大部分の人が感じている。Molin はビールに対しての試験で 500 ppm 以上の添加はビールフレーバーを変えるのでよくないとし、100 ppm 前後が適当であるとしているが、以上の結果から DEPC の清酒に添加使用できる濃度は 400 ppm 以下、できれば 200 ppm 以下が適当であろうと思う。

Table 4. Sensory test of Sake added with DEPC different concentration.

DEPC conc.	ppm	DEPC-A	DEPC-B
0	0	0	0
100	0	0	0
200	0	0	0
400	5	5	5
600	9	8	8
800	12	12	12
1000	13	12	12
1600	13	13	13

Number of judge; 13, Storage: 30 days

Values in Table showed the total numbers of panel. who could detect different flavour or taste in each Sake from control.

## 要      旨

ジエチルピロカーボネート (DEPC) による清酒醪の発酵調節と清酒の殺菌が検討された。

1. DEPC (150ppm) が直接醪の中期 (ボーメ 5, alc. 11) に添加されると, 発酵は著しく緩慢になる. そして得られた酒は甘口になった.
2. DEPC (300ppm) が酒醪の末期 (ボーメ 2, alc. 17) に添加されると, 酪中の酵母は死滅し, そして発酵は停止する. この方法によれば容易に望む成分の酒を得ることができる. また得られた酒には異味, 異臭は感じられなかった.
3. DEPC (250~500ppm) と  $H_2O_2$  (0.06~0.12%) が 5°C で腐造醪に添加されると腐造乳酸菌, 酵母は完全に殺菌される. そして DEPC と  $H_2O_2$  は 6 時間後に分解するから, あらためて酵母をこの処理醪に約  $10^8/ml$  添加すると醪はふたたび正常に発酵した.
4. 清酒 (alc. 15.5) 中の火落菌に対する DEPC と  $H_2O_2$  の殺菌作用はこれらの殺菌剤が同時に添加されると非常に効果的であった. そして火落菌は DEPC 300ppm 以上,  $H_2O_2$  0.03% 以上の濃度で完全に殺菌された.
5. 官能審査の結果から, DEPC 400ppm 以上添加の酒には異味, 異臭が感じられた.

終りに臨み火落菌株を分譲していただいた東大田村助教授に感謝致します.

### 文 献

- 1) 原, 大塚, 吉沢, 細矢, 橋田, 森永: 本誌, **43**, 873 (1965).
- 2) 原, 高木, 大塚: 昭和40年度 日本醸酵工学大会で講演.
- 3) 野白, 西尾, 松川, 石上, 宮原: 釀協, **55**, 41 (1960).
- 4) 野白, 中川: 釀協, **52**, 900 (1957).
- 5) 菊池: 釀協, **47**, 24 (1952).
- 6) 日野: 釀協, **52**, 456 (1957).
- 7) 佐藤: 農化, **32**, 119 (1958).
- 8) 寺本, 橋田: 本誌, **31**, 376 (1953).
- 9) 伊野本, 橋田, 大塚: 本誌, **29**, 204 (1951).
- 10) 橋田, 寺本, 向井: 本誌, **36**, 49 (1958).
- 11) 中村, 城: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 65 (1959).
- 12) 谷, 異: 本誌, **36**, 365 (1958).
- 13) 田中, 川北: 本誌, **29**, 393 (1951).
- 14) 寺本, 橋田, 向井: 本誌, **36**, 34, 120 (1958).
- 15) 寺本, 橋田: 本誌, **33**, 9, 403, 476 (1955).
- 16) 福井, 谷: 本誌, **29**, 257 (1951).
- 17) 福井, 谷: 本誌, **31**, 4 (1953).
- 18) 谷: 本誌, **36**, 360 (1958).
- 19) 寺本, 橋田, 向井: 本誌, **36**, 443 (1958).
- 20) 原, 大塚: 本誌, **44**, 819 (1966).
- 21) 原, 大塚: 本誌, **44**, 824 (1966).
- 22) 原, 大塚: 本誌, **45**, 46 (1967).
- 23) 霜, 福住: 台糖研報, **20**, 105 (1962).
- 24) 百瀬, 外池: 昭和40年度農化大会講演.
- 25) 原, 大塚, 高木: 本誌, **44**, 490 (1966).

(昭41. 5. 2 受付)