

アルコール発酵の最適温度の測定

大橋淳史*・福山勝也**・大場茂*

A Measurement of Optimum Temperature for Alcoholic Fermentation

Atsushi OHASHI, Katsuya FUKUYAMA and Shigeru OHBA

概要

慶應義塾大学日吉キャンパスにおける文系学生を対象とした化学実験のテーマの1つとして、アルコール発酵に関する実験を開始した。その際に、反応容器として注射筒を用いる簡便な方法を採用した。学生への指導上の参考データを得るために、発酵速度の温度依存性を測定し、最適温度が約45°Cであることを確認した。また60°C以上になると発酵が停止するが、そのときの酵母と酵素の状況についてもあわせて考察した。

1. はじめに

酒、味噌やしょうゆなどのように、発酵を利用した食品や調味料は学生にとって大変身近なものであり、これに関連する実験テーマを導入することは生化学を学ぶ上でよい機会となる。土壌などに生息し空気中を浮遊する微生物によって食品は変質していくが、それが人間にとって有用な物質を生成する場合、これを発酵という。¹⁾ 一方、そうでない場合は腐敗と呼んで区別する。いずれにしても、微生物の代謝作用で物質が変換されている点では同じ現象である。ブドウの搾り汁からワインができるように、糖が分解されてアルコールが生じる場合をアルコール発酵と呼ぶ。歴史的にみてもフランスのラボアジェをはじめとしてパスツールなどがアル

* 慶應義塾大学化学教室 (〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1) : Department of Chemistry, Keio University, Hiyoshi 4-1-1, Kohoku-ku, Yokohama 223-8521, Japan.

** 慶應義塾大学日吉キャンパス特色 GP 非常勤研究員・明治学院大学教養教育センター (〒244-8539 横浜市戸塚区上倉田町1518) : Center for Liberal Arts, Meiji Gakuin University, 1518 Kamikurata, Totsuka-ku, Yokohama 244-8539, Japan. [Received 5. Aug, 2008]

コール発酵の研究にかかわっている。²⁾ また、酵素の発見ならびにその構造や機能の解明において、ノーベル賞受賞者が多く輩出されていることから、生化学分野への導入部分として学習する上で適していると言える。^{3, 4)}

アルコール発酵は生物学の実験テーマとして、高校の教科書⁵⁾でも取り扱われているが、これを化学反応としてとらえ、中学校でもできるような実験として普及させる試みもなされている。⁶⁾ しかし実験操作はたとえ簡単でも、実験テキストの解説や課題を通して、酵素およびその反応に関する深い理解を学生に要求することで、大学の化学の実験テーマとなり得ると我々は考えた。実際に実験してみたところ、最適温度はそう簡単には求まらなかった。以上の経緯から、アルコール発酵の要点ならびに実験操作上の注意点をまとめておくことにした。

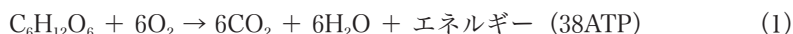
2. アルコール発酵の原理

2-1. 酵母

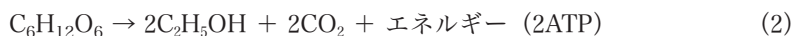
酵母は真核単細胞生物であり、特にビールやパン作りに用いられる醸造用の酵母はサッカロミセス属のセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) と呼ばれる菌である。これは細胞から芽がでて成長し、それが娘細胞となり、元の母細胞から分離することにより増殖していく。¹⁾ その倍加時間 (平均世代時間) は周囲の環境にもよるが、約2時間である。⁷⁾ また、生育最適温度は25～30℃であり、40℃を超えると生育できず、60℃では10～15分で死滅する。

2-2. 好気呼吸と嫌気呼吸

酵母菌は空気中では通常の呼吸 (好気呼吸) を行い、糖を二酸化炭素と水に分解する。グルコースについては、全過程の化学式は次のように書ける。



反応によって生じるエネルギーは熱として半分程度は失われてしまうが、ATP (アデノシン5'-三リン酸) という物質の結合エネルギーに変換される。一方、酸素不足の状態では、嫌気呼吸によってグルコースがピルビン酸 $\text{CH}_3(\text{CO})\text{COOH}$ をへてエタノールと二酸化炭素に分解される。



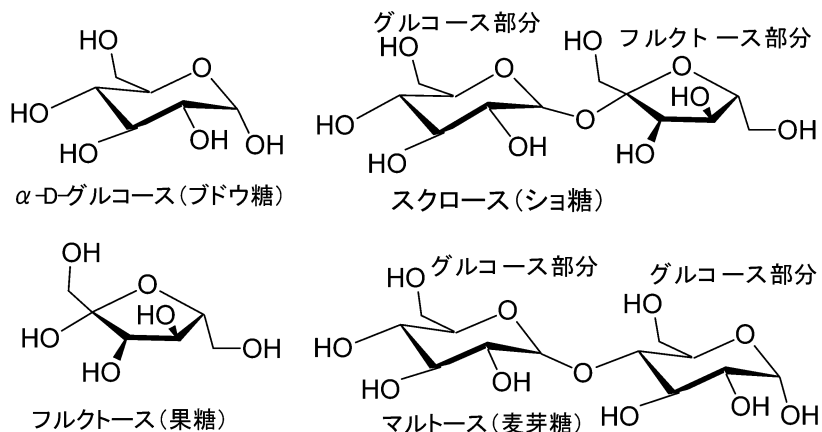
ATP は生物にとってエネルギーの貯蔵分子であり、ATP が ADP (アデノシン5'-二リン酸) に変わるときのエネルギーを各種の生命活動に使用する。この点で、嫌気呼吸はグルコース 1 モルから ATP を 2 モルしか作らないので、好気呼吸に比べて効率が悪い。

酵母によって発酵する糖は、その種類が限られている (表1)。酵母には実に15種類もの糖系酵素が含まれており、グルコースをピルビン酸に変えるのに約10種類もの酵素が働く。³⁾ ピルビン酸は酵素 (カルボキシラーゼ) によって二酸化炭素を放出してアセトアルデヒド CH_3CHO となり、さらにそれが別の酵素 (アルコールデヒドロゲナーゼ) によって還元され、エタノールとなる。スクロースは酵素 (インベルターゼ) によって加水分解され、グルコース

表 1. 酵母による発酵反応の基質依存性 (活性は○, 不活性は×)

単糖類	二糖類	多糖類
○ グルコース (ぶどう糖)	○ スクロース (ショ糖)	× アミロース*
○ フルクトース (果糖)	× マルトース (麦芽糖)	

*アミロースはマルトースのようにグルコースが連続してつながったもので、でんぷんの1分子種である。



とフルクトース (いずれも分子式は $C_6H_{12}O_6$) になる。



2-3. 酵素反応の速度

酵素 E と基質 S が反応すると、錯合体 ES が形成され、そして生成物 P ができるが、酵素 E は変化しない。つまり酵素は生体反応の触媒の役割をしている。



この反応速度は、基質の濃度 [S] が十分低いときには [S] に比例する。また、酵素が効率よく働くためには温度ならびに pH の制限も加わる。酵素反応は通常の化学反応と同様に温度が高いほど速くなるが、温度が高すぎると酵素の活性が落ちるために反応が遅くなる。このバランスがとれた温度で反応が最も速くなるが、その温度を最適温度という。なお、酵母を用いた発酵の反応速度は、酵母の濃度が高いほど大きくなる。糖の濃度は、ある程度以上に保てば、反応速度にあまり影響しない (詳細は付録を参照)。

3. 実験および結果

3-1. 実験器具

反応容器は、文献⁶⁾を参考にして、ガラス製注射筒を用いることにした (図 1)。ルーアーロ

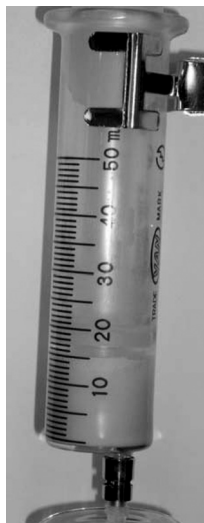


図1. 注射筒に入れたスクロース酵母液

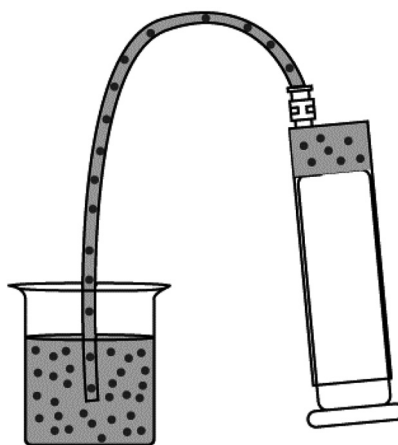


図2. 注射筒へのスクロース酵母液の注入（黒点は酵母を模式的に表している）

ック先の注射筒には、プラスチック製の部品（ルーアフィッティング）を簡単に脱着させることができる。ルーアフィッティングには各種形状のものが市販されており、その中にはシリコンチューブをつなげることができるもの（テーパー）があるので、それに内径3 mmφ、長さ30 cmのシリコンチューブをつないでおき、注射筒への液の吸い込みや注射筒内に入った空気を抜く場合に使うことにした（図2）。液の注入が終わったら、チューブ付のテーパーをはずし、穴があいていないもの（プラグ）とはめかえて、測定を開始する。また、長さ5 cm程度のシリコンチューブの両端にテーパーをつけておき、発酵により発生した気体（二酸化炭素）を別の注射筒に移して、石灰水による白濁の観察実験も行えるようにした。

3-2. 実験操作

ビーカーに5%スクロース水溶液を50 ml 入れ、ガラス棒で攪拌しながら乾燥酵母2.5 gを少しずつ入れて完全に懸濁する。この酵母スクロース液をガラス棒でよく攪拌してから、シリコンチューブを通して50 mlのガラス製注射筒に吸い上げ、注射筒の先を上に向けて中の空気をぬき、酵母スクロース液を正確に10 ml だけ筒内に残す。次に注射筒の先端にキャップをつけ、液がもれないようにする。この注射筒を逆さまにしてスタンドに立てて室温で静置し、発生する二酸化炭素の体積を5分毎、40分間測定する。

室温よりも高い温度（40～50℃）については、ウォーターバスの中に300 ml ビーカーを入れて、そのビーカーの中にもお湯を汲んでおく。注射筒をキャップが下になるようにしてビーカー内のお湯の中に入れて、発生する二酸化炭素の体積を1分毎、20分間測定する。ウォーターバスの温度を60℃以上にする場合は、発酵がどの時点で止まるのかを確認するために、気体の発生量を1分毎、15分間測定する。

3-3. 注射筒の目盛り

注射筒の内筒の先端は面取りしてあるため、真の内筒の先端①とそれが外筒に接している位置②とは目盛りの上で1 mlの違いがある(図3)。最初の酵母液注入の際は、①の目盛りで10 mlに合わせるが、その後の気体発生の際は乳褐色の酵母液にさえぎられて①の位置が不明瞭なため、②の目盛りを読むことになる。しかし、反応速度を求める際には、気体の体積の増加の割合だけが問題になるので、この①と②の目盛り1 mlの差は実験結果に影響を与えない。なお、気体の体積は液体の体積を差し引かねばならないので、便宜上、

$$\text{発生した気体の体積} = \text{目盛り②} - 10 \quad (5)$$

とすることにした。グラフの直線を引く際には、必ずしも原点は通らないことに注意しなければならない。

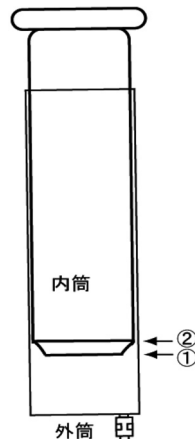


図3. 注射筒の目盛り
(①は真の内筒の先端、②は内筒が外筒と接している位置)

3-4. 反応速度データ

学生の実験が正しく行われているかを判断するためには、模範的なデータの収集が必要である。そこで、予備実験をおこなった。調製した5%スクロース液の糖度をデジタル式糖度計で測定したところ5.2であった。このスクロース液50 mlに乾燥酵母* 2.5 gを懸濁し、ガラス棒に付着した酵母もできるだけ溶液中に散らばるようにした。このようにして、酵母液を4回測定分ずつまとめて作ることにした。また、注射筒に吸い上げる前に、ビーカー内の酵母液を毎回よくかき混ぜた。注射筒は乾燥しているものを数本用意し、それぞれの測定ごとに1本ずつ使用した。

- (1) 1回目： 室温(23°C)と35°Cを並行して測定し、約40分後に45°C、さらに15分後に55°Cの測定を開始した。
- (2) スクロース酵母液50 mlを同様に調製してから、
2回目： 40°Cと50°Cを並行して測定し、30分後に60°Cと65°Cの測定を同時に開始した。
- (3) データの再現性を確かめ、また最適温度を確定するために、反応が速い温度領域について再測定を行った。スクロース酵母液50 mlを調製してから、10分後、
3回目： ①40°Cと②45°Cを並行して測定し、さらに30分後に③50°Cと④55°Cを並行して測定した。それぞれの測定終了直後に注射筒内のスクロース酵母液をろ過して糖度を測定したところ、①4.9、②4.5、③4.3、④4.4となった。

スクロース酵母液の調製後2時間30分が経過した時点でろ過し、糖度を測定したところ、2.2であった。つまり、液を調製したビーカー内でも室温において糖が酵母によって徐々に消費されていることを示している。ただし、文献⁶⁾によると、アルコール発酵速度は基質濃度に

* 乾燥酵母として日清フーズ(株)製のスーパーカメラヤを用いた。メーカーに問い合わせ、この酵母の種類が*Saccharomyces cerevisiae*であることを確認した。

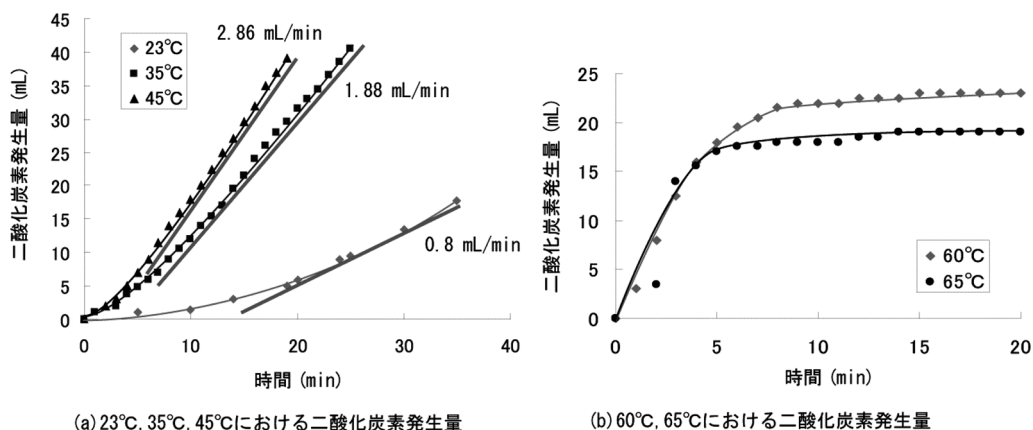


図4. 二酸化炭素発生量の時間変化

あまり敏感ではないと推定されるので、30分程度での糖度低下は、気体発生量にあまり影響しないと考えることができる。

発生した気体の体積(式5)を時間についてプロットし、その直線部分の傾きから反応速度を求めた(図4)。ただし、はじめの数分間など、直線にのらない部分は除外して傾きを求めた。なお、60°Cでも65°Cでも反応が停止することが確認できた。(10分で気体の発生がほぼ止まり、15分で完全に停止した)。このようにして求めた反応速度データを表2(a)に示す。最適温度の判定は、このデータにさらに補正を加えてから行う必要があったが、これについては考察で述べる。

3-5. ヨードホルム反応によるエタノールの検出

発酵させた後のスクロース酵母液にエタノールが生成していることを確認する際に、ヨードホルム反応を用いる。(ヨードホルム反応の機構は、最後に参考として解説を付けた)。ただし、この実験操作については参考文献によって多少の違いがあり、どれが適切であるかわからなかった。そこで実際に実験をおこない、教科書⁵⁾に書かれていた実験操作がわかりやすかったので、それを基本とすることにした。実験操作は以下の通りである。

- ①発酵後のスクロース酵母液をろ過し、ろ液にヨウ素ヨウ化カリウム溶液(水15 mlにヨウ素0.6 gとヨウ化カリウム1.5 gを溶解して調製)を2 ml加える。
- ②振り混ぜながら、3 M 水酸化ナトリウム水溶液を、色が消えるまで滴下する。
- ③70~80°C程度の湯につけてあたため、もとのろ液のおいと比較する。

ただし、③については加熱を行わなくてもヨードホルムのにおいの強さに特に大きな違いはなかったため、この加熱は行わないことにした。

4. 考察

4-1. 酵母の増殖

スクロース溶液に酵母を懸濁し、室温（23℃）で30分放置した場合、増殖による酵母濃度の上昇はどの程度であろうか。実験に用いた乾燥酵母は予備発酵が不要のタイプであった。これをスクロース液に懸濁し終わった段階で対数期に入ったとみなし、また倍加時間を120分とすると、30分間では $2^{30/120}=1.19$ 、つまり個体数は約1.2倍となる。表2（a）を見ると、45℃と50℃の測定データの再現性が悪いようにみえるが、しかしこれは次のように解釈することができる。測定 No. 3（45℃）では酵母液調製直後に測定を行い、2.29 ml/分という値を得たが、測定 No. 1（45℃）では調製後40分が経過してから実験を開始したため、2.86 ml/分（1.25倍）の速度となった。また、測定 No. 2（50℃）では調製直後に測定を行い、2.00 ml/分という値を得たが、測定 No. 3（50℃）では調製後30分が経過してから実験を開始したため、2.48 ml/分（1.24倍）の速度となった。30分経過すると酵母濃度が1.2倍になるという計算とよく対応している。そこで、倍加時間を2時間と仮定して、測定開始前の増殖による酵母濃度の増加を補正し、表2（b）に示した。

表2. アルコール発酵による気体発生速度（ml/分）

(a) 生データ

測定 No.	温度（℃）							
	23（室温）	35	40	45	50	55	60	65
(1)	0.80	1.88		2.86		2.00		
(2)			2.00		2.00		*	*
(3)			2.11	2.29	2.48	1.90		

* 10分後に体積の増加がほぼ停止した。

(b) スクロース酵母液調製後の時間経過の補正後

測定 No.	温度（℃）					
	23（室温）	35	40	45	50	55
(1)	0.80	1.88		2.27		1.46
(2)			2.00		2.00	
(3)			1.99	2.16	1.97	1.51
平均値	0.80	1.88	1.99	2.22	1.98	1.48

(注) 測定開始前の増殖による酵母濃度の増加を補正した。

(c) 気体の熱膨張の補正後

	温度（℃）					
	23（室温）	35	40	45	50	55
平均値	0.80	1.81	1.89	2.06	1.82	1.34

(注) 発生した二酸化炭素の各温度における体積を、室温における体積に換算した。

では、気体発生測定中の酵母菌の増加はどのように扱えば良いだろうか。生理温度の範囲を超えると酵母は生育しないので、室温での測定が問題となる。図4 (a) をみると、23°Cのプロットが曲線の傾向を示しており、時間とともに反応速度が大きくなっている。つまり酵母濃度増加の影響が出ていて、どこの部分のプロットを使って直線の傾きを求めるかについて、任意性が生じる。ただし、学生実験としてみた場合、温度による反応速度の違いがはっきり出れば目的は達するので、特に支障とはならない。

4-2. 二酸化炭素の体積

本実験では二酸化炭素の発生量を体積として測定している。プラスチック製注射筒とは異なり、ガラス製の注射筒は内筒が滑らかに動くので、内圧の増加分は無視できる。しかし、温度上昇による気体の熱膨張の効果は無視できない。理想気体と仮定した場合、状態方程式から分かるように気体の体積は絶対温度に比例する。したがって、同じ物質量の二酸化炭素でも、室温(23°C)から45°Cにすると体積が1.07倍となる。つまり、温度が高いほど気体が膨張し、それが反応速度の数値を見かけ上大きくしている。二酸化炭素の物質量にもとづいて反応速度を比較するためには、発生した気体の体積を室温における気体の体積に換算する必要がある。この補正を行った後の反応速度データを表2 (c) と図5 に示す。結論として、最適温度は約45°Cと見積もられた。

スクロース溶液を作る際にイオン交換水を使用しているが、空気に長い間触れているので、二酸化炭素が溶けて飽和しているとみなせる。室温(23°C)において純水10 ml 当たり、二酸化炭素が約11 ml 溶ける。45°Cではそれが約7 ml に減るので、その差、約4 ml がスクロース溶液から注射筒内に放出されることになる。いずれにしても、アルコール発酵で発生した二酸化炭素は、常圧下ではスクロース溶液に吸収されることなく、気体として放出される。また、温度上昇により溶液中の二酸化炭素が過飽和となり放出された分は、二酸化炭素発生量をかさ上げするが、測定開始直後のデータは反応速度の解析には使用しないので、結果には影響しない。

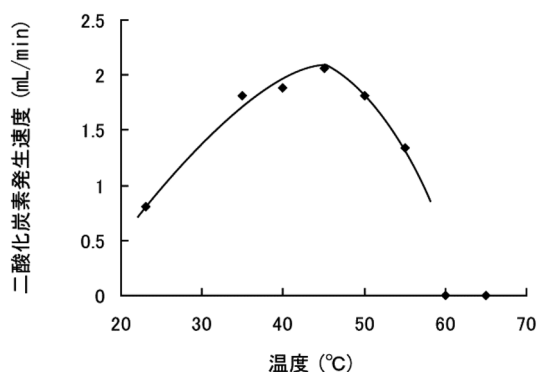


図5. 反応速度の温度変化 (ただし、酵母初期濃度と気体の熱膨張による影響の補正後)

4-3. 最適温度

酵素反応の速度が最も高くなる温度を最適温度という。今回の実験によりアルコール発酵の最適温度は約45℃と求まった。しかし、この温度は酵母にとって、決して快適な温度とはいえない。すでに生理的溫度範囲を超えているため、酵素のうちで温度感受性の高いものが不活性化し、それによって増殖が止まっているからである。⁷⁾しかし、嫌気呼吸は活発に行われ、時間経過とともに糖度が低下していくことから、糖が酵母の体内に取り入れられ消化されていることがわかる。最適温度を超えると、代謝に関わる酵素の熱変性の影響が強くなり、反応速度が低下する。高温(60℃)で発酵が止まるのは、酵母が死ぬからである。この加熱致死の原因としては、タンパク質(酵素)の熱変性、細胞膜の熱損傷、DNAの損傷、代謝系の反応速度のアンバランス化などの諸説がある。⁷⁾

5. 学生実験への対応

5-1. 実験指導上の注意

- ①スクロース液は作り置きが可能であるが、それに酵母を入れたものは発酵および増殖が進行してしまうため保存することができない。スクロース酵母液は、大量に作ってそれを共用するよりも、各実験グループが、測定直前にスクロース液に酵母を混ぜた方がより正確なデータが得られる。さらに、スクロース酵母液を分け取る際に、酵母の濃度が均一になるように毎回良く攪拌することが重要である。一旦懸濁させても、酵母が沈殿してくるからである。
- ②室温よりも高い温度について測定する場合、ウォーターバスに入れたビーカー内の水が湯浴の温度と一致するように、ビーカー内の水を汲み替えてから実験することが肝要である。
- ③酵母は味噌のようなにおいがするので、実験に使用したろ紙などは回収した方が良い。

5-2. 発酵ジュースの用意

文献⁸⁾では、アルコール発酵をより身近なものとして実感できるように、果汁を用いて実験することを提案している。基質5種類(ミカン、バナナ、ブドウ、トマト、リンゴ)を30℃(ディスポーザル注射筒内)にて発酵させ、発生した二酸化炭素の体積を1時間追跡している。これによるとブドウの果汁が一番反応性が高い。

本実験テーマでは、注射筒の中で発酵させているが、あまり実感が伴わない。そこでそれを補うために、発酵させたブドウジュースを用意して、希望する学生にその味を試してもらうことにした。(作り方は付録を参照)。これにより、二酸化炭素の発生と糖度の低下、ならびに少量ではあるがアルコールの生成を、すべて舌で感じるができる。これはアルコール発酵をより身近なものとして学生に感じてもらうのに有効と思われる。

5-3. 酵母の顕微鏡観察

アルコール発酵の実験ではパン酵母を使用しているが、それがどの位の大きさでどのような

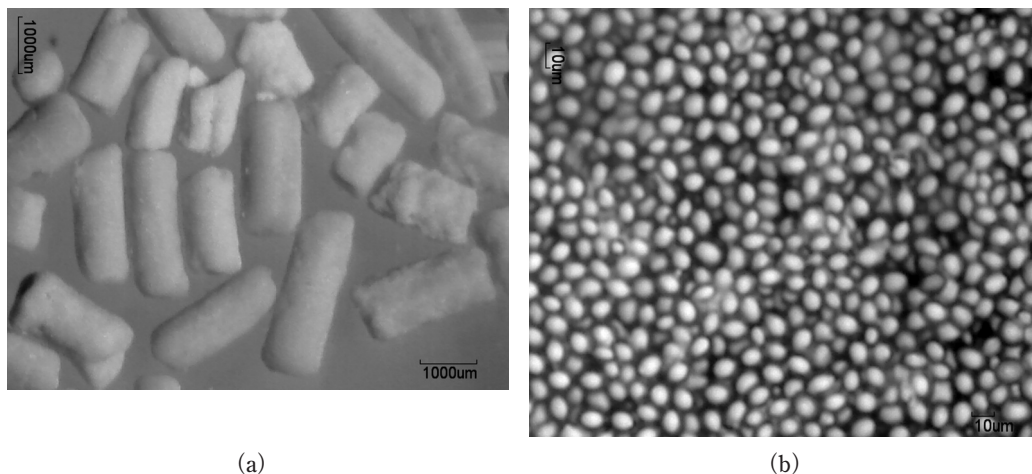


図6. 酵母の顕微鏡写真、(a) 顆粒状の乾燥酵母（実体顕微鏡のズーム1倍）、(b) 乾燥酵母を水で溶きうすく広げたもの（生物顕微鏡の対物レンズ40倍）

形をしているのかということ、実験をする者にとって非常に興味深い。そこで三眼の実体顕微鏡および生物顕微鏡とそれに接続可能なカメラのデジタルシステムを導入し、パソコン画面を通して観察し写真が撮影できるようにした。顆粒状の乾燥酵母を水に溶き、スライドガラス上に薄く広げて顕微鏡で観察すると、それがだ円体形をした酵母（直径 $10\mu\text{m}$ 程度）の大集団であることがわかる（図6）。

謝辞

ここで報告したアルコール発酵の最適温度の測定実験は、慶應義塾大学調整費および文部科学省「特色ある大学教育支援プログラム（平成17年度採択）文系学生への実験を重視した自然科学教育」からの助成金を用いて行われた。

参考文献

- (1) 「発酵」（小泉武夫著，中公新書，1989年）。
- (2) 「新訳ダンネマン 大自然科学史」（安田徳太郎訳編，三省堂，1978年）第10巻，p.304-308。
- (3) 「生化学をつくった人々」（丸山工作著，衣華房，2001年）。
- (4) 「酵母のライフサイクル：ノーベル賞にかがやいた酵母の話」（菊池韶彦，サイエンス社，2006年）。
- (5) 「新版 生物 I B」（実教出版2001年）p.83-85。
- (6) 鹿児島県総合教育センター「指導資料 理科」第240号 微生物による化学反応（2003年11月発行）。

-
- (7) 「微生物科学 2. 成長・増殖・増殖阻害」(柳田友道著, 学会出版センター, 1981年)。
(8) 群馬県総合教育センター「教育研究(平成13年度)」アルコール発酵の簡単な実験(武倫夫)。

参考

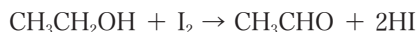
(1) アルコール発酵の速度を決める要因

発酵の実験条件を変えたときの、発生した二酸化炭素の体積の時間変化の測定例が文献⁶⁾に掲載されている。その結果は次の通りである。

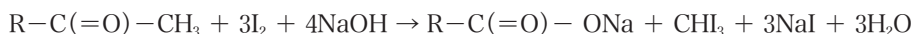
(a) 基質依存性： グルコースとスクロースは酵母により発酵するが、マルトース、ラクトース、デンプンでは発酵は起こらない。(b) 基質濃度依存性： 温度と酵母の量を一定にしてグルコースの濃度を変えると、基質濃度が高いほど、反応速度が大きい。(ただし、濃度1%と10%とでは、3：4程度の違いしか現れない)。(c) 酵母濃度依存性： 温度を一定にして酵母の濃度を変えると、酵母濃度が高い程、反応が速くなる。(d) 温度依存性： 0°Cおよび70°Cでは反応速度がゼロである。(最適温度を明確に示すようなデータは文献⁶⁾では提供されていない)。(e) pH 依存性： pH = 1, 3, 7, 9, 11の反応速度を比べると、pH = 7が最も大きい。

(2) ヨードホルム反応の機構

ヨウ素 I₂は還元されやすく、ヨウ化物イオン I⁻に変化する。またそれに伴ってエタノールは酸化されてアセトアルデヒドになるが、その反応式は次のように書くことができる。



ヨードホルム反応は、アセチル化合物に塩基性条件下、ヨウ素を作用させる反応であり、全体の反応式は一般に次のように書ける。(Rはアルキル基を表わす)。



反応機構は以下の通りである (図7)。

- ①カルボニル基に隣接したメチル基の水素Hが水酸化物イオン OH⁻によって引き抜かれる。それによって生じた炭素アニオンがヨウ素 I₂を攻撃し、ヨウ素原子Iを受け取る。
- ②同じような反応がもう2回繰り返され、メチル基の水素Hがすべてヨウ素Iと置き換わる。
- ③ OH⁻がカルボニル炭素を攻撃し、C(=O)-CI₃の結合が切れてヨードホルム CHI₃が生成する。ヨウ素原子Iが電子吸引性で、CI₃⁻イオンが安定化するため、このようなC-C結合の開裂がおこる。

(3) 発酵ブドウジュースの作り方

インターネットで公開されていたレシピを参考にして、実際に何回か試行して以下の方法にたどりついた。500 mlのペットボトルをよくゆすぎ、乾燥させておく。コップに100%ぶどうジュースを約100 ml入れ、攪拌しながら乾燥酵母約0.5 gを少しずつ入れて懸濁する。それを500 mlペットボトルに入れ、さらにぶどうジュースを加えて200 ml程度にする。キャップをよくしめ、室温で1日以上放置する。(レシピとしては、これに砂糖を15~20 g加えることになっているが、糖度低下がわかるようにするため、砂糖の添加はやめる)。翌日、ペットボトルのふたを慎重にあげて、内圧が上がっていることを確認する。^{注1)} 半分程度コップに注いで

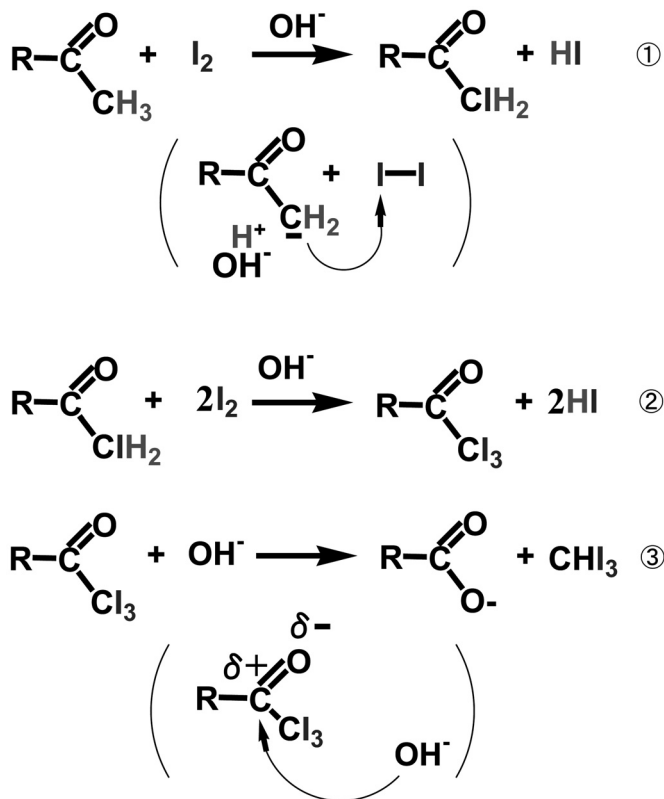


図7. ヨードホルム反応の機構

炭酸ができていることを確認し、ペットボトルに新しいブドウジュースを追加し、また放置する。これを数日くりかえすと、酵母がボトルの底に沈んで液の透明度が増し、徐々に味噌臭さがとれてくる。^{注2)} 何もしていない元のブドウジュースと、既に（4日程度）発酵させたブドウジュースを用意して、味を比べると違いがわかる。

注1) 発酵実験中のペットボトルは決して振ってはならない。内圧があがり、フタを開けると同時にジュースが勢いよく飛び散り、部屋を汚してしまう。

注2) 発酵させたまま数日放置すると、はっきりわかる程度にアルコール濃度が上がるので不用意に飲まないように注意する必要がある。

