

# 清酒製造工程及び清酒から分離された乳酸菌(火落菌，腐造性乳酸菌)の性質

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| 誌名    | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan             |
| ISSN  | 09147314                                                      |
| 著者名   | 稲橋,正明<br>戸塚,堅二郎<br>相良,沙奈恵<br>田中,裕三<br>岡崎,直人<br>石川,雄章<br>佐藤,和夫 |
| 発行元   | 日本醸造協会                                                        |
| 巻/号   | 109巻8号                                                        |
| 巻号補足  |                                                               |
| 掲載ページ | p. 603-612                                                    |
| 発行年月  | 2014年8月                                                       |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 清酒製造工程及び清酒から分離された 乳酸菌（火落菌，腐造性乳酸菌）の性質

稲橋正明<sup>1</sup>・戸塚堅二郎<sup>2</sup>・相良沙奈恵<sup>2</sup>・田中裕三<sup>2</sup>・  
岡崎直人<sup>1</sup>・石川雄章<sup>1</sup>・佐藤和夫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>日本醸造協会, <sup>2</sup>東京農業大学)

平成 25 年 12 月 4 日受理

Properties of lactic acid bacteria (acid producing bacteria and hiochi bacteria)  
isolated from sake and the sake brewing process.

Masaaki INAHASHI<sup>1</sup>, Kenjiro TOTSUKA<sup>2</sup>, Sanae SAGARA<sup>2</sup>, Yuzo TANAKA<sup>2</sup>,  
Naoto OKAZAKI<sup>1</sup>, Takeaki ISHIKAWA<sup>1</sup> and Kazuo SATO<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Brewing Society of Japan, 2-6-30, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114-0023, Japan and <sup>2</sup>Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo  
University of Agriculture, 1-1 Sakuragaoka 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan)

Recently (after 1990), we attempted to isolate lactic acid bacteria from *koji*, seed mash (*moto* or *shubo*), main mash (*moromi*), and sake. Most lactic acid bacteria are unsuited for sake brewing in developing *moromi* with excessive acid accompanied by an off flavor due to acetic acid and diacetyl.

We isolated lactic acid bacteria from 24 samples: 2 strains from *koji*, 1 from brewing water, 2 from *shubo*, 7 from *moromi*, 1 from stored sake in a brewery, and 11 from sake in the market. These bacteria were all bacilli except for 1 bacterium (coccus) isolated from a *koji*.

On the natures of these strains: Thirteen strains were lactic acid bacteria having homo fermentation, and 11 strains had hetero fermentation. Twenty two strains were able to grow in 10% alcohol containing a medium (BCG or SI medium). The strains which produced diacetyl at more than its detectable threshold comprised only about 1/3 of the total. It was confirmed that strain No.8 was able to convert more than 99% of its malic acid to lactic acid. We concluded that the strain was of malo-lactic fermentation bacteria which were isolated from the main mash prepared with *yamahaimoto* seed mash.

Strain No.8 was identified as *Lactobacillus paracasei* by the similarity of its 16S rRNA sequence to that of related *Lactobacilli*.

**Key words** : 乳酸菌, 火落菌, 腐造性乳酸菌, MLF 菌, 清酒製造工程, 清酒

### 緒 言

近年、清酒の多様化にともない、乳酸菌が関与する生酛造りや山麴造り、あるいは生酒や低アルコール酒が増加していることから、火落ちの危険性が高まっている可能性がある。しかも、最近の火落ち酒には、以

前のように典型的な異臭（火落臭といわれるジアセチル臭、酸臭など）や極端に酸度が増加するものは少ない傾向が見られる。この一因は、原料米の精米歩合が低くなっていることにあるとも推察されるが、確かなことは明らかにされていない。我々は近年（1990年以降）、蔵内酒を含む酒造場の各製造工程及び市販清

酒から火落菌及び腐造性乳酸菌など各種乳酸菌の分離を試み，酒造における微生物管理のための知見とするため，その性質を検討し，あわせてマロラクティック発酵に用いる菌（以後，ML菌と略記する。）としての可能性を目的に検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 供試菌株とその分離源

供試菌株の分離源と分離年を Table 1 に示す。これらの分離源としての試料は，腐造とはいえないが酸が多くなったため，原因究明のために酒造場から提供を受けた，醪，酒母及び関連する麹等から分離し，試験に供したものである。分離年が重複していないことからわかるように，同一の仕込みに用いた麹や酒母，醪に相当するものはない。また，製成酒については，テリが「わるい」あるいは「ややわるい」という理由で原因究明に提供を受けた試料も含まれる。なお，Table 2 に示す 4 菌株は対照の標準株として必要に応じて適宜用いた。

### 2. 菌の形態と発酵型ヘテロ，ホモの決定

光学顕微鏡により，倍率 1,000 倍下で形態を観察した。本研究では便宜上，球形のものを球菌，幅（細胞の短径）と長さ（細胞の長径）がほぼ等しい（1~2  $\mu\text{m}$ ）ものを短桿菌，長さが 10~15  $\mu\text{m}$  のものを桿菌，それ以上のものを長桿菌（大桿菌）とした。検鏡下で長桿菌に見えても個々の細胞が直線的に連なっている場合があり，その判別に注意して形態を決定した。ヘテロとホモの決定は，菅間らの方法<sup>1)</sup>によった。すなわち，0.2% システイン添加 SI 培地（Table 3）を試

**Table 2** Lactic acid bacteria used as a standard strain for reference.

| No. | Strain                                               |
|-----|------------------------------------------------------|
| 1   | <i>Lactobacillus fructivorans</i> ATCC15434 (hetero) |
| 2   | <i>Lactobacillus homohiochii</i> S-26 RIB8263 (homo) |
| 3   | <i>Lactobacillus casei</i> S-4 RIB8450 (homo)*       |
| 4   | <i>Lactobacillus hilgardii</i> S-7 RIB8400 (hetero)* |

\*These strains were isolated from the drainage ditch of the sake brewery of The National Research Institute of Brewing (RIB) in 1968.

**Table 1** Resource and sampling year of isolated lactic acid bacteria.

| No. | Resource            | Sampling year | Notes for resource                                              |
|-----|---------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1   | <i>Koji</i>         | 1990          | <i>Karashi</i> (kept for 1 day at room temperature) <i>koji</i> |
| 2   | <i>Koji</i>         | 1992          | The same as stated above.                                       |
| 3   | Water for brewing   | 1995          | Well water                                                      |
| 4   | <i>Sokujo-moto</i>  | 1994          | Rapidly processed seed mash                                     |
| 5   | <i>Yamahai-moto</i> | 2001          | Seed mash by conventional method                                |
| 6   | <i>Moromi</i>       | 2000          | <i>Moromi</i> prepared with <i>Sokujo-moto</i> .                |
| 7   | <i>Moromi</i>       | 2008          | <i>Moromi</i> just before filtration                            |
| 8   | <i>Moromi</i>       | 2008          | <i>Moromi</i> prepared with <i>Yamahai-moto</i>                 |
| 9   | <i>Moromi</i>       | 2008          | <i>Moromi</i> prepared with <i>Sokujo-moto</i>                  |
| 10  | <i>Moromi</i>       | 2008          | The same as stated above.                                       |
| 11  | <i>Moromi</i>       | 2008          | The same as stated above.                                       |
| 12  | <i>Moromi</i>       | 1995          | The 7-8th day of <i>moromi</i> having excessive acidity         |
| 13  | Sake                | 1990          | Unpasteurized sake stored in a brewery                          |
| 14  | Sake                | 1999          | Low alcohol (5.5%) sake in the market                           |
| 15  | Sake                | 1992          | <i>Hiochi-shu</i>                                               |
| 16  | Sake                | 2000          | Unpasteurized sake ( <i>Namazake</i> ), in the market           |
| 17  | Sake                | 2000          | } <i>Hiochi-shu</i>                                             |
| 18  | Sake                | 2001          |                                                                 |
| 19  | Sake                | 2005          |                                                                 |
| 20  | Sake                | 2007          |                                                                 |
| 21  | Sake                | 2008          |                                                                 |
| 22  | Sake                | 2009          |                                                                 |
| 23  | Sake                | 2009          |                                                                 |
| 24  | Sake                | 2009          |                                                                 |

*Hiochi-shu* is a sake infected with a lactic acid bacteria involved in the increase of turbidity and acidity in sake.

**Table 3** Composition of media for lactic acid bacteria.

|                                 | BCG medium | SI medium |
|---------------------------------|------------|-----------|
| Glucose                         | 24.8       | 25.6      |
| Yeast extract                   | 10         | 9.7       |
| Polypeptone                     | 5          | 4.9       |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.1        | 0.1       |
| MnSO <sub>4</sub>               | 0.0025     | 0.002     |
| Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.0025     | 0.002     |
| Sodium acetate                  | —          | 7.9       |
| Citric acid                     | —          | 1         |
| Mevalonic acid                  | —          | 0.004     |
| Tween 80                        | —          | 0.05      |
| Sodium azide                    | 0.05       | 0.05      |
| Actidione                       | 0.005      | —         |
| BCG*                            | 0.01       | —         |
| Agar                            | —          | 0.7       |
| Water                           | 1.0 L      | 1.0 L     |

The unit for numerical values is the gram except for water.

\*BCG : Bromine cresol green

Each chemical was dissolved in 1 L distilled water and pasteurized for 10min at 115°C before the addition of ethanol.

The pH value of BCG medium was adjusted to 5.2 prior to pasteurization.

験管にとり、 $2.0 \times 10^5$  cell/mLになるよう植菌した後、Vaspar で厚さ 10 mm に封をして、28°C、6 日間培養を行った。生育が顕著な菌をホモ、生育困難または生育しないものをヘテロとした。

### 3. 菌数の計測

適宜希釈した試料について、国税庁所定分析法<sup>2)</sup> 221-11 に準じ、トーマ氏血球計測器を用い、光学顕微鏡下で計測した。生菌数（率）の測定は、メチレンブルー染色法<sup>3)</sup>を一部改変して行い、染色された細胞（Ps）と非染色細胞（Pt）の比、 $Pt-Ps/Pt \times 100$ をもって生菌率（%）とした。また、660 nm の吸光度を測定して算出する方法も適宜用いた。

### 4. 培地及び培養

#### (1) 麴汁及びアルコール添加麴汁培地

常法により Brix 24 の麴汁培地を調製した。この Brix 24 の麴汁培地に所定の最終アルコール濃度（v/v）になるよう試薬特級エタノールを添加し、さらに加水して Brix 10 のアルコール添加麴汁培地を調製した。

#### (2) 培地

日本醸造協会製の火落菌検出培地（以下 SI 培地）

及び生酸菌検出培地（以下 BCG 培地）の組成は Table 3 に示すとおりであり、これに所定濃度のエタノールを含有させるなど、それぞれの使用目的に応じて調製した。

培地として用いた清酒は、市販の純米酒（原料の精米歩合 65%，アルコール度数 16 度）をそのまま用いたが、使用に先立って火落菌が不検出であることを確認した。

#### (3) 培養

前培養として、28°C で 5 日間静置培養して得た菌体を、初発菌体密度  $1.0 \times 10^7$  cell/mL になるよう、所定の培地に植菌し、28°C で 7 日間または 14 日間静置培養した。

### 5. 有機酸及びジアセチルの定量

島津製高速液体クロマトグラフを用いて行った。

分析条件は以下の通りである。

#### 1) 有機酸

ポンプ：LC-5A，カラム：Sim-pack SCR-102H（7.9 mmφ × 30 cm），移動相：0.85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>／水（7.93 v/v），カラム温度：50°C，流速：1.0 ml/min，注入量：ポアサイズ 0.45 μm のマイクロフィルターを用いてろ過した発酵液 20 μl，検出器：UV 210 nm，測定：peak height 法によった。

#### 2) ジアセチル

ポンプ：LC-10AT，カラム：ZORBAX ODS（4.5 mmφ × 25 cm），移動相：アセトニトリル／水（40:60v/v），カラム温度：50°C，流速：1.0 ml/min，注入量：ポアサイズ 0.45 μm のマイクロフィルターを用いてろ過した発酵液 20 μl，検出器：UV 365 nm，測定：peak height 法によった。

### 6. 各種糖類の資化性

Table 3 に示す BCG 培地のグルコースを各種糖類に変えて、28°C で 7 日間培養後の増殖性を 5 段階で判別した。

### 7. ビタミン及びアミノ酸要求性

田村・角田改変合成培地を用いる常法<sup>4)</sup>に従い、ビタミン及びアミノ酸要求性を検討した。

### 8. 生成する乳酸の光学異性体（D- 及び L-）の決定

J.K. インターナショナル社製 F- キットを用いる酵素法により決定した。

### 9. 菌株の同定

16SrRNA の相同性解析により決定した。すなわち、

純粋培養したコロニーより Life Technologies 社製 PrepMan® Ultra Reagent を用いて DNA を抽出し、得られた DNA を PCR 反応に用いるテンプレートとして、下記に示す PCR 用プライマーを用いて 16S rRNA 領域を PCR 反応により増幅させた。得られた PCR 反応産物を精製した後、Big-Dye Terminator 反应用テンプレートとして用い、下記のシーケンス反应用プライマーを用いてシーケンス反応を行った。得られた反応液を GE ヘルスケア バイオサイエンス社製 AutoSeq™G-50 を用いて精製し、Life Technologies 社製 ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer によって塩基配列を解読した。なお、得られた塩基配列は国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DBJ)、MicroSeq® ID v2.0 付帯データベース及び三井農林 (株) データベース (MMIDDB) を用いて相同性を比較し、同定した。

PCR 用プライマー

Forward primer : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-CAG-3'

Reverse Primer : 5'-AAGGAGGTGATCCARCCG-CA-3'

シーケンス反应用プライマー

Forward primer1 : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-CAG-3'

Forward primer2 : 5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3'

Forward primer3 : 5'-GGTTAAGTCCCGCAAC-GA-3'

Reverse primer1 : 5'-TACCGCGGCTGCTGGCA-3'

Reverse primer2 : 5'-TCGTTGCGGGACTTA-ACC-3'

Reverse primer3 : 5'-AAGGAGGTGATCCARCCG-CA -3'

## 実験結果及び考察

### 1. 酒造工程及び製成酒（清酒）から分離された乳酸菌の形態と発酵形式

Table 1 に掲げた分離源からの乳酸菌の形態と発酵形式を Table 4 に示す。なお、本研究においては、BCG 培地あるいは SI 培地で生育することと、光学顕微鏡による菌体の形態観察により乳酸菌であると判定し、必要に応じて生産する酸が乳酸であることを確認した。なお、これまでに清酒から検出されたことがあり、アルコール耐性のある *Bacillus cereus*（耐熱性のある芽胞の形成と高い生育温度 40～50℃）は検出されなかった。

本研究において、酒造工程、製成酒から分離された乳酸菌のうち、球菌は 1 菌株のみで、20 菌株が桿菌、3 株が長桿菌であり、発酵形式はホモ 13 株、ヘテロ 11 株であった。

### 2. 分離した乳酸菌の含エタノール培地における増殖

酒造における微生物管理の知見に供するため、BCG 培地及び SI 培地での増殖性と、15% までのエタノール存在下における増殖性ならびにジアセチル生成の有無を定性的に確認し、Table 5 に示した。

まず注目されることは、分離された乳酸菌の多くが 10% 程度のエタノール存在下で増殖可能だということである。BCG、SI 培地いずれかにおいてエタノール 5% で増殖できない菌は No. 1 と No. 10 のみであった。

No. 14, 18, 20, 23 及び 24 は分離源がいずれも清

Table 4 Morphotype and fermentation type of isolated lactic acid bacteria

| No. | Morphotype | Fermentation | No. | Morphotype | Fermentation |
|-----|------------|--------------|-----|------------|--------------|
| 1   | Rod        | Hetero       | 13  | Rod        | Hetero       |
| 2   | Coccus     | Hetero       | 14  | Rod        | Hetero       |
| 3   | Rod        | Homo         | 15  | Rod        | Hetero       |
| 4   | Rod        | Hetero       | 16  | Rod        | Homo         |
| 5   | Rod        | Homo         | 17  | Rod        | Homo         |
| 6   | Long-rod   | Homo         | 18  | Rod        | Hetero       |
| 7   | Long-rod   | Homo         | 19  | Rod        | Homo         |
| 8   | Rod        | Homo         | 20  | Rod        | Hetero       |
| 9   | Rod        | Homo         | 21  | Rod        | Hetero       |
| 10  | Rod        | Homo         | 22  | Rod        | Homo         |
| 11  | Rod        | Homo         | 23  | Rod        | Hetero       |
| 12  | Rod        | Homo         | 24  | Rod        | Hetero       |

**Table 5** The properties of lactic acid bacteria isolated from sake and a sake brewing process : their growth and diacetyl formation in an ethanol containing medium.

| Strain No. | In BCG medium<br>Alc% |   |    |    | In SI medium<br>Alc% |   |    |    | Diacetyl |
|------------|-----------------------|---|----|----|----------------------|---|----|----|----------|
|            | 0                     | 5 | 10 | 15 | 0                    | 5 | 10 | 15 |          |
| 1          | 4                     | 2 | —  | —  | 1                    | — | —  | —  | —        |
| 2          | 5                     | 2 | 2  | —  | 5                    | 5 | 4  | —  | —        |
| 3          | 5                     | 4 | 1  | —  | 5                    | 5 | 3  | —  | ++       |
| 4          | 4                     | 5 | 2  | —  | 5                    | 5 | 3  | —  | +        |
| 5          | 4                     | 4 | 3  | —  | 5                    | 5 | 4  | —  | +        |
| 6          | 5                     | 1 | 1  | —  | 5                    | 5 | 2  | —  | +        |
| 7          | 4                     | 5 | 4  | —  | 5                    | 5 | 3  | —  | —        |
| 8          | 5                     | 4 | 2  | —  | 5                    | 5 | 2  | —  | —        |
| 9          | 4                     | 2 | 2  | —  | 5                    | 5 | 3  | —  | +        |
| 10         | 5                     | — | —  | —  | 4                    | 4 | —  | —  | —        |
| 11         | 5                     | 1 | 1  | —  | 5                    | 5 | —  | —  | —        |
| 12         | 2                     | 1 | 1  | 1  | 4                    | 5 | 4  | 4  | —        |
| 13         | 2                     | 2 | 1  | 1  | 5                    | 5 | 5  | 3  | —        |
| 14         | —                     | — | —  | —  | —                    | 2 | 4  | 3  | —        |
| 15         | 4                     | — | —  | —  | 4                    | 4 | 4  | 1  | ++       |
| 16         | 3                     | 1 | 1  | —  | 5                    | 4 | 4  | 1  | ++       |
| 17         | 2                     | 1 | 1  | —  | 4                    | 4 | 2  | —  | —        |
| 18         | —                     | — | —  | —  | 3                    | 4 | 5  | 2  | —        |
| 19         | 3                     | 3 | 4  | —  | 5                    | 5 | 3  | 1  | —        |
| 20         | —                     | — | —  | —  | 1                    | 4 | 5  | 1  | +        |
| 21         | 3                     | 2 | 2  | —  | 5                    | 5 | 4  | 3  | —        |
| 22         | 4                     | 5 | 5  | —  | 5                    | 5 | 5  | 1  | —        |
| 23         | —                     | 5 | 5  | —  | —                    | 5 | 5  | —  | —        |
| 24         | —                     | — | —  | —  | —                    | 2 | 5  | —  | —        |
| ATCC15434  | 5                     | 1 | 5  | —  | 5                    | 5 | 2  | —  | +        |
| S-26       | 4                     | 2 | —  | —  | 5                    | 5 | 4  | —  | —        |
| S-4        | 1                     | 1 | 1  | —  | 4                    | 5 | 5  | 3  | —        |
| S-7        | 2                     | 1 | 1  | —  | 5                    | 5 | 5  | 5  | —        |

About  $2 \times 10^5$ /mL lactic acid bacteria were cultivated at 28°C for 10 days. The degree of growth for each bacterium was evaluated in five phases, i.e., 5 was the value of optical density at 660nm in a 10mm  $\phi$  cell cuvet ( $OD_{660nm}$ ) of more than 1.7 and bacterial cell number was  $1.5 \sim 1.9 \times 10^8$ /mL; 4,  $OD_{660nm}$ , 1.2~1.5 ( $1.0 \sim 1.3 \times 10^8$ /mL); 3,  $OD_{660nm}$ , 0.9~0.98 ( $8.0 \sim 9.0 \times 10^7$ /mL); 2,  $OD_{660nm}$ , 0.5~0.7 ( $4.0 \sim 6.0 \times 10^7$ /mL); 1,  $OD_{660nm}$ , 0.3~0.5 ( $2.0 \sim 4.0 \times 10^7$ /mL); —, no or very poor growth,  $OD_{660nm}$  was less than 0.1 ( $\sim 5.0 \times 10^6$ /mL).

The formation of diacetyl was qualitatively evaluated by scent. The threshold value of diacetyl is 83  $\mu\text{g/L}$ <sup>1)</sup>.

酒であるが，エタノール非存在下では増殖できない，あるいは増殖が困難な菌株（No. 18 及び 20 は SI 培地で増殖は認められるものの他の菌株に比較してアルコール非存在下での増殖は悪い。）である。また，No. 23 を除き，エタノール含有 BCG 培地では増殖できなくとも，SI 培地では増殖できることから，これらの菌株は両培地の組成の差，例えば有機酸類やメバロン酸などの要求性があるものと推察される。同様の栄養要求性は，両培地における増殖性の差からみて，No. 12, 13, 15, 16, 17, 19 及び 21 でも認められる。真性火落菌の好アルコール性（生育促進効果）について

は，既に明らかにされている<sup>56)</sup>が，標準株の S-4 及び S-7 でも同様の性質が認められた。

エタノール 15% でも増殖する菌株は，No. 12 など 9 菌株（分離株の約 38%）に及ぶが，これらはほとんどが火落酒から分離された菌株であり，当然のことといえる。

ジアセチルの生成が認められたのは 8 株（分離株の約 33%）であった。最近の傾向として火落酒ではジアセチル臭の発生が認められないものも多いとされるが，これらの菌株では少なくとも弁別閾値である 83  $\mu\text{g/L}$ <sup>7)</sup>以上の生成がみられ，中でも No. 3, 15 及び 16

において多く生成された。

No. 2 は、球菌であることが他の菌株と大きく異なっている。生醗系酒母の育成初期に出現する球状乳酸菌として、低温（4℃）で生育可能な *Leuconostoc mesenteroides* がよく分離され<sup>89)</sup>、広く知られている。黒瀬ら<sup>10)</sup>は低温発酵性の球状乳酸菌 *Leuconostoc citreum* を米麹から分離しているが、*L. mesenteroides* も *L. citreum* もいずれもヘテロ発酵型であって生成する乳酸は D 型と報告されており、われわれが麹から分離した No. 2 はヘテロ発酵型（Table 4）であるが、後述の L 型乳酸を生成する点で *L. mesenteroides* と異なっており<sup>11)</sup>、また 10% エタノール存在下でも比較的旺盛に増殖するなど、菌株同定には今後詳しい検討が必要である。

### 3. 菌数の計測—培地中の菌体密度と吸光度との関係について

Table 5 に示す各菌株について、菌体密度（bacterial cells number /mL）と吸光度（OD660nm）との関

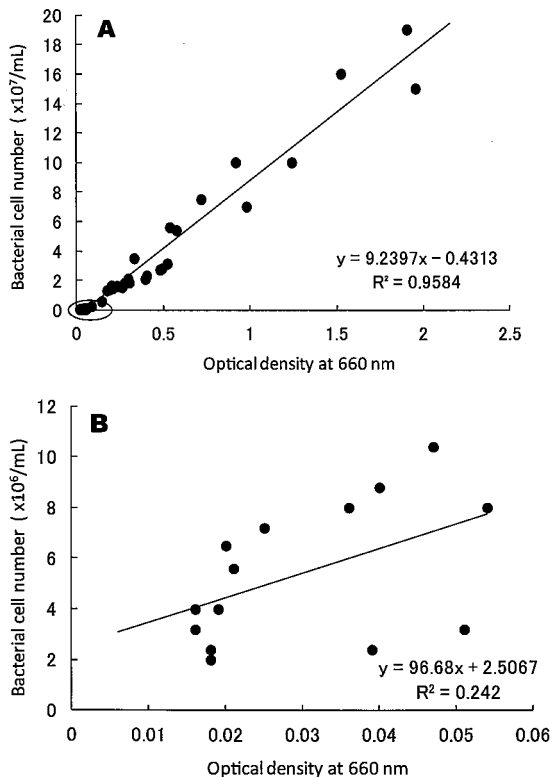


Fig. 1 Relationship between bacterial cell number (cells/mL) and optical density.

係を Fig. 1 に示した。OD660nm が 0.1 以上を示す範囲、即ち菌体密度にして約  $5 \times 10^6/\text{mL}$  以上の場合は、比較的精度よく菌体密度を計測できることを知った（Fig. 1A）ので、培養経過分析などには、簡便法として吸光度測定による菌体密度を適宜用いた。ただ、OD660nm が 0.1 以下（Fig. 1A の○部分）では、誤差が大きい（Fig. 1B 参照）。

乳酸菌の生醗系酒母への利用や MLF 菌としての応用を念頭に、Table 4 に示す菌の細胞形態と乳酸発酵の形式、及び Table 5 に示すエタノール含有培地での増殖性とジアセチルの生成を参考にして、球菌である No. 2、さらに BCG 培地と SI 培地における増殖性に差があり、かつジアセチルを生成する菌の代表として No. 6、両方の培地での増殖性に大きな差が無く、ジアセチルを生成しない No. 7 及び 8 について、標準株 S-4 及び S-7 を対照株としながら、更なる検討を加えた。なお、No. 13～24 の清酒から分離した、いわゆる火落菌の上記への利用や応用についても、興味をもたれるところではあるが、製成酒の火落ちへのより高い危険性に配慮して、本研究の目的のひとつである ML 菌としての利用の観点からは外した。これらの菌の性質については、今後の研究課題にしたい。

### 4. 乳酸存在下と各 pH における増殖性

Table 3 に示す BCG 培地から色素（BCG : Bromine cresol green）を除いた培地（YAS 培地と略称する。）

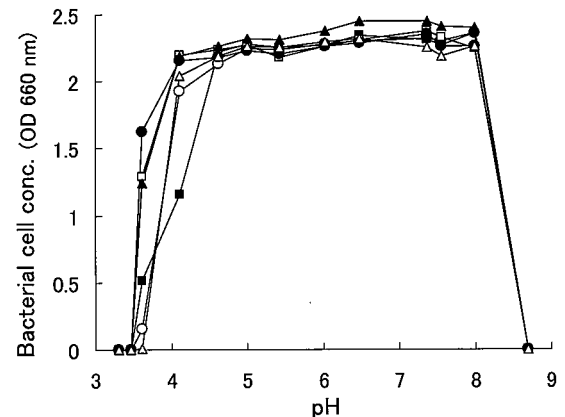
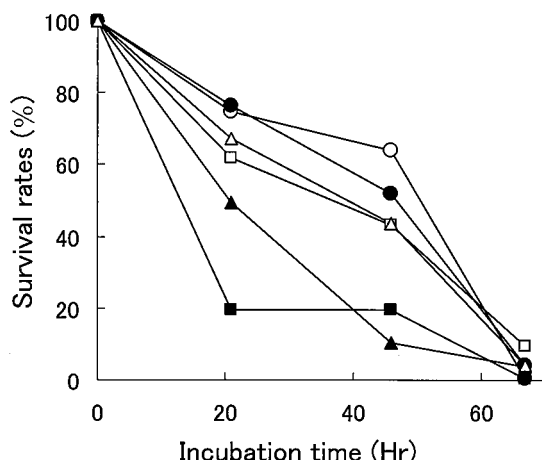


Fig. 2 Growth of lactic acid bacteria under various pH conditions.

The symbols are ○, No.2; ■, No. 6; □, No.7; ●, No.8; ▲, RIB 8450 (S-4) and △, RIB 8400 (S-7).



**Fig. 3** Tolerance test of lactic acid bacteria in lactic acid solution.

$1 \times 10^8$ /ml lactic acid bacteria were stand for 21-67 hours in 840 mM lactic acid contained a YAS medium at 15°C. The lactic acid concentration is the same as sake seed mash. The symbols are the same as those for Fig. 2.

の pH を 3.3～8.6 にそれぞれ調整し，28°C，7 日間培養した後の増殖性を Fig. 2 に示した。pH4.5 以下の領域で No. 6 が他の菌に比べて増殖が悪く，また，その他の菌の間にもそれぞれわずかながら差がみられたが，pH4.5～8.0 においては差がみられなかった。

速醸酒母における乳酸濃度を想定し，水 100 L に 90% 乳酸を 700 mL 加えて調製した乳酸水溶液 (pH2.3) に供試乳酸菌を菌体密度  $10^8$ /mL になるよう添加し，15°C で 21～67 時間静置後の生菌数を計測した結果を Fig. 3 に示した。67 時間後の生菌率はいずれの株でも 10% 以下となったが，45 時間目頃までは，各菌株間に生菌率の差がみられ，乳酸耐性の違いが認められた。即ち，No. 2 の乳酸耐性が最も強く，No. 8 がそれに続いた。S-7 と No. 7 は中程度，S-4 と No. 6 の乳酸耐性は供試菌株の中で最も弱かった。

##### 5. エタノール存在下における生存性

エタノール 18% (v/v) を含む乳酸水溶液 (pH4.2) を調製し，これに菌体密度が  $10^8$ /mL になるように供試菌を加え，15°C で 72 時間静置後の生存率を計測した結果を Table 6 に示した。No. 7 及び No. 8，特に No. 8 が高い生存率を示した。

**Table 6** Survival ratio (%) of lactic acid bacteria in an 18% ethanol solution.

| Strain No. | Survival ratio % |
|------------|------------------|
| 2          | 0.1 or less      |
| 6          | 1'111114.2       |
| 7          | 49.1             |
| 8          | 56.6             |
| S-4        | 0.1 or less      |
| S-7        | 13.7             |

The lactic acid bacteria was suspended in a 0.08 M lactic acid buffer solution containing 18% (v/v) ethanol and incubated at 15°C for 72 hours. Thereafter, the living and dead cells were counted separately with a methylene blue staining method described in Materials and Methods 3.

**Table 7** Assimilation of carbohydrates.

|           | Strain |       |       |       |     |
|-----------|--------|-------|-------|-------|-----|
|           | No. 2  | No. 6 | No. 7 | No. 8 | S-4 |
| Glucose   | 5      | 5     | 5     | 5     | 5   |
| Arabinose | —      | —     | —     | —     | —   |
| Xylose    | 5      | 5     | 5     | 5     | —   |
| Lactose   | —      | —     | 5     | 5     | 5   |
| Maltose   | 5      | 5     | 5     | 5     | 3   |
| Sucrose   | 5      | 5     | 5     | 5     | 5   |
| Mannose   | 5      | 5     | 5     | 5     | 5   |
| Fructose  | 5      | 5     | 5     | 5     | 5   |
| Inuline   | 2      | 4     | 5     | 1     | 5   |
| Galactose | 5      | 5     | 5     | 5     | 5   |
| Starch    | 2      | 2     | —     | —     | —   |
| Raffinose | —      | 1     | 3     | 1     | —   |
| Sorbitose | —      | —     | 2     | 1     | —   |

##### 6. 糖の資化性

Table 7 に示すように，いずれの菌もアラビノースは資化できず，デンプン，ラフィノース，ソルビトースは菌により差異が見られたが，その他の糖に比べて資化性が悪い。乳糖も No. 2, 6 は資化できなかったが，グルコース，マルトース，スクロース，マンノース，フラクトース及びガラクトースについてはいずれの菌もよく資化できることが分かった。

##### 7. アミノ酸要求性

結果は Table 8 に示した。全ての供試菌及び標準株 S-4 は Arg, Glu, Ile, Leu 及び Val を共通に要求する。また，S-4 は試験に供した 11 種のアミノ酸のうち，Thr を除く 10 種のアミノ酸を要求するが，Thr を要求するのは No. 2 の球菌のみであり，Lys 及び Cys は標準株の S-4 以外はいずれの供試菌も要求しない。No. 7 及び No. 8 は，Arg 及び Leu 以外は S-7 に類似

**Table 8** Requirements for amino acids of isolated lactic acid bacteria.

| Strain No. | Amino acid |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|            | Arg        | Glu | Ile | Leu | Lys | Phe | Ser | Thr | Tyr | Cys | Val |
| 2          | +          | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   |
| 6          | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   | +   |
| 7          | +          | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |
| 8          | +          | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |
| S-4        | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   |
| S-7        | -          | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |

The lactic acid bacteria were cultivated at 28°C for 7 days in the Tamura and Kakuta's amino acid requirement test modified with a synthetic medium.

The symbols + and - indicate either a requirement or non-requirement for amino acid for growth, respectively.

した要求性を示した。

## 8. ビタミン要求性

関係すると思われるパントテン酸，リボフラビン，葉酸，ナイアシン及びビオチンについて検討した結果を Table 9 に示した。No. 6 はビオチン以外のビタミンを要求し，溝口<sup>12)</sup>が報告しているように生醗系乳酸菌の可能性がある。一方，No. 2 は生醗の初期に生育する球菌 (*L. mesenteroides*) に比べて多くのビタミンを要求することから，これとは異なる乳酸菌であると推定される。No. 7 及び No. 8 菌は標準株を含めてビタミン要求性は比較的少ないことが分かった。

## 9. 生成する乳酸の光学異性体 (D- 及び L-) の決定

結果を Table 10 に示した。No. 2 株は L- 乳酸の生成が 95% 以上で，乳酸球菌の多くが L- 乳酸を生成するという既報<sup>13)</sup>の結果と一致した。また，生醗系酒母から分離された No. 6 も生成する乳酸は約 90% が L- 乳酸であり，標準株の S-4 も 77% が L- 乳酸であった。一方，No. 7 及び 8 菌は生成する D-, L- 乳酸がほぼ等量でラセミ体に近いものであった。また，S-7 は生成する乳酸の 90% が D- 乳酸で，他とは大きく異なることが分かった。

以上の諸性質は外池ら<sup>11)</sup>の報告とは一致しないも

**Table 9** Requirement for vitamins of isolated lactic acid bacteria.

| Strain No. | Vitamins        |            |            |        |        |
|------------|-----------------|------------|------------|--------|--------|
|            | Ca-Pantothenate | Riboflavin | Folic acid | Niacin | Biotin |
| 2          | +               | +          | +          | -      | -      |
| 6          | +               | +          | +          | +      | -      |
| 7          | +               | -          | -          | -      | -      |
| 8          | +               | -          | -          | -      | +      |
| S-4        | +               | -          | -          | -      | -      |
| S-7        | +               | +          | -          | -      | -      |

The meanings of the symbols are the same as those for Table 8.

**Table 10** Optical isomer of lactic acid produced by lactic acid bacteria.

| Strain No. | Acidity (mL) | L-Lactate (mg/mL) | D-Lactate (mg/mL) | Ratio of L : D |
|------------|--------------|-------------------|-------------------|----------------|
| 2          | 11.4         | 7,010             | 2320              | 96 : 4         |
| 6          | 6            | 3,038             | 2384              | 89 : 11        |
| 7          | 12.5         | 5,656             | 3,748             | 60 : 40        |
| 8          | 6.4          | 1,487             | 1,666             | 47 : 53        |
| S-4        | 8.9          | 4,299             | 1,249             | 77 : 23        |
| S-7        | 7            | 2259              | 2,658             | 9 : 91         |

Lactic acid bacteria were cultivated at 28°C for 4 days in a YAS medium.

D- and L- lactic acids were analyzed by enzymatic method using an F-kit (J. K. International Corp. Tokyo).

Acidity (total acidity) : Titration of 0.1N NaOH to neutralize 10mL broth.

のも多く，分離源の詳しい検討や菌種の同定にはさらなる検討が必要である。

#### 10. 供試菌のリンゴ酸／乳酸転換率

生醗系酒母などから分離された乳酸菌（生酸菌）の ML 菌としての利用を前提とした場合，リンゴ酸の乳酸への転換率はもちろんであるがジアセチルの生成が問題となる。このような観点から，供試菌のジアセチルや有機酸の生成に焦点を当てて供試菌の性質を検討し，結果を Table 11 に示した。ジアセチルを 0.1  $\mu\text{g/L}$  以上生成する No. 2 と No. 6 は，酢酸の生成が No. 7 と No. 8 より少ないものの，ML 菌として不適当であると判断した。

そこで，ML 菌としての可能性のある No. 7 及び No. 8 菌について，アルコール 15% の清酒中で MLF が生起するかを検討した。結果は Table 12 に示すように，No. 7, No. 8 菌ともにリンゴ酸から乳酸への変換率が高く，ML 菌として使用できる可能性が示唆された。ただし製成酒の酸度増加をもたらす可能性の高い No. 7 に比べ，D-, L-乳酸ともに生成の少ない No. 8 菌が ML 菌として適していると思われる。

**Table 11** Production of lactate, acetate, and diacetyl by isolated lactic acid bacteria.

| Strain No. | Lactate | Acetate | Diacetyl      |
|------------|---------|---------|---------------|
| 2          | 3,906   | 358     | 0.3           |
| 6          | 16,135  | 376     | 0.7           |
| 7          | 14,701  | 705     | 0.1           |
| 8          | 15,559  | 671     | less than 0.1 |
| S-4        | 17,359  | 376     | 2.5           |
| S-7        | 10,015  | 985     | less than 0.1 |

The numerical values are  $\mu\text{g/mL}$ .

The strains were cultivated at 28°C for 4 days in a YAS medium.

#### 11. 16SrRNA の相同性解析による菌株の同定

ML 菌として実用の可能性が高い No. 8 菌について菌株の同定を行った。当該菌株の 16SrRNA からその約 1,500bp の塩基配列を解読し，データベース（GenBank/EMBL/DDBJ, MicroSeq Idv2.0 及び MMID-DB）により，近縁菌種との相同性を比較し，結果を Table 13 に示した。99.9~100.0% の高い相同性が得られたことから，No. 8 菌は *Lactobacillus paracasei* であると同定された。また，本研究においては，ML 菌として有用な菌の選抜に重点をおいたため，No. 8 菌以外の菌株の属，種の決定については，種々の栄養要求性や糖資化性や発酵性などを精査しながら，将来の課題としたい。

#### 要 約

我々は近年（1990 年以降），蔵内酒を含む酒造場の各製造工程及び市販清酒から火落菌及び腐造性乳酸菌など各種乳酸菌の分離を試み，麴 2 点，醸造用水 1 点，酒母 2 点，もろみ 7 点，蔵内酒 1 点，市販酒 11 点の乳酸菌を分離した。これらは，麴から分離した球菌 1 点以外はすべて桿菌であった。発酵型は，ホモ 13 点，ヘテロ 11 点で，分離された菌の約 60% は 10% エタノール含有培地で生育した。また，検出閾値以上のジアセチルを生成するものは約 1/3 に過ぎなかった。

リンゴ酸高生産酵母による清酒の MLF による呈酸味性の改善に使える可能性のある菌として，山廃仕込みによる醪から分離した No. 8 を選抜した。本菌は 16SrRNA の塩基配列の相同性から，*Lactobacillus paracasei* であると同定された。

**Table 12** Conversion rate(%) of malic acid by MLF.

| Strain  | Incub. time (hr) | Malate | Conversion % of malate | D-lactate | L-lactate |
|---------|------------------|--------|------------------------|-----------|-----------|
| No. 7   | 19               | 3.0    | 99.7                   | 448       | 2,004     |
|         | 43               | 2.0    | 99.8                   | 436       | 3,504     |
| No. 8   | 19               | 3.0    | 99.7                   | 333       | 2,185     |
|         | 43               | 1.0    | 99.9                   | 660       | 2,689     |
| Control | —                | 1,050  | —                      | 238       | 127       |

The numerical values of the organic acids are  $\mu\text{g/mL}$ .

The strains were incubated at 15°C for 43 hrs in sake (ethanol content 15%) which contained  $\mu\text{g/mL}$  of malic acid and D-, L- lactic acid respectively as shown in the table.

**Table 13** The similarity of the 16S rRNA sequence between No.8 strain and related *Lactobacilli*.

| Sequence Entry                                                   | Accession No. | Match/total (bp) | Similarity (%) |
|------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|----------------|
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NCDO 151T | AB008205      | 1498/1498        | 100.0          |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM8130   | D79212        | 1498/1498        | 100.0          |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> ATCC25599  | (MicroSeq)    | 1498/1498        | 100.0          |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC25302 | (MicroSeq)    | 1497/1497        | 100.0          |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM1171    | D16550        | 1492/1492        | 100.0          |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NRIC0625  | AB362692      | 1497/1498        | 99.9           |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC15906  | AB181950      | 1493/1494        | 99.9           |
| <i>Lactobacillus zeae</i> ATCC15820                              | D86516        | 1487/1497        | 99.3           |
| <i>Lactobacillus casei</i> ATCC393                               | AF469172      | 1487/1498        | 99.3           |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136                           | D16552        | 1475/1491        | 98.9           |
| <i>Lactobacillus diolivorans</i> JKD6                            | AF264701      | 1382/1479        | 93.4           |
| <i>Lactobacillus satsumensis</i> NRIC0604                        | AB154519      | 1385/1486        | 93.2           |
| <i>Lactobacillus farraginis</i> NRIC0676                         | AB262731      | 1392/1494        | 93.2           |
| <i>Lactobacillus parafarraginis</i> NRIC0677                     | AB262734      | 1392/1495        | 93.1           |
| <i>Lactobacillus zymae</i> LMG22198                              | AJ632157      | 1388/1492        | 93.0           |
| <i>Lactobacillus otakiensis</i> YIT11163                         | AB366386      | 1390/1495        | 93.0           |
| <i>Lactobacillus namurensis</i> LMG23584                         | AM259119      | 1387/1493        | 92.9           |
| <i>Lactobacillus acidifarinae</i> LMG22200                       | AJ632158      | 1384/1490        | 92.9           |
| <i>Lactobacillus aquaticus</i> IMCC1736                          | DQ664203      | 1376/1487        | 92.5           |
| <i>Lactobacillus spicheri</i> LTH5753                            | AJ534844      | 1380/1492        | 92.5           |
| <i>Lactobacillus uvarum</i> 8                                    | AY681126      | 1375/1487        | 92.5           |
| <i>Lactobacillus capillatus</i> YIT11306                         | AB365976      | 1373/1485        | 92.5           |
| <i>Lactobacillus oeni</i> 59b                                    | AY681127      | 1376/1489        | 92.4           |
| <i>Lactobacillus cacaonum</i> LMG24285                           | AM905389      | 1372/1486        | 92.3           |

## 参考文献

- 菅間誠之助，井口琢郎：醸協，65 (8) 720-725 (1970)
- 注解編集委員会：第四回改正国税庁所定分析法注解（日本醸造協会，東京），p.233-234 (1996)
- European Brewing Convention, Analytica Microbiologia: J. Inst. Brew., 83 109 (1977)
- 内村 泰，岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル（朝倉書店，東京），p.52-55 (1992)
- 百瀬洋夫，野白喜久雄：醸協，65 (12) 1108-1112 (1970)
- 百瀬洋夫，秋山裕一，野白喜久雄：醸協，66 (8) 799-804 (1971)
- 宇都宮 仁，磯谷敦子，岩田 博：醸協，99 (9) 652-658 (2004)
- 芦沢 長：醸協，60 (10) 900-903 (1965)
- 樋口智子，大場孝宏，福岡県工技センター研究報告，No. 19, 51-53 (2009)
- 黒瀬直孝，浅野忠男，川北貞夫，垂水彰二：生工，82 (5) 183-190 (2004)
- 外池良三，百瀬洋夫，久富鉄也，阿久津富郎：醸協，58 (7) 647-653 (1963)
- 溝口晴彦：第 97 回 清酒製造技術セミナー要旨集（日本醸造協会，東京）p.44-47 (2011)
- 好井久雄，金子安之，山口和夫編著：食品微生物ハンドブック（技報堂出版，東京），p.51-56 (1995)